

TaKaRa Tth

Hot Start Version

Code No. R520A

包装量: 250 U
浓度: 5 U/ μ l

制品内容

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

制品说明:

本制品是抗 Tth 单克隆抗体和 TaKaRa Tth 的混合制品, 适用于 Hot Start PCR。高温加热前, 抗 Tth 单克隆抗体与 Tth 酶结合, 抑制其活性, 从而抑制低温条件下由引物的非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。

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

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 (pH 9.3, 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 0.6 μ g 的 λ -Hind III 在 74°C 下反应 1 小时, 未检出外切酶活性。
- 10 U 的本酶和 0.6 μ g 的 Supercoiled pBR322 DNA 在 74°C 下反应 1 小时, 未检出内切酶活性。
- 10 U 的本酶和 0.6 μ g 的 16S.23S rRNA 在 37°C 下反应 1 小时, 未检出 RNA 分解酶活性。
- 10 U 的本酶和 0.6 μ g 的 λ DNA 在 74°C 下反应 1 小时和 37°C 下反应 16 小时, 未检出 DNA 分解酶活性。

用 途

- 1) Hot Start PCR 法扩增 DNA
- 2) RT-PCR

使用方法

使用前, 需根据目标基因来确定反应的最适条件 (TaKaRa Tth HS 添加量, 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 Tth 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 Tth HS(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。对于有些引物和基因, 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

One-step 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, 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> HS(5 U/ μ l) *	1 μ l
RNase free water	up to 25 μ l

* 推荐每个反应添加 5 U。对于有些引物和基因，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：

90°C	30 sec	} 30~40 cycles
60~70°C*	30 min	
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

TaKaRa Tth HS 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 (pH 8.3 at 25°C), 900 mM KCl)	
9 mM MnCl ₂	2 μ l
dNTP Mixture (10 mM each)	0.4 μ l
下游Primer	0.75 μ M (final conc.)
Total RNA	< 200 ng
<i>TaKaRa Tth</i> HS(5 U/ μ l)	0.8 μ l
RNase free water	up to 20 μ l

将 RT 反应液按如下条件进行反应：

90°C, 30 sec (抗体失活)

60~70°C, 10~30 min (RT 反应)

(温度取决于下游 Primer 的融解温度；70°C是最适反应温度，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，请联系我们，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