

货号：M5101

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

2023V01



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 Mn²⁺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) (Mn²⁺ 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 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
5×Hyperstart Tth Premix Buffer (dUTP) (Mn ²⁺ free)	5 μL	10 μL	1×
25×Hyperstart Tth/UNG Mix	1 μL	2 μL	1×
25 mM Mn(OAc) ₂	2~3 μL	4~6 μL	2~3 mM
25×Primer-Probe Mix ¹	1 μL	2 μL	1×
Template RNA ²	—	—	—
ddH ₂ O	To 25 μL	To 50 μL	—

1. 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果；反应性能较差时，可以在 0.2~1 μM 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1~0.3 μM 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。