

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)、Mg²⁺与其它稳定剂。该制品仅在 Mg²⁺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, 该酶通过修改 TTx 酶配体中心, 使其逆转录活性, 由 Mn²⁺依赖变为 Mg²⁺, 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 Flap 5'-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) 5xdU-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
5xdU-3GmTTx Mix	400 μl	400 μl x5

注意: (1) 5xdU-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 1.5% 海藻糖、2% 甘露醇、25mU/μl 的 Chemi 3GTaq、20fmol/μl 的 ET RTase、不含甘油。
 (4) 避光保存: -20°C 可保存 2 年。
 (5) 该制品中不含 dTTP, 防污染 PCR 时, 建议热敏 UDG 的使用浓度为 1x 下 2~10mU/μl。

操作方法

1. 按照如下组分配制 20 μl PCR 反应体系

	1x 浓度	
5xdU-3GmTTx Mix	4 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 ₂ O Up to	20 μl	

2. DNA 的 qPCR 反应程序:

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

3. 纯化 RNA 或粗样本的 qPCR 反应程序:

Stage 1	95°C	5 min	释放核酸、变性、热启动
Stage 2	55-70°C	10 min	逆转录
Stage 3	95°C	10 s	
循环 40 次	55-65°C	30 s	收集信号 退火/延伸