

## 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 Mn<sup>2+</sup>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）。本规格包装专门配备了含锰离子的反转录buffer体系。不过*Trt* DNA聚合酶的反转录酶活性明显低于MMLV-RT，需要的RNA拷贝数较高，检测灵敏度低于MMV-RT。本公司有较传统MMLV-RT热稳定性显著提高的MMLV-RT2.0版本，可以在50-60度进行反转录反应。

## 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:** 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；
- 扩增能力强，延伸速度快，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；
- 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	AE0301A/ AE0302A*	AE0301B/ AE0302B*	AE0301C/ AE0302C*	AE0301D/ AE0302D*
<i>Trt</i> DNA polymerase	250U	250U×5	1250U×4	2500U×5
10× <i>Trt</i> PCR Buffer	0.5 ml×1	1.0 ml×3	5.0 ml×2	5.0 ml×5
5× <i>Trt</i> RT-PCR Buffer <sup>#</sup>	0.5 ml×1	1.0 ml×3	5.0 ml×2	5.0 ml×5
2 mM dNTPs	-/0.5 ml×1	-/1.0 ml×3	-/5.0 ml×2	-/5.0 ml×5

\*附带 2mM dNTP 混合物。

<sup>#</sup>RT-PCR buffer 专门为 RT-PCR 配制，实验需使用 DEPC 处理 ddH<sub>2</sub>O 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。

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  $\mu$ 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/ $\mu$ l	终浓度
10 $\times$ Trt PCR Buffer	5	1 $\times$
dNTPs (2.0 mM)	5	0.2 mM
引物 F (10 $\mu$ M)	1.5	0.3 $\mu$ M
引物R (10 $\mu$ M)	1.5	0.3 $\mu$ M
DNA Template	Variable*	/
Trt (5U/ $\mu$ l)	0.5	2.5U
ddH <sub>2</sub> O	Variable	/
总体积	50	/

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

- 人类基因组 DNA 0.1  $\mu$ g-1  $\mu$ g
- $\lambda$ 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	
95 $^{\circ}$ C	15 sec	
55~72 $^{\circ}$ C	20 sec	30 Cycles
72 $^{\circ}$ C	1-2kb/min	
72 $^{\circ}$ C	3 min	

## 2 RT-PCR

以下反应举例为 50  $\mu$ 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/ $\mu$ 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 $\mu$ M)	1.5	0.3 $\mu$ M
引物R (10 $\mu$ M)	1.5	0.3 $\mu$ M
RNA Template	Variable*	/
Trt (5U/ $\mu$ l)	1.5	7.5U
ddH <sub>2</sub> O (DEPC 处理)	Variable	/
总体积	50	/

### RT-PCR 反应条件

80 $^{\circ}$ C	2 min	
55 $^{\circ}$ C	10 min	
95 $^{\circ}$ C	5 min	
95 $^{\circ}$ C	30 sec	
55~72 $^{\circ}$ C	30 sec	30 Cycles
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 MgCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>。
- 反转录酶活性需要 MnCl<sub>2</sub> 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 MnCl<sub>2</sub>/MnSO<sub>4</sub>。

**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。