

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 Mn²⁺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/μL

试剂组成

1. 5 U/μL Robustart Tth
2. 10×Tth RT Buffer Basic (Mn²⁺ free) (选配)
3. 25 mM Mn(OAc)₂ (选配)

*10×Tth RT Buffer Basic (Mn²⁺ free)不含 dNTP 和 Mn²⁺, 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

1. SDS-PAGE 电泳纯度大于 98%。
2. 扩增灵敏度、批间差异、稳定性。
3. 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×Tth RT Buffer Basic (Mn ²⁺ free) ¹	5 μL	1×
dNTPs (10 mM each dNTP)	1.5 μL	300 μM
25 mM Mn(OAc) ₂	2~6 μL	1~3 mM
5 U/μL Robustart Tth	1~2 μL	5~10 U
25×Primer Mix ²	2 μL	1×
Template	---	< 1 μg/reaction
ddH ₂ O	To 50 μL	---

1. 该 Buffer 不含 dNTP 和 Mn²⁺, 必须补充加入 dNTPs 和 Mn(OAc)₂ 使用。
2. 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 μM 可以得到较好结果; 反应性能较差时, 可以在 0.2~1 μM 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1~0.3 μM 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°C	1~5 min	35~50	变性	90°C	30 s	1
变性	95°C	10~20 s		逆转录	60°C	25 min	1
退火延伸	56~64°C	20~60 s		变性	95°C	1~5 min	1
				变性	95°C	10~20 s	35~50
				退火延伸	56~64°C	20~60 s	

技术说明

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 与 M-MLV 相比具有更高的热稳定性；且对各类 PCR 抑制剂具有更高的耐受性。
- 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。
- 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。