

Recombinant *Tth* DNA Polymerase

TaKaRa *Tth*

Code: R510A

包装量: 250 U
浓度: 5 U/ μ l

制品内容

| | |
|---|-------------|
| TaKaRa <i>Tth</i> | 250 U |
| 10X <i>Tth</i> PCR Buffer (Mg ²⁺ plus) | 1.0 ml |
| 5X <i>Tth</i> RT-PCR Buffer | 1.0 ml |
| dNTP Mixture (10 mM each) | 150 μ l |
| 50 mM Mn(OAc) ₂ | 250 μ l |

贮存溶液

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl (pH 7.5) | 10 mM |
| KCl | 300 mM |
| EDTA | 0.1 mM |
| DTT | 1 mM |
| Triton X-100 | 0.1% |
| glycerol | 50% |

保 存 -20°C

起 源

Escherichia coli carrying a plasmid that encodes the *Tth* DNA Polymerase gene.

活性定义

用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 在 74°C, 30 分钟内, 摄入 10 nmol 的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为 1 个活性单位 (U)。

活性定义反应液组成

| | |
|----------------|----------------------------|
| 25 mM | TAPS-NaOH (pH9.3, 25°C) |
| 50 mM | KCl |
| 2 mM | MgCl ₂ |
| 0.1 mM | DTT |
| 0.2 mM | each dATP · dGTP · dCTP |
| 0.1 mM | dTTP |
| 10 μ Ci/ml | [³ H]dTTP |
| 0.25 mg/ml | Activated salmon sperm DNA |

纯 度

- 10 U 的本酶和 1 μ g 的 λ -Hind III 在 65°C 下反应 4 小时, 未检出外切酶活性。
- 10 U 的本酶和 1 μ g 的 Supercoiled pBR322 DNA 在 74°C 下反应 2 小时, 未检出内切酶活性。
- 10 U 的本酶和 1 μ g 的 16S,23S rRNA 在 37°C 下反应 4 小时, 未检出 RNA 分解酶活性。
- 10 U 的本酶和 1 μ g 的 λ DNA 在 37°C 下反应 16 小时, 未检出 DNA 分解酶活性。

用 途

- PCR 法扩增 DNA
Tth DNA Polymerase 在高温下 (95°C) 能够持续保持很高的活性, 可以用于 DNA 片段的扩增, 且具有 5' \rightarrow 3' 外切酶活性。
- RT-PCR
在 Mn²⁺ 存在的情况下, *Tth* DNA Polymerase 具有 RT 酶活性, 且没有 RNase H 活性, 能够应用于 RNA 的检测。

使用方法

使用前, 需根据目标基因来确定反应的最适条件 (*Tth* DNA Polymerase 的浓度, DNA 或 RNA 模板的浓度, 引物, Mn²⁺ 的浓度, 孵育温度等)。

1. PCR 标准操作流程

将试剂轻轻混匀并离心, 在冰上按下列组份配制 PCR 反应液。为了保证反应液配制的准确性, 减少分装时造成的误差, 应严格按照比实际用量稍大的体积配制 Master Mix (通常配制反应数+1 的量), 取配制好的 Master Mix 分装到反应管中, 最后加入 DNA 样品开始反应。

| | |
|---|---------------------------|
| 10X <i>Tth</i> PCR Buffer (Mg ²⁺ plus) | 5 μ l |
| dNTP Mixture (10 mM each) | 1 μ l |
| 上游 Primer | 0.4 μ M (final conc.) |
| 下游 Primer | 0.4 μ M (final conc.) |
| Template DNA | < 500 ng |
| TaKaRa <i>Tth</i> (5 U/ μ l) * | 0.5 μ l |
| 灭菌水 | up to 50 μ l |

* 推荐每个反应添加 2.5 U。对有些引物和基因, 添加 0.625 U~2.5 U 可能会得到更好的效果。

将反应液轻轻混匀并离心收集于管底。放入 thermal cycler 中进行反应, 条件如下:

| | | |
|----------|----------|----------------|
| 94°C | 1 min | } 30~40 cycles |
| 94°C | 30 sec | |
| 50~70°C* | 30 sec | |
| 72°C | 45 sec** | |
| 72°C | 7 min | |

* 退火温度取决于引物的融解温度;

** 扩增 1 kb 以下的片段, 延伸时间为 45 sec。

使用 1%~3% 的琼脂糖凝胶对产物进行电泳分析。

2-1. One-step RT-PCR 操作流程

对于一步法 RT-PCR, cDNA 合成时推荐使用特异性引物; 每对引物需要确定 Mn²⁺ 浓度 (1~4 mM 范围内), 因为 dNTPs、模板 DNA 和引物等试剂均可整合锰离子。

在最适的条件下, *Tth* DNA Polymerase 可以反转录并扩增 2~3 kb 的片段。没有优化的情况下, 为保证高效的扩增, 片段长度应小于 1 kb。

Master Mix 的准备

推荐配制两个 Master Mix。

将试剂轻轻混匀并离心, 在冰上按下列组份配制两个 Master Mix。为了保证反应液配制的准确性, 减少分装时造成的误差, 应严格按照比实际用量稍大的体积配制 Master Mix (通常配制反应数+1 的量), 取配制好的 Master Mix 分装到反应管中, 最后加入 RNA 样品开始反应。

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Mix 1 | |
| dNTP Mixture (10 mM each) | 1.5 μ l |
| 上游 Primer | 0.45 μ M (final conc.) |
| 下游 Primer | 0.45 μ M (final conc.) |
| Total RNA | < 1 μ g |
| RNase free water | up to 25 μ l |

Mix 2

| | |
|------------------------------------|------------------|
| 5X <i>Tth</i> RT-PCR Buffer | 10 μ l |
| 50 mM Mn(OAc) ₂ | 2.5 μ l |
| <i>TaKaRa Tth</i> (5 U/ μ l) * | 1.5 μ l |
| RNase free water | up to 25 μ l |

* 推荐每个反应添加 7.5 U。对有些引物和基因，添加 5 U~15 U 可能会得到更好的效果。

将 Mix1 和 Mix 2 添加至 PCR tube 中，并轻轻的混匀（冰上操作），离心后将反应液收集于管底，放入 thermal cycler 中进行反应。条件如下：

| | | |
|-----------|-----------|----------------|
| 60~70°C* | 30 min | } 30~40 cycles |
| 94°C | 1 min | |
| 94°C | 30 sec | |
| 50~70°C** | 30 sec | |
| 72°C | 45 sec*** | |
| 72°C | 7 min | |

* 温度取决于下游 Primer 的融解温度，70°C 是 *Tth* DNA Polymerase 的最适反应温度，但是温度的升高会加速 RNA 的降解。

** 退火温度取决于引物的融解温度；

*** 扩增 1 kb 以下的片段，延伸时间为 45 sec。

使用 1%~3% 的琼脂糖凝胶对产物进行电泳分析。

2-2. Two-step RT-PCR 操作流程

Tth DNA Polymerase 也可以用于 Two-step RT-PCR。其中使用的 Buffers 不是制品中的组分。

Master Mix 的准备

将试剂轻轻混匀并离心，在冰上按下列组分配制 RT 反应液，为了保证反应液配制的准确性，减少分装时造成的误差，应按照比实际用量稍大的体积配制 Master Mix（通常配制反应数+1 的量），取配制好的 Master Mix 分装到反应管中，最后加入 RNA 样品开始反应。

| | |
|--|----------------------------|
| 10X RT Buffer | 2 μ l |
| (100 mM Tris-HCl (pH8.3 at 25°C), 900 mM KCl) | |
| 9 mM MnCl ₂ | 2 μ l |
| dNTP (10 mM each) | 0.4 μ l |
| 下游Primer | 0.75 μ M (final conc.) |
| Total RNA | < 200 ng |
| <i>TaKaRa Tth</i> (5 U/ μ l) | 0.8 μ l |
| RNase free water | up to 20 μ l |

将 RT 反应液在 60~70°C，孵育 10~30 min
(温度取决于下游Primer的融解温度，70°C是 *Tth* DNA Polymerase 的最适反应温度，但是温度的升高会加速 RNA 的降解。)

添加 80 μ l 现调制的 PCR Mix (如下) 至 RT 反应液中 (总体积为 100 μ l)

| | |
|---|----------------------------|
| 10X <i>Tth</i> PCR Buffer (Mg ²⁺ plus) | 8 μ l |
| EGTA, 7.5 mM | 10 μ l |
| 上游Primer | 0.15 μ M (final conc.) |
| RNase free water | up to 80 μ l |

混匀并轻轻离心将反应液收集于管底。放入 thermal cycler 中进行反应，条件如下：

| | | |
|----------|----------|----------------|
| 94°C | 1 min | } 30~40 cycles |
| 94°C | 30 sec | |
| 50~70°C* | 30 sec | |
| 72°C | 45 sec** | |
| 72°C | 7 min | |

* 退火温度取决于引物的融解温度；

** 扩增 1 kb 以下的片段，延伸时间为 45 sec。

使用 1%~3% 的琼脂糖凝胶对产物进行电泳分析。

附录

RNA 样品制备

要制备高质量的 RNA，关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列 (1) 或者 (2) 方法进行处理。

(1) 干热灭菌 (180°C, 60 min)
(2) 用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 下处理 12 小时。然后在 120°C 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

另外，建议使用 RNase-OFF™ (RNase Decontamination Solution) (Code No. 9037) 去除仪器和器具等的 RNase。RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用，不要用于其它实验。

【试剂配制】

用于 RNA 实验的试剂，需使用干热灭菌 (180°C, 60 min) 或用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装 (也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器)，使用的无菌水需用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

【制备方法】

使用简单的 RNA 纯化方法即可获得满足于 RT-PCR 反应的 RNA (只需少量的 RNA 便可进行 RT-PCR 反应)。但为了保证实验的成功率，建议使用 GTC 法 (异硫氰酸胍法) 制备的高纯度 RNA。

从培养细胞、组织中提取时，使用 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)。纯化的 RNA 用灭菌水或灭菌的 TE 缓冲液溶解。

RNase-OFF is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

v201901Da