

**描述:** Chemi 3GmTTx qPCR Bead 中包含化学封闭热启动 3G Taq DNA 聚合酶、极度耐热逆转录酶(Extreme ThermoStable Reverse Transcriptase, ET RTase)、dNTP、 $Mg^{2+}$ 与冻干赋形剂。该制品仅在  $Mg^{2+}$  条件下,即可对于 DNA 和 RNA 进行无偏差扩增。其为 TaqMan PCR 的专用预混试剂(不含 ROX),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。Chemi

试剂特性: (1) Chemi 3G Taq 酶为化学修饰 (<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 15min 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, 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 500 bp, 扩增效率最高的长度为 70-150 bp。

#### 组分

| 名 称                    | 96Tx25μl |
|------------------------|----------|
| Chemi 3GmTTx qPCR Bead | 96 个     |

#### 注意事项:

- (1) -20°C 以下干燥密封保存 (60 个月有效); 室温干燥密封保存 (12 个月有效)。由于制品为冻干形态,极易吸潮,在制品开封后,推荐放置-20°C 以下保存 24 个月。
- (2) 3G Taq 酶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) 冻干球直径约 2.6mm。

#### 操作方法

##### 1. 按照如下组分配制 25 μl PCR 反应体系

|                          | 1×浓度   |        |
|--------------------------|--------|--------|
| Chemi 3GmTTx qPCR Bead   | 1 个    |        |
| Primer F1 (10 μM)        | 1 μl   | 400 nM |
| Primer R1 (10 μM)        | 1 μl   | 400 nM |
| Probe1 (10 μM)           | 0.5 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 | 25 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  |      |       |
| 40cycles | 55-65°C | 30 s  | 收集信号 | 退火/延伸 |

##### 3. 纯化 RNA 的 qPCR 反应程序:

|          |         |        |      |       |
|----------|---------|--------|------|-------|
| Stage 1  | 55-70°C | 10 min |      | 逆转录   |
| Stage 2  | 95°C    | 5 min  | 必须步骤 | 热启动   |
| Stage 3  | 95°C    | 10 s   |      |       |
| 40cycles | 55-65°C | 30 s   | 收集信号 | 退火/延伸 |

##### 4. 粗样本 RNA 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   |             |       |
| 40cycles | 55-65°C | 30 s   | 收集信号        | 退火/延伸 |