

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase Ver.2

Code No. R047S

包装量: 625 μ l
(for 25 reactions)

Code No. R047A

包装量: 625 μ l x 4
(for 100 reactions)

制品说明:

PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 是兼具高保真性和高扩增速度的 PCR 用 DNA 聚合酶。制品中通过添加能够快速准确扩增的促进因子, 并优化了反应组分, 在保持 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B) 保真性的同时, 提高了高速反应中目的基因扩增的成功率。PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 是一款完全兼容且优于现有产品的替代品。本制品是添加了在常温下能够抑制 DNA Polymerase 活性和 3' \rightarrow 5' exonuclease 活性的抗体的 Hot Start 型 DNA 聚合酶, 同时反应各组分已经配制成预混型的 2X Premix, 在常温下可快速配制反应液, 可用于高通量分析。

<产品特点>

- 非常高的保真性
- 高速反应 (延伸)
- * 针对模板 DNA 含量较高而难以扩增的反应, 也可以进行高速扩增
- 与现有产品相比, 扩增产量增加
- 方便的预混型试剂, 常温下可以快速配制反应液

保存: -20°C

注意: 使用前避免剧烈混匀, 轻轻颠倒混匀离心后使用。制品中含有酶, 过度反复冻融可能降低酶活性。

扩增产物的电泳、克隆和测序:

1) 电泳

PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 的 PCR 扩增产物进行 Agarose Gel 电泳时, 建议使用 TAE Buffer。使用 TBE Buffer 时, 电泳条带会出现在凝胶底部扩散的现象, 不能获得清晰的、良好的电泳结果。

2) 扩增产物的克隆

PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 的 PCR 扩增产物大多都为平滑末端, 因此可直接 (必要时进行磷酸化反应) 克隆于平滑末端载体中。将 PCR 产物克隆于不带磷的平滑末端载体中时, 请使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027) 对 PCR 产物进行磷酸化处理。T 载体克隆时需要在产物 3' 端加 dA 尾, 推荐使用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Code No. 6019)

此外, 也可以使用 In Fusion 克隆系统。

3) 限制酶处理时

对扩增产物进行限制酶处理时, 先进行苯酚/氯仿抽提或使用 NucleoSpin Gel 和 PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 中的 PCR Clean-up 除去蛋白质。特别是使用 3' 末端突出的限制酶时 (例如 *Pst*I 等), 由于 PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 具有 3' \rightarrow 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) 直接测序时

由于本酶具有 3' \rightarrow 5' 外切酶活性, 直接测序前, 建议先进行苯酚氯仿抽提或使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Code No. 740609.10/.50/.250) 中的 PCR Clean up 除去蛋白质。

PCR 反应液配制 (Total 50 μ l):

PrimeSTAR Max Ver.2 Premix (2X) 25 μ l (终浓度 1X)
Primer 1 10~15 pmol (终浓度 0.2~0.3 μ M)
Primer 2 10~15 pmol (终浓度 0.2~0.3 μ M)
模板 请参考“模板推荐使用量”
灭菌水 Up to 50 μ l

注意: PCR 反应液的配制可在室温下进行, 但在制备过程中, 请将每个反应组分都放置在冰上。

PCR 反应条件:

当使用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 进行快速扩增反应时, 推荐 3 步反应以获得最佳效果。

GC rich 和长片段扩增等需要提高特异性时, 建议进行两步法反应。

98°C*1	10 sec	} 30~35 Cycles
55°C	5 or 15 sec*2	
68°C*3	5~10 sec/kb*4	
or		
98°C*1	10 sec	} 30~35 Cycles
68°C*3	5~10 sec/kb*4	

*1 变性条件

在 98°C 时, 建议设定为 5~10 sec。

在 94°C 时, 建议设定为 10~15 sec。

*2 退火时间

Tm 值为 55°C 以上时, 设定为 5 sec。

Tm 值为 55°C 以下时, 设定为 15 sec。

【重要提示】

由于 PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 的 priming 效率高, 退火时间过长可能导致 PCR 产物电泳时出现 smear 现象。

※ Tm 值的计算方法:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (\text{NA} + \text{NT}) + 4 (\text{NC} + \text{NG}) - 5$$

其中 N 表示 A, T, C 或 G 这 4 种核苷酸分别在引物中的数量。

该公式适用于长度 \leq 25 mer 的引物。25 mer 以上长度的引物设定退火时间为 5 sec。

*3 延伸温度

两步法和三步法 PCR 均设置为 68°C。

*4 延伸时间 (以此为准则)

扩增产物 \leq 6 kb: 5 sec/kb (10 sec/kb for cDNA);

扩增产物 > 6 kb: 10 sec/kb (20 sec/kb for cDNA)

在某些情况下, 延长延伸时间可以提高扩增产量。

*最好利用专业引物设计软件选择适宜的引物序列, 如 OLIGO[™] Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc.)。

*使用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 时, 避免使用含次黄嘌呤核苷碱基 (Inosine) 的引物。

模板推荐用量 (50 μ l 反应体系):

人基因组 DNA	5~500 ng
大肠杆菌基因组 DNA	100 pg~200 ng
质粒 DNA	10 pg~10 ng
cDNA	相当于 10~1,000 ng 总 RNA

*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。

PrimeSTAR is a registered 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.takarabio.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。

本文件由宝日医生物技术 (北京) 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。

v202404Da