

产品概述

Hyperstart Tth Premix-UNG (Probe qRT-PCR) 是采用探针法进行一步法反转录 Real Time PCR 的定性、定量反应专用试剂。含有的 Tth 酶既具有 5' -3' 依赖于 DNA 模板的聚合酶活性,又具有在 Mn^{2+} 存在下、更高的高温反转录活性,能够有效消除 RNA 高级结构和低温条件下引物非特异性退火对 cDNA 合成的不利影响,从而增加反转录的特异性,提高扩增的效率和产量。本试剂采用优化配方的专用 Buffer 和 UNG/dUTP 防污染系统,可以在较宽的定量区域内得到良好的标准曲线,准确进行定量,能够有效防止 PCR 产物残留、气溶胶污染导致的假阳性扩增。本试剂与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容,如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。

试剂组成

1. 25×Hyperstart Tth/UNG Mix
2. 5×Hyperstart Tth Premix Buffer (dUTP) (Mn^{2+} free)
3. 25 mM $Mn(OAc)_2$

保存条件

-20°C 长期保存, 4°C 可保存 3 个月。使用前应混匀, 避免反复冻融。

qRT-PCR 反应体系配制

| 试 剂 | 25 μ L 体系 | 50 μ L 体系 | 终浓度 |
|---|---------------|---------------|--------|
| 5×Hyperstart Tth Premix Buffer (dUTP) (Mn^{2+} free) | 5 μ L | 10 μ L | 1× |
| 25×Hyperstart Tth/UNG Mix | 1 μ L | 2 μ L | 1× |
| 25 mM $Mn(OAc)_2$ | 2~3 μ L | 4~6 μ L | 2~3 mM |
| 25×Primer-Probe Mix ¹ | 1 μ L | 2 μ L | 1× |
| Template RNA ² | — | — | — |
| ddH ₂ O | To 25 μ L | To 50 μ L | — |

1. 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果; 反应性能较差时, 可以在 0.2~1 μ M 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1~0.3 μ M 范围内优化。可进行浓度梯度的实验, 寻找引物和探针的最佳组合。
2. 不同种类的 RNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定最佳的 RNA 模板添加量。

反应条件

| 步骤 | 温度 | 时长 | 循环数 |
|------|------|---------|-------|
| 消化 | 50°C | 2 min | 1 |
| 变性 | 90°C | 30 s | 1 |
| 反转录 | 60°C | 25 min | 1 |
| 变性 | 95°C | 1~5 min | 1 |
| 变性 | 95°C | 10~20 s | 40~50 |
| 退火延伸 | 60°C | 20~60 s | |

货号：M5101

5×Hyperstart Tth Premix-UNG (Probe qRT-PCR)

2023V01



质量控制

1. 功能检测：qRT-PCR 的敏感性、特异性、可重复性。
2. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

技术说明

1. Tth 的常用反转录温度为 60°C，可以根据扩增反应的特征不同在 60°C~70°C 进行优化；反转录时间可以在 15~30 min 进行优化。
2. 该体系更适合于特异性引物进行 RT 反应，并且引物 Tm 值应为 60°C 或更高温度；不推荐采用 Oligo (dT)₁₈₋₂₀ 或 Random Primers 等 Tm 值过低的引物。
3. 具有更高的反转录温度，能够有效提高由于 RNA 复杂二级结构带来的反转录效率降低的问题；并且有助于提高引物与模板杂交的特异性；适用于双重或多重单酶一步法 RT-PCR 反应。
4. 与 Taq 相比，对各类 PCR 抑制物具有更高的耐受性。
5. 具有更宽的线性检测范围，能够有效提高低浓度模板的检测灵敏度。
6. Tth 为嗜热菌来源，耐热性更好，比传统双酶一步法 RT-PCR 体系具有更高的稳定性。
7. 由于采用 Mn²⁺ 进行扩增，本体系保真度有所降低，因此不适合于保真度要求较高的克隆、测序等实验。
8. 对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 长片段扩增建议采用三步法。
9. 不同待扩增基因对 dUTP 的利用效率和对 UNG 酶的敏感度不同，因此，如果采用 UNG 体系导致检测灵敏度下降，应对反应体系进行调整优化，如需技术支持请与我公司联系。
10. 扩增前后请使用专用的区域和移液器，戴手套操作并经常更换；PCR 反应完成后切勿打开反应管，以最大限度地减少 PCR 产物对样品的污染。