

产品说明

Trt DNA 聚合酶是大肠杆菌重组表达的嗜热细菌来源的热稳定型DNA 聚合酶，分子量为94 kDa。本酶经特殊改造，具有很强扩增能力和延伸速度，扩增片段的长度可达 3-5 kb，延伸速度为 1-2kb/min (72°C)。该酶具有 5'→3'聚合酶活性，较弱的 5'→3'外切酶活；无 3'→5'外切酶活性。扩增产物具有 3'-dA 尾巴。另外在 Mn²⁺离子存在下，*Trt* DNA 聚合酶具有反转录活性，利用该特性，可用该酶在同一管中进行反转录反应与 PCR 反应（1 步法 RT-PCR）。

活性定义

以大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 72°C、30 min 内，将 10 nmol 脱氧核糖核苷酸掺入到酸不溶物中所需的酶量，定义为一个活性单位（U）。

浓度: 2.5U/μl

保存条件: -20°C 保存

特点

- 同时具有反转录酶活性与聚合酶活性，能够用于 RNA 的一步法检测；
- 本酶经特殊改造，具有很强扩增能力和延伸速度，可在 2kb/min 延伸条件下，有效扩增 3-5kb 的 DNA 片段；
- 热稳定性好: 95°C 下半衰期超过 40 min；
- 耐受 dUTP, dITP；
- PCR 产物具有 3'-dA 尾巴，可直接用于 T/A 克隆。

适用范围

- 常规 PCR 扩增；
- 菌落 PCR；
- TA 克隆 PCR 产物添加 3'-dA；
- 高温反转录反应，降低RNA 二级结构对 RT 的影响；
- 一步法 RT-PCR。

产品包装规格及组成

Component	AE0351A/ AE0352A*	AE0351B/ AE0352B*	AE0351C/ AE0352C*	AE0351D/ AE0352D*
<i>Trt</i> DNA polymerase	100U	500U	500U×4	1000U×5
10× <i>Trt</i> PCR Buffer	0.5 ml×1	1.0 ml×1	1.0 ml×4	1.0 ml×10
5× <i>Trt</i> RT-PCR Buffer [#]	0.5 ml×1	1.0 ml×1	1.0 ml×4	1.0 ml×10
2 mM dNTPs	-/0.2 ml×1	-/1.0 ml×1	-/1.0 ml×4	-/1.0 ml×10

*附带 2mM dNTP 混合物。

[#]RT-PCR buffer 专门为 RT-PCR 配制，实验需使用 DEPC 处理 ddH₂O 和无核酸酶 A 试剂与耗材。

质量控制

相关测试表明无外源内切酶或外切脱氧核糖核酸酶、核糖核酸酶污染；PCR 方法检测无宿主残余 DNA，能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

室温放置一周，扩增活性无明显改变；但强烈建议不要在室温下长期放置，用毕放回-20 度。

酶贮存缓冲液

10mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 300mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.5mg/ml BSA and 50% glycerol.

应用举例

1 常规 PCR

以下反应举例为 50 μ l 标准 PCR 体系，仅供参考。实际 PCR 条件应根据模板、引物、目的片段大小加以优化，确定最佳反应条件。

PCR 组份	体积/ μ l	终浓度
10 \times Trt PCR Buffer	5	1 \times
dNTPs (2.0 mM)	5	0.2 mM
引物 F (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
引物R (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
DNA Template	Variable*	/
Trt (2.5U/ μ l)	1.0	2.5U
ddH ₂ O	Variable	/
总体积	50	/

*DNA template 可参照如下标准 (50 μ l PCR 体系) :

- 人类基因组 DNA 0.1 μ g-1 μ g
- λ DNA 0.5 ng-5 ng
- 质粒 DNA 0.01 ng-1 ng
- 大肠杆菌 DNA 10 ng-100 ng

常规 PCR 反应条件

95 $^{\circ}$ C	5 min	} 30 Cycles
95 $^{\circ}$ C	15 sec	
55~72 $^{\circ}$ C	20 sec	
72 $^{\circ}$ C	1-2kb/min	
72 $^{\circ}$ C	3 min	

2 RT-PCR

以下反应举例为 50 μ l 标准 RT-PCR 体系，仅供参考。实际 RT-PCR 条件应根据 RNA 模板、引物、目的片段大小加以优化，确定最佳反应条件。

RT-PCR 组份	体积/ μ l	终浓度
5 \times Trt RT-PCR Buffer	10	1 \times
dNTPs (2.0 mM)	5	0.2 mM
引物 F (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
引物R (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
RNA Template	Variable*	/
Trt (2.5U/ μ l)	1.0	2.5U
ddH ₂ O (DEPC 处理)	Variable	/
总体积	50	/

RT-PCR 反应条件

80 $^{\circ}$ C	2 min	} 30 Cycles
55 $^{\circ}$ C	10 min	
95 $^{\circ}$ C	5 min	
95 $^{\circ}$ C	30 sec	
55~72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	1kb/min	
72 $^{\circ}$ C	3 min	

注意事项

- Trt DNA 聚合酶具有脱氧核苷酸转移酶活性，因此在 PCR 产物 3' 末端通常会加上 1 个多余的腺嘌呤。
- 建议在冰上配置 PCR 反应液后，再放入 PCR 仪中进行扩增。这有利于提高扩增的特异性，减少非特异性扩增，得到良好的 PCR 结果。
- 如进行 PCR 扩增后，除目的条带外，还伴随其他杂带，建议适当减少体系中的酶用量，以增加 PCR 扩增反应的特异性。
- 本公司 10 \times PCR Buffer 经大量 PCR 反应实例优化而成，然而对某些 PCR 反应存在一个最优的镁离子浓度。若需要优化镁离子浓度，请购买本公司不含镁离子的 buffer 和 MgCl₂/MgSO₄。
- 反转录酶活性需要 MnCl₂ 才能够高效合成 cDNA，本公司 5 \times RT-PCR Buffer 经大量 RT-PCR 反应实例优化而成，然而对某些 RT 反应存在一个最优的锰离子浓度。若需要优化锰离子浓度，请购买本公司不含锰离子的 5 \times RT-PCR buffer 和 MnCl₂/MnSO₄。

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。