

描述: 3GmTTx qPCR Mix 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。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) 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 500bp, 扩增效率最高的长度为 70-150bp。 (5) 5xChemi 3GmTTx Mix 不含甘油,在配合 HaiGene 研制的 Q10 球形冻干赋形剂(货号:S2012)后,可轻松制备含扩增引物的冻干球。这种组合设计便于研究、开发、生产流程于一体化操作,并兼具一定的灵活性,减少了试剂开发和固定化生产的难度。

组分

名 称	100Tx20 μ l	500Tx20 μ l
5xChemi 3GmTTx qPCR Mix	400 μ l	1 ml x2

注意: (1) 5xChemi 3GmTTx Mix 溶化时可能会有白色结晶,必要时可于 37°C 下放置 2-5min 使结晶体溶解。

(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) 冻干球制备过程中,试剂配制后,建议 1h 内完成制球。

(4) 避光保存: -20°C 可保存 3 年。

操作方法

1. 按照如下组分配制 20 μ l PCR 反应体系

	1 $\times$ 浓度
5xChemi 3GmTTx Mix	4 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	10ng
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 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		
40 cycles	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		
40 cycles	55-65°C	30 s	收集信号	退火/延伸

5. 冻干球的制备

5xChemi 3GmTTx Mix	5 μ l
3xQ10 Bead Freeze-Dry Bulks	3.33 μ l
25xPCR Primer Mix	1 μ l
ddH ₂ O	0.67 μ l
Total	10 μ l

该试剂冻干体系 10 μ l, 扩增反应体积 25 μ l, 球直径约 2.6mm。

6. 冻干程序(不同的冻干机有差异, 仅供参考)

制球完毕后, -50°C 预冻 5min; -50°C 2~4h(真空段); -50°C 升温到 30°C (每小时升温 5°C); 30°C 6-10h。