5×Hyperstart Tth Premix (Probe qRT-PCR)

2023V01



产品概述

Hyperstart Tth Premix (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,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,并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
- 2. 5×Hyperstart Tth Premix Buffer (Mn²⁺ free)
- 3. 25 mM Mn(OAc)₂

保存条件

-20℃长期保存,4℃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 (Mn ²⁺ free)	5 μL	10 μL	1×
25×Hyperstart Tth	1 μL	2 μL	1×
25 mM Mn(OAc) ₂	2~3 μL	4~6 μL	2~3 mM
25×Primer-Probe Mix¹	1 μL	2 μL	1×
Template RNA ²			
ddH_2O	To 25 μL	To 50 μL	

- 1. 通常引物终浓度为 $0.2~\mu M$ 可以得到较好结果;反应性能较差时,可以在 $0.2\sim 1~\mu M$ 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 $0.1\sim 0.3~\mu M$ 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 DNA 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 DNA 模板添加量。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数	
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: M510

5×Hyperstart Tth Premix (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. 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。