

Code No. R040A

研究用

TaKaRa

PrimeSTAR[®] HS
(Premix)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 特 点	1
● PCR 反应液组成	3
● PCR 反应条件	3
● 参数优化	3
● 扩增产物的电泳、克隆及测序	4
● Troubleshooting	4
● 关联产品	5

● 制品说明

本制品是PCR反应用的2倍浓度的Premix制品，内含DNA Polymerase、Buffer、dNTP Mixture等。其中，DNA Polymerase使用了Takara Bio特别开发的兼具高保真性和高扩增效率的PrimeSTAR HS DNA聚合酶。使用本制品可快速配制反应液，减少了PCR操作过程中的污染，也适用于高通量扩增。PrimeSTAR HS DNA聚合酶具有很强的3'→5' Exonuclease活性，显示出很强的校正功能，同时还具有优于 *Taq* DNA Polymerase的高扩增效率。本酶是Hot Start型PCR扩增用DNA聚合酶，可有效防止PCR反应前的引物错配和引物降解。PrimeSTAR HS DNA聚合酶与Takara最适反应Buffer结合使用，可以实现对广泛靶序列的高保真性、高特异性、高成功率的扩增，对于cDNA克隆等要求高保真的PCR反应能够发挥强大的威力。

● 制品内容 (100 次量, 50 μl 反应体系)

PrimeSTAR HS (Premix)	500 μl × 5
组成	
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	1.25 U/25 μl
dNTP Mixture	2 × conc.; 各 0.4 mM
PrimeSTAR Buffer	2 × conc.; 2 mM Mg ²⁺

● 保存:

长期保存请置于-20°C。4°C可保存3个月。

注：使用频率高时，存放在4°C，反复冻融会降低酶活性。在使用前请轻轻混匀并离心。

● 特点

A. 保真性

通过分析大量序列数据可探知PrimeSTAR HS的突变频率。

【方法】

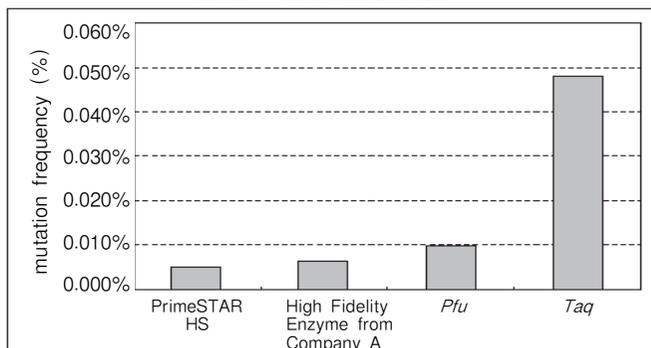
以 *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA为模板，任选8个富含CG的区域（各扩增约500 bp片段）。使用PrimeSTAR HS及其他高保真酶进行PCR扩增后，将各自PCR产物克隆到质粒载体中。并对每种序列挑取复数克隆进行序列分析。

【结果】

使用PrimeSTAR HS扩增的DNA片段序列，249,941个数据中只有12个数据显示错配。其保真性是 *Taq* DNA Polymerase的10倍，并且高于Company A的高保真酶。

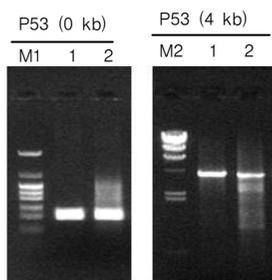
以上方法是研究突变频率的最有效方法。基于以上序列分析结果，对于要求高保真性的PCR扩增，建议使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase。

与竞争产品的保真性比较



B. Priming效率高, 退火时间短

PrimeSTAR HS DNA Polymerase有很高的Priming效率。因此, 5-15 sec.的较短退火时间即可实现高特异性扩增。



1: 55°C退火5 sec.
 2: 55°C退火30 sec.
 M1: pHY Marker
 M2: λ -Hind III digest
 模板: Human genomic DNA 100 ng
 50 μ l PCR反应体系
 3 step PCR Method, 30 cycles

C. 以人类基因组DNA为模板扩增

以人基因组DNA和*E.coli*基因组DNA为模板可扩增不同长度的DNA片段。

模板: 人基因组DNA [50 ng/50 μ l PCR反应体系]

PCR仪: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™

PCR条件:

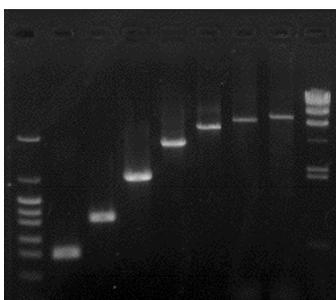
【0.5~6 kb时进行3 Step PCR】

98°C 10 sec. }
 60°C 5 sec. } 30 Cycles
 72°C 1 min./kb }

【7.5~8.5 kb时进行2 Step PCR】

98°C 10 sec. }
 68°C 8 min. } 30 Cycles

M1 1 2 3 4 5 6 7 M2



M1 : pHY Marker

1 : 0.5 kb

2 : 1 kb

3 : 2 kb

4 : 4 kb

5 : 6 kb

6 : 7.5 kb

7 : 8.5 kb

M2 : λ -Hind III digest

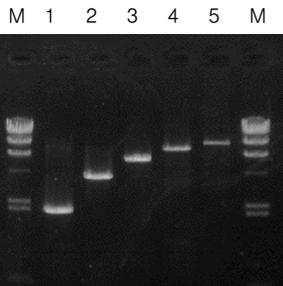
模板: 大肠杆菌基因组DNA 100 pg (50 μ l反应体系)。

PCR仪: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice

PCR条件:

3 Step PCR

98°C 10 sec. }
 60°C 5 sec. } 30 Cycles
 72°C 1 min./kb }



M : λ -Hind III digest

1 : 2 kb

2 : 4 kb

3 : 6 kb

4 : 8 kb

5 : 10 kb

● PCR反应液组成 (50 μl体系)

	使用量	终浓度
PrimeSTAR HS (Premix)	25 μl	1 ×
Primer 1	10–15 pmol	0.2 – 0.3 μM
Primer 2	10–15 pmol	0.2 – 0.3 μM
Template	<200 ng	
灭菌水	up to 50 μl	
Total	50 μl	

● PCR反应条件

① 3 Step 法

98°C	10 sec.	} 30 cycles
55°C	5 sec.或 15 sec.	
72°C	1 min./kb	

② 2 Step 法

98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	1 min./kb	

Takara Bio推荐使用PrimeSTAR HS (Premix)时, 首先尝试3 step PCR反应。

1) 变性条件

设定98°C 5–10 sec.。另外, 设定较低的变性温度 (94°C), 必须设定变性时间10–15 sec.。

2) 退火温度

首先尝试55°C (可能需要优化)。

3) 退火时间

退火时间取决于引物的 T_m 值。使用以下公式*计算 T_m 值。当 $T_m \geq 55^\circ\text{C}$ 时, 设定为5 sec.。当 $T_m < 55^\circ\text{C}$ 时, 设定为15 sec.。

*: T_m 值 ($^\circ\text{C}$) = 2 (A、T数) + 4 (G、C数) - 5, 该公式适用于长度 ≤ 25 mer的引物。长于25 mer的引物设定退火时间为5 sec.。

【注意】

1. 由于本酶退火效率高, 只需设定5 sec.或15 sec.。退火时间过长可能导致PCR产物弥散。
2. 当采用3 step PCR或 T_m 值 $\geq 70^\circ\text{C}$ 的引物产生电泳弥散的PCR产物时, 可尝试2 step PCR。请参考“参数设定”和“Troubleshooting”调整PCR条件。

● 参数优化

为了发挥PrimeSTAR HS DNA Polymerase的优良性能、获得良好的PCR扩增结果, 需要设定最适反应参数。

1) 模板DNA量

推荐模板DNA量 (50 μl PCR反应体系)

人基因组DNA : 5 ng – 200 ng (<200 ng)

大肠杆菌基因组DNA : 100 pg – 100 ng

cDNA library : 1 ng – 200 ng

λ DNA : 10 pg – 10 ng

质粒DNA : 10 pg – 1 ng

避免使用过量模板DNA, 过量模板可能会导致酶反应性能下降。

经亚硫酸氢盐处理后的含有尿嘧啶的DNA为模板时, 不能使用本制品。

2) 引物和PCR条件

可以使用市售的引物设计软件，如OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights) 来选择合适的引物序列。

引物设计准则：a) 引物长度：对于一般DNA片段的扩增可用20–25 mer。适合的PCR条件可参阅“PCR反应条件”。

b) 修饰碱基：使用PrimeSTAR HS (Premix)时，避免使用含有次黄嘌呤核苷碱基 (I) 的引物。

c) 简并引物：简并引物可以与PrimeSTAR HS (Premix)一同使用。

3) 退火条件

根据“PCR反应条件”确定退火条件。当扩增产物收量低时，按以下方法解决：

【产生Smear或杂带】

a) 缩短退火时间。例如，从15 sec.缩短至5 sec.。

b) 如果退火时间已经是5 sec.，则升高退火温度至58~65°C。

c) 尝试2 step PCR。

【没有目的扩增产物】

a) 延长退火时间。例如，从5 sec.增至15 sec.。

b) 降低退火温度至50~53°C。

● 扩增产物的电泳、克隆及测序

1) 扩增产物的电泳

对使用PrimeSTAR HS (Premix) 获得的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，推荐使用TAE Buffer。

NOTE: 使用TBE Buffer时，电泳带会出现弥散现象，不能获得清晰的、良好的电泳结果。

2) 扩增产物末端

使用PrimeSTAR HS (Premix) 获得的PCR扩增产物多数为平滑末端。因此，可直接克隆到平滑末端载体中（如有需要，克隆前进行磷酸化反应），不能直接克隆到T-vectors。克隆到平滑末端载体时，建议使用Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)。

3) 限制性内切酶反应

用限制性内切酶消化PCR产物前，使用酚/氯仿抽提去除反应液中的PrimeSTAR HS (Premix)。特别是使用3' -末端突出的限制酶时（例如*Pst* I等），由于PrimeSTAR HS DNA Polymerase具有3' →5' 外切酶活性，如果该活性残留，在限制酶处理中会将3' -突出末端切掉。

4) 直接测序

由于PrimeSTAR HS DNA Polymerase具有3' →5' 外切酶活性，直接测序前，建议用酚/氯仿抽提等方法除去酶等蛋白质。

● Troubleshooting

1) Q: 无扩增产物或扩增效率低

A: i) 延伸时间：延伸时间>1 min./kb。

ii) 退火时间：15 sec.。

iii) 退火温度：以2°C为梯度降低温度。或者，选择3 step PCR。

iv) 模板DNA加量及纯化：使用合适的模板DNA量，请参考“参数优化”。使用纯度高的模板DNA。

v) 引物浓度：在0.2–0.5 μM范围内调整引物终浓度。

2) Q: 琼脂糖凝胶电泳时出现杂带或Smear

A: i) 退火时间: 5 sec.

ii) 退火温度: 以2°C为梯度升高温度。或者, 选择2 step PCR。

iii) 延伸时间: 1 min./kb。避免延伸时间过长。

iv) 模板DNA: 选择适合的DNA模板添加量; 避免使用过量模板DNA。

v) 循环数: 25~30 cycles。

vi) 引物浓度: 0.2~0.3 μ M (final conc.)范围内选择最适浓度。

● 关联产品

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)

PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B)

PrimeScript[™] High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R022A/B)

PrimeScript[™] II High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R023A/B)

Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)

Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR[®] (Code No. 6019)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice and PrimeScript are trademarks 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。

本文件由宝日生物技术有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考Takara Bio Inc.网站。为正确使用Takara产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201805Da