

描述: 3GmTTx Reagent 为冻干瓶形式的预混试剂，其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)、热敏 UDG, 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。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 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，3GTaq 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) 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
Lyo-3GmTTx Reagent	1 瓶	1 瓶 x5
10%甘油	1.5 ml	1.5 ml x2

注意: (1) 冻干制品未溶解状态下：37°C 下运输 (1 个月有效)，25°C 室温 (1 年有效)，长期保存请置于-20°C 以下 (5 年有效)。每瓶用 0.45 ml 10%甘油溶解后，为 4x 浓度，干物质占 0.05 ml 体积。该 4xMix 在-20°C 保存 (6 个月有效)。
 (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) 每瓶该制品含有 40 mg 海藻糖，50 mg 甘露醇，50U 的 3GTaq 聚合酶，40 pmol 的 ET RTase。

操作方法

1. 按照如下组分配制 20 μl PCR 反应体系

	1×浓度		
4x3GmTTx 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 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