

描述: 双热启动的 DualStart 3GmTTx qPCR Mix 中包含核酸适配体封闭的热启动 3GTaq DNA 聚合酶、极度耐热逆转录酶(Extreme ThermoStable Reverse Transcriptase, ET RTase)、dNTP、Mg²⁺激活剂(Activator)、Mg²⁺与其它稳定剂。该制品仅在 Mg²⁺条件下(无需 Mn²⁺)，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 酶和 ET RTase 均为核酸适配体 (Aptamer) 封闭热启动的热启动酶 (30°C 以下活性封闭>90%)，在 50°C 以上完全恢复活性。除此外，如实验有更高的热启动要求，可额外使用单独的组分 (Blocker) 对反应体系的 Mg²⁺进行封闭。Blocker 与 Mg²⁺形成不溶沉淀物，聚合酶活性被完全阻断，在 95°C 加热 2min 后，Activator 水解掉 Blocker，Mg²⁺得以释放，从而启动扩增反应，从而实现双重热启动功能。(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 Mn²⁺依赖变为 Mg²⁺，这种变化使得 RT-PCR 得一同步化。(3) 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。(4) 5xChemi 3GmTTx Mix 不含甘油，在配合 HaiGene 研制的 Q10 球型冻干赋形剂(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	100Tx20μl	500Tx20μl
5xDualStart 3GmTTx qPCR Mix	400 μl	1 ml x2
50xBlocker25	0.25 ml	0.25 ml

注意: (1) 5xDualStart 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) Blocker25 为可选试剂，在不使用该试剂时，扩增体系仍然由 Aptamer 来维持热启动效应。

(3) 在使用 Blocker25 时，其应优先(或同时)于引物加入到 Mix 中。因此建议，引物探针预先与 Blocker 混合后使用。

(4) 冻干球制备过程中，试剂配制后应 15min 内完成制球。

(5) 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 μl PCR 反应体系

	1×浓度
5xDualStart 3GmTTx Mix	4 μl
50xBlocker25	0.4 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	10ng
ddH ₂ O Up to	20 μl

注意：由于 Blocker 与 Mg²⁺形成不溶物后，会迅速沉淀，因此配制工作液后，应尽快分装到反应管中。如检测样本较多时，分装期间可再次旋涡 5s 后再分装。

2. DNA 的 qPCR 反应程序:

Stage 1	95°C	2 min	释放 Mg ²⁺ 、变性核酸
Stage 2	95°C	10 s	
40 cycles	55-65°C	30 s	收集信号 退火/延伸

3. RNA 的 qPCR 反应程序:

Stage 1	95°C	2 min	释放核酸与 Mg ²⁺ 、变性
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

4. 冻干球的制备

5xDualStart 3GmTTx Mix	5 μl
3xQ10 Bead Freeze-Dry Bulks	3.33 μl
50xBlocker25	0.5 μl
25xPCR Primer Mix	1 μl
ddH ₂ O	0.17 μl
Total	10 μl

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

5. 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。