

描述: 该产品的核心原料酶为 HotStart AptaTaq DNA Polymerase 与 ET Reverse Transcriptase (Extreme ThermoStable Reverse Transcriptase, 极度耐热反转录酶) 组装而成, 其专用于 RNA 模式的 TaqMan 探针法的 RT-qPCR 扩增。

该产品具有以下特征: (1) AptaTaq DNA 聚合酶为高亲和力的核酸适配体(Aptamer)封闭酶活性中心, 因此在低温下 Taq DNA 聚合酶无活性, 当温度升高到 50℃, 核酸适配体脱离酶活性中心, 从而释放酶活。Aptamer 具有全程扩增调控能力, 因此, 更易获得高灵敏度扩增, 以及用于多重 TaqMan PCR 扩增。除此外, AptaTaq DNA 聚合酶是一种快速酶, 该酶具有 4kb/min 的延伸速度, 在快速 qPCR 中, 10s 的退火和延伸时间, 即可完成片段的扩增和探针切割。(2) ET Reverse Transcriptase 为 HaiGene 最新开发的极度耐热反转录酶, 该酶在 85 度加热 2min 后仍然保留>85%的活性, 最佳逆转录温度为 55-75℃。这种高温逆转录的特性将极大的降低非特异扩增、增加靶标的检测灵敏, 提高多重 RT-qPCR、高 GC 含量靶标的扩增性能。(3) 专属的冻干配方, 赋予了该试剂的多用途性, 不仅能满足常规的科研需求, 还使得冻干产品开发和生产在一种试剂下同步完成。使用本试剂无需加入任何其它辅助试剂即可完成全体系的冻干制品。

组分:

名 称	200Tx20μl	1000Tx20μl
5xAptaET-RTqPCR LyoMix	0.8 ml	0.8 mlx5

储存: 长期保存请置于-20℃以下 (18 个月有效); 制品反复冻融 10 次不影响性能, 但应避免反复冻融; 短期推荐置于 2-8℃保存, 在此条件下制品稳定储存 2 周。制品由于含有高浓度的冻干赋形剂, 因此, 在融化时可能会有白色不溶物, 此时放置到 30℃ (或手心) 3-5min 后即可完全溶解, 性能无下降。

1. 用于常规科研检测和冻干前的预实验

1.1 20xPCR Primer Mix 的准备

	20x	1x
Primer F	4-16 μM	0.2~0.8 μM
Primer R	4-16 μM	0.2~0.8 μM
Probe	4-8 μM	0.2-0.4 μM

1.2 配制 PCR 反应体系

5xAptaET-RTqPCR LyoMix	4 μl
20xPCR Primer Mix	1 μl
模板 RNA (最高)	15 μl
Total	20 μl

1.3 qPCR 扩增程序

变性裂解	85℃ (非必须)	2min
逆转录	55℃-75℃	10min
预变性	95℃	30s
循环	95℃	10s
40-45	60℃ (信号采集)	10~15s

注意: (1) 变性裂解步骤: 在检测样本为纯化的 RNA 时, 该步骤请忽略, 强烈的高温会导致低 copy 的 RNA 断裂。粗样本直扩时, 可设置此步骤。(2) 逆转录步骤: 温度设置需要匹配扩增引物的退火温度, 通常推荐 60-65℃。

2. 冻干反应

专属的配方使得该试剂, 易于成型, 无需添加任何其它冻干辅料。但对于不同的用户来讲, 由于冻干形式、冻干体积、上机量、冻干容器、冻干磨具等因素存在差异, 以下程序仅供参考。进一步的程序优化均需根据具体情况自行调整。对于非专业人员来讲, 请直接采购 HaiGene 的冻干制品, 或委托订制。

2.1 配制 PCR 冻干体系

5xAptaET-RTqPCR LyoMix	4 μl
20xPCR Primer Mix	1 μl
Total	5 μl

体系配置完毕后, 1h 内完成, 成球或分管步骤, 进行后续冻干。

2.2 制品成型后的冻干程序

-50℃预冻 5-10min; -50℃ 4-8h (真空段); -50℃升温到 25℃ (每小时升温 5℃); 25℃ 2-10h; 25℃恒温。