

产品概述

Robustart Tth 是我公司开发的热启动 Tth 酶，既具有 5' -3' 依赖于 DNA 模板的聚合酶活性，可广泛应用于各种 PCR 反应；又具有在 Mn^{2+} 存在下，更高的高温反转录活性，能够有效消除 RNA 高级结构和低温条件下引物非特异性退火对 cDNA 合成的不利影响，从而增加反转录的特异性，提高扩增的效率和产量，可以用来进行单酶一步法 RT-PCR 反应。Robustart Tth 在常温下活性被封闭，特异性更好，能够显著增强低浓度模板的扩增效果。

规格

5 U/ μ L

试剂组成

- 5 U/ μ L Robustart Tth
- 10 \times Tth RT Buffer Basic (Mn^{2+} free) (选配)
- 25 mM $Mn(OAc)_2$ (选配)

*10 \times Tth RT Buffer Basic (Mn^{2+} free) 不含 dNTP 和 Mn^{2+} ，配制反应体系时请加入 dNTPs 和 $Mn(OAc)_2$ 使用。

活性定义

在 70°C、30 min 内，将 10 nmol dNTPs 掺入到酸不溶性 DNA 中所需的酶量为 1 个活性单位 (U)。

保存条件

-20°C 长期保存，使用前应混匀，避免反复冻融。

质量控制

- SDS-PAGE 电泳纯度大于 98%。
- 扩增灵敏度、批间差异、稳定性。
- 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

PCR 反应体系配制

Component	Volume per Reaction	Concentration in Master Mix
10 \times Tth RT Buffer Basic (Mn^{2+} free) ¹	5 μ L	1 \times
dNTPs (10 mM each dNTP)	1.5 μ L	300 μ M
25 mM $Mn(OAc)_2$	2~6 μ L	1~3 mM
5 U/ μ L Robustart Tth	1~2 μ L	5~10 U
25 \times Primer Mix ²	2 μ L	1 \times
Template	—	< 1 μ g/reaction
ddH ₂ O	To 50 μ L	—

- 该 Buffer 不含 dNTP 和 Mn^{2+} ，必须补充加入 dNTPs 和 $Mn(OAc)_2$ 使用。
- 若用于 qPCR/qRT-PCR，则需加入荧光探针到反应体系中。通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果；反应性能较差时，可以在 0.2~1 μ M 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1~0.3 μ M 范围内优化。可进行浓度梯度的实验，寻找引物和探针的最佳组合。

反应条件

普通 PCR				一步法 RT-PCR			
步骤	温度	时长	循环数	步骤	温度	时长	循环数
热启动	95℃	1~5 min	1	变性	90℃	30 s	1
变性	95℃	10~20 s	35~50	逆转录	60℃	25 min	1
退火延伸	56~64℃	20~60 s		变性	95℃	1~5 min	1
				变性	95℃	10~20 s	35~50
			退火延伸	56~64℃	20~60 s		

技术说明

1. 具有 5' -3' 聚合酶、5' -3' 外切核酸酶活性；无 3' -5' 外切酶活性；PCR 产物 3' 端为 A。
2. Robustart Tth 常用的反转录温度为 60°C, 可以根据扩增反应的特征不同在 60°C~70°C 进行优化；反转录时间可以在 15~30 min 进行优化。
3. 更适合用于特异性引物进行 RT 反应, 并且引物 Tm 值应为 60°C 或更高温度；不推荐采用 Oligo(dT)₁₈₋₂₀ 或 Random Primers 等 Tm 值过低的引物。
4. 有利于解决 RNA 复杂二级结构带来的反转录效率降低的问题；有助于提高引物与模板杂交的特异性；适用于双重或多重单酶一步法 RT-PCR 反应。
5. 与 M-MLV 相比具有更高的热稳定性；且对各类 PCR 抑制物具有更高的耐受性。
6. 由于采用 Mn²⁺ 进行扩增，本体系保真度有所降低，因此不适合于保真度要求较高的克隆、测序等实验。
7. 对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 长片段扩增建议采用三步法。