

描述: mTTx DNA/RNA 聚合酶经电子重构架技术, 改变了 TTx 的活性配体中心, 使其在 Mg^{2+} 条件下仍然具有极强的逆转录活性。mTTx DNA/RNA Polymerase 在 Mg^{2+} 条件下对于 DNA 模板和 RNA 模板扩增能力几乎无偏差, 该试剂为进行 RNA TaqMan RT-PCR 的专用预混试剂。可以高灵敏的检测 RNA 分子。对于粗制样本该试剂可以直接进行检测, 无需核酸纯化, 尤其适用拭存样本。

mTTx DNA/RNA Polymerase 的特性: (1) 依赖于 DNA 模板的聚合酶活性; (2) 极强的依赖于 RNA 模板的逆转录活性; (3) 5'-3'外切酶活性, 用于 TaqMan 探针切割; (4) 金属配体离子为 Mg^{2+} , 通常使用浓度 2-3.5 mM; (5) 相比于 TTx DNA 聚合酶, mTTx 的耐热性能有所下降, 92°C 条件下的半衰期为 30min; (6) 热启动版本的 mTTx 在 50°C 条件下 100%无活性, 92°C 加热 5min 后恢复活性; (7) 以 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增的最大长度为 280bp, 扩增效率最高的长度为 70-150bp。

组分

名称	1 ml	25 ml
2xmTTx MasterMix	1 ml	25 ml

储存: -20°C 可保存 3 年。

注意: 2xmTTx MasterMix 中包含优化的反应缓冲盐、dNTP (0.2mM each)、 Mg^{2+} (5mM), 10%甘油, 0.1 U/ μ l 的 HotStart mTTx DNA/RNA Polymerase, 为 2 倍浓度。

反应实例

1. 按以下组分配制 RT-qPCR 反应液

2xmTTx MasterMix	10 μ l
上游引物 (10 μ M)	0.4 μ l
下游引物 (10 μ M)	0.4 μ l
荧光探针 (10 μ M)	0.2 μ l
RNA	X μ l
ddH ₂ O	Up to 20 μ l

注意: 引物和探针的使用浓度可在 0.1-0.8 μ l 直接调整。

2. Direct One-Step RT-PCR 程序

92°C	5 min	热启动
60°C	5 min	逆转录
92°C	10 s	循环 35-45 次
60°C	30 s (收集信号)	

注意: mTTx 的最佳变性温度为 92°C, 其它温度条件都会导致试剂性能下降。逆转录步骤的温度可根据实际情况在 58-70°C 调整。