

使用TTx的单酶一步法RNA检测方案

工业原料组合

方案介绍

该组合是以Hot Start TTx DNA polymerase为核心的单酶体系一步法荧光定量试剂方案，该酶在Mn²⁺存在条件下具有很强的逆转录活性，可在单一体系内连续进行cDNA的合成与PCR反应。相比其他单酶方案具有更快的PCR循环速度、更高的灵敏度以及血液直扩能力。另外还有无甘油的可冻干版本。

产品组分

产品名	货号	容量
5x Buffer for rTth/ TTx ^{*1}	QRT-1B1	40 mL
Hot Start TTx DNA Polymerase ^{*2}	HSTTX-129	2.5 mL/ 10000 U
dNTPs Mixture ^{*3}	NTP-201	1 mL
50 mM Mn(OAc) ₂	QRT-MN1	20 mL
RNase Inhibitor, Recombinant ^{*3}	SIN-201	2500 U
Uracil-DNA Glycosylase, Heat-labile ^{*3}	UNG-101	200 U

*1: buffer 中不含有 Mg²⁺、Mn²⁺、dNTP以及酶。

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

*3: 如使用UNG酶，请用NTP-501（含dUTP）代替NTP-201，SIN-201浓度约为20~40 U/ μl，UNG-101浓度为1 U/ μl，NTP-201浓度为2mM。

※: 部分产品更大包装有售，buffer和酶均有无甘油版本。

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	
5x Buffer for rTth/ TTx	4 μl	10 μl	1×
Hot Start TTx DNA Polymerase	0.25 μl	1.25 μl	
50 mM Mn(OAc) ₂	1 μl	2.5 μl	2.5 mM
2mM dNTPs	4 μl	10 μl	0.4 mM
F/R Primer (10 μM each)	0.6 μl	1.5 μl	0.3 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
预变性	90°C	30 sec	1
逆转录反应	61°C	20 min	1
预变性	95°C	30 sec	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，可选。

*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。

