

KT-Magic Taqman Universal Master Mix, with UNG

AT5702-01/02 使用说明书

产品介绍

KT-Magic TaqMan Universal Master Mix 是实时聚合酶链反应 (PCR) 所必需的组分预混液 (除了引物、探针、模板和水)，可用于扩增互补 DNA (cDNA) 和 DNA 靶点。使用十分便利并且应用范围广泛，包括定量和基因分型。

产品组成

KT-Magic Taqman Universal Master Mix, with UNG 是 2X 预混液，包含：

- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)
- Uracil-N glycosylase (UNG)
- dNTPs with dUTP
- ROX™ Passive Reference
- Optimized buffer components

试剂盒组份	AT5702-01 (100 次)	AT5702-02 (500 次)	保存条件	有效期
KT-Magic Taqman Universal Master Mix, with UNG	1mL	5mL	2°C-8°C	12 个月

试剂规格以 20μL 体系为标准

应用举例

1. TaqMan®基因表达分析
2. TaqMan®MicroRNA 检测
3. TaqMan®药物代谢基因分型分析
4. TaqMan®SNP 基因分型分析

注意事项

1. 使用前请上下颠倒轻柔混匀。
2. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行试验,防止交叉污染。

兼容仪器

- StepOne™ or StepOnePlus™ Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7900HT/7900HT Fast Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7700 Sequence Detection System
- Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System

常见问题及解决

1. 荧光信号弱

原因	解决办法
目标 DNA 拷贝数过少	适当增加 DNA 拷贝数，不建议增加引物探针的量

2. 重复性差

原因	解决办法
样本纯度低	纯度低的 DNA 可通过磁珠纯化来提高纯度
稀释的模板放置过久	从原液重新稀释后再进行反应，稀释液需充分混匀
引物或探针质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的 PCR 容易产生重现性差。通过变更引物和探针的浓度或 PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的 GC 含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物和探针。

3. NTC 可见扩增

原因	解决办法
发生交叉污染	更换新的试剂、无核酶水、实验环境
仪器设定误差 (多重 PCR)	当使用几种荧光探针时，请正确设定荧光测定，防止出现因不同染料的光谱交叉而导致的检测信号差异

4. 扩增曲线荧光信号很弱，或扩增曲线呈锯齿状

原因	解决办法
检测光光谱设定误差	由于不同荧光定量 PCR 仪的原理和提供的检测光光谱范围的差异，因此在选择探针的发光基团和淬灭基团时一定要根据所用的仪器型号设置的可检测的荧光信号范围内选择。请参照仪器的使用说明书，重新确定参数设置。
荧光探针纯度太低	请使用 HPLC 级别以上纯化的 Probe，否则残留的未结合的荧光染料会造成基线上飘，从而导致扩增产物所产生的荧光值变低。
荧光探针质量较差	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
荧光采集时间太短	对部分仪器，需要更长的延伸时间来充分采集荧光。扩增曲线锯齿状较明显时，将延伸时间设定为 45-60 sec 可得到改善。

操作步骤

一、配制 PCR 反应液

组分名称	20 μ L 体系	50 μ L 体系	终浓度
KT-Magic TaqMan Universal Master Mix	10.0 μ L	25.0 μ L	1X
Forward Primer	2.0 μ L	5.0 μ L	0.5-0.9 μ M
Reverse Primer R	2.0 μ L	5.0 μ L	0.5-0.9 μ M
TaqMan Probe	2.0 μ L	5.0 μ L	0.25 μ M
DNA sample	2.0 μ L	5.0 μ L	10-100ng
RNase free water	2.0 μ L	5.0 μ L	-
Total	20.0 μ L	50.0 μ L	-

注：1.请根据实验要求，调整引物探针至最优浓度。为了保证扩增效率和防止发生非特异性扩增，请保证引物探针的终浓度在参考范围内。

二、qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序：

	温度	时间	循环数
Step 1	50°C	2min	1
Step 2	95°C	10min	1
Step 3	95°C	15 sec	40
	60°C	30 sec	

注：50°Cfor2min 是为了保证 UNG 酶的最佳活性；

95°Cfor10min 是为了让 UNG 酶失活；

结果检测

反应结束后，确认扩增曲线和 CT 值。

扩增曲线示例

