

使用TTx的双酶一步法RNA检测方案

工业原料组合

方案介绍

该组合是使用了高效逆转录酶 ReverTra Ace[®] 和 PCR 酶 Hot Start TTx DNA Polymerase 的双酶体系一步法荧光定量试剂方案。以 THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit (货号: QRZ-101) 为基础, 使用了升级后的 TTx DNA 聚合酶, 进一步提高 PCR 循环反应速度和检测灵敏度。

产品组分

产品名	货号	容量
2x Buffer for rTth/ TTx ^{*1}	QRZ-1B1	100 mL
Hot Start TTx DNA Polymerase ^{*2}	HSTTX-129	2.5 mL/ 10000 U
ReverTra Ace [™]	TRT-101	100 µl/ 10000 U
RNase Inhibitor, Recombinant ^{**}	SIN-201	2500 U
Uracil-DNA Glycosylase, Heat-labile ^{**}	UNG-101	200 U

*1: buffer 是含有 Mg²⁺、dATP、dCTP、dGTP、dUTP 等的 2× 浓度的反应溶液, 大包装有售。

*2: 该产品浓度为 4U/ µl, 含有高性能热启动抗体 anti-Taq high (货号: TCP-101)。

** : SIN-201 浓度约为 20~40 U/ µl, UNG-101 浓度为 1 U/ µl。

※: 各产品更大包装有售。

推荐的反应体系

组分	20 µl 反应	50 µl 反应	终浓度
RNase free water	补至 20 µl	补至 50 µl	
2x Buffer for rTth/ TTx	10 µl	25 µl	1×
Hot Start TTx DNA Polymerase	0.5 µl	1.25 µl	
ReverTra Ace [™]	0.5 µl	1.25 µl	
F/R Primer (10 µM each)	1 µl	2.5 µl	0.5 µM
TaqMan [®] probe (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM
50x ROX Reference dye ^{*1}	0.4 / 0.04 µl	1 / 0.1 µl	1x / 0.1x
RNase Inhibitor ^{*2}	1 unit	2.5 unit	
(Uracil-N-Glycosylase)	0.4 unit	1 unit	
RNA 样本	Y µl	Y µl	

*1: 部分定量 PCR 仪 (ABI 7500 等) 需要添加 ROX reference dye 以校正分装误差和孔间误差, 请自行准备。

*2: 推荐每 20 µl 体系至少添加 1 U, 提高用量可以获得更好的 RNA 酶抑制效果。

推荐的反应条件

步骤	温度	时间	循环数
(UNG 反应) ^{*1}	(20~25°C)	(10 min)	1
逆转录反应	50°C	10 min	1
预变性	95°C	1 min	1
变性	95°C	15 sec	
延伸 (退火)	60°C	30 sec ^{*2}	40 ~ 45

*1: 配制体系时即已开始 UNG 反应。

*2: 延伸时间最短可设置为 1sec, 请根据实际定量效果进行调整。

