

使用Tth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 Tth DNA Polymerase 的双酶体系一步法荧光定量试剂方案，使用与 THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit（货号：QRZ-101）近似的原料。组合方案更加灵活，适合对原料细节信息把控更严格的客户。

产品组分

产品名	货号	容量
2x Buffer for rTth/ TTx ^{*1}	QRZ-1B1	100 mL
Hot Start Tth DNA Polymerase ^{*2}	HSTTH-329	2.5 mL/ 10000 U
ReverTra Ace [™]	TRT-101	100 µl/ 10000 U
RNase Inhibitor, Recombinant ^{*3}	SIN-201	2500 U
Uracil-DNA Glycosylase, Heat-labile ^{*3}	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）。

*3: 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 Tth 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） ^{*2}	60°C	45 sec	40 ~ 45

*1: 配制体系时即已开始UNG反应。

*2: 定量效果不佳时，请调整退火/延伸的温度和时间。

