

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, Mg^{2+} 与其它稳定剂。该制品仅在 Mg^{2+} 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 Mn^{2+} 依赖变为 Mg^{2+} , 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	100Tx20 μ l	500Tx20 μ l
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 μ l PCR 反应体系

	1x浓度
4x3GmTTx Mix	5 μ l
Primer F1 (10 μ M)	0.8 μ l 400 nM
Primer R1 (10 μ M)	0.8 μ l 400 nM
Probe1 (10 μ M)	0.4 μ l 200 nM
其它引物和探针	x μ l
模板 DNA/RNA	10 ng
ddH ₂ O Up to	20 μ l

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