

使用TTh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 Tth 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。特有的Tth酶搭配高性能热启动抗体可以在较广的模板浓度范围下进行准确定量。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 Tth DNA Polymerase ^{*2}	HSTTH-329	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 Tth 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） ^{*2}	60°C	45 sec	40 ~ 45

*1: 配制体系时即已开始UNG反应，可选。

*2: 定量效果不佳时，请调整退火/延伸的温度和时间。

