

**描述:** dU-3GmTTx Mix 中包含化学封闭热启动 3GTaq DNA 聚合酶和极度耐热逆转录酶(Extreme ThermoStable Reverse Transcriptase, ET RTase)、dA/C/G/UTP(不含 dTTP)、Mg<sup>2+</sup>与其它稳定剂。该制品仅在 Mg<sup>2+</sup>条件下,即可对于 DNA 和 RNA 进行无偏差扩增。其为 TaqMan PCR 的专用预混试剂,可以高灵敏的检测 DNA 和 RNA 分子。得益于耐受 95°C 高温的 ET RTase,无论是 DNA 或 RNA 病毒,均可通过**加热反应来释放样本中的核酸分子**,并用于后续 PCR 扩增。因此,**粗制样本该试剂可以直接进行检测,无需核酸纯化。**

试剂特性:(1) 3GTaq 和 ET RTase 均为化学修饰 (<50°C 完全无活性),仅有 95°C 加热 5min 后才能恢复活性;(2) ET RTase 在 95°C 加热 5min 后仍然保留全部活性,在反应进程中就可完成逆转录,因此无需逆转录步骤。该酶通过修改 TTx 酶配体中心,使其逆转录活性,由 Mn<sup>2+</sup>依赖变为 Mg<sup>2+</sup>,这种变化使得 RT-PCR 得一同步化。(3) TTx 聚合酶活性中心的修改,导致其 5'-3'外切酶活性下降。因此,3G Taq 酶提供额外的 Flap5'-3'外切酶活性来切割 TaqMan 探针。(4) 以 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增的最大长度为 500bp,扩增效率最高的长度为 70-150bp。(5) 4xdU-3GmTTx Mix 不含甘油,可用于冻干制品的制备。(6) 制品不含 dTTP,因此在联合热敏 UDG 可进行防污染扩增。

## 组分

名称	100Tx20µl	500Tx20µl
4xdU-3GmTTx Mix(with UDG)	500 µl	500 µl x5

**注意:** (1) 4xdU-3GmTTx Mix 溶化时可能会有白色结晶,必要时可于 30°C 下放置 2-5min 使结晶体溶解。

(2) 3GTaq 和 ET RTase 均为化学修饰的热启动酶,必须于 95°C 加热 5min 才能恢复酶的活性,不能随意缩短时间。

(3) 1x 浓度下含有 1%海藻糖、1.25%甘露醇、1%蔗糖、2.25%葡聚糖 5000、25mU/µl 的 Chemi 3GTaq、20fmol/µl 的 ET RTase、10mU/µl 的热敏 UDG、不含甘油。

(4) 避光保存: -20°C 可保存 2 年。

## 操作方法

### 1. 按照如下组分配制 20 µl PCR 反应体系

		1x浓度
4xdU-3GmTTx Mix	5 µl	
Primer F1 (10 µM)	0.8 µl	400 nM
Primer R1 (10 µM)	0.8 µl	400 nM
Probe1 (10 µM)	0.4 µl	200 nM
其它引物和探针	x µl	
模板 DNA/RNA	10 ng	
ddH <sub>2</sub> O Up to	20 µl	

### 2. 纯化 DNA/RNA 或者粗样本 qPCR 反应程序:

Stage	温度	时间	必须步骤	热启动
Stage 1	95°C	5 min	必须步骤	热启动
Stage 2	95°C	10 s		
循环 40 次	55-65°C	30 s	收集信号	退火/延伸