

Code No. R044Q

研究用

TaKaRa

PrimeSTAR[®] HS DNA
Polymerase with GC Buffer

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● PCR 反应液组成	1
● PCR 反应条件	2
● 参数优化	2
● 保真性	3
● 实验例	3
● 扩增产物的电泳、克隆及测序	5
● Troubleshooting	5
● 相关产品	6

● 制品说明

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 是一种高保真DNA酶，具有高扩增效率。PrimeSTAR HS DNA Polymerase具有非常强的3' → 5' Exonuclease活性，显示出很好的校正功能，同时还具有优于 *Taq* DNA polymerase的高扩增效率。反应混合物中的单克隆抗体，在变性步骤前抑制DNA聚合酶和3' → 5' Exonuclease活性，可有效防止PCR反应前的引物错配和引物降解。PrimeSTAR的高Priming效率缩短了退火时间，从而缩短了反应总时间。

PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer适用于富含GC片段的保真性扩增。PrimeSTAR HS DNA Polymerase配合GC Buffer使用，除了具备高保真性和高扩增效率的特性外，针对富含GC的模板DNA，也可以获得高特异性扩增的良好结果。

● 制品内容 (100 次量、50 μl 体系)

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) *1	50 μl
2×PrimeSTAR GC Buffer (Mg ²⁺ plus)*2	1.28 ml × 2
dNTP Mixture (2.5 mM each)	400 μl

*1: 【贮存 Buffer】

50 mM	Tris-HCl (pH8.2, 4°C)
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	Tween 20
0.1%	NP-40
50%	Glycerol

【活性定义】

用活性化的大马哈鱼精子 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)。

*2: Mg²⁺浓度为 2 mM (2×)。

● 保 存: -20°C。

● PCR反应液组成 (50 μl体系)

试剂	使用量	终浓度
2×PrimeSTAR GC Buffer (Mg ²⁺ plus)	25 μl	1×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl	200 μM each
Primer 1	10 – 15 pmol	0.2 – 0.3 μM
Primer 2	10 – 15 pmol	0.2 – 0.3 μM
Template DNA	<200 ng	
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl)	0.5 μl	1.25 U/50 μl
灭菌水	up to 50 μl	

*: 可在室温下配制PCR反应液。但是，当配制反应液时，请将各试剂组份置于冰上。

● PCR反应条件

本试剂适用于富含GC的DNA片段的扩增。

2-step PCR可获得最佳结果。但是，如果2-step PCR不能获得足够数量和高质量的产物，建议使用3-step PCR。同时，参考“参数优化”和“Troubleshooting”。

(A) 2-Step PCR

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

(B) 3-Step PCR

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

重要：PrimeSTAR拥有很高的Priming效率。因此，当使用3-step PCR法时，退火时间应为5 sec。更长的退火时间会导致本底过高。

● 参数优化

本试剂适用于富含GC的DNA片段的扩增，同时表现出PrimeSTAR HS DNA Polymerase的高保真性和高效率的特点。优化PCR反应条件可以获得更好的实验结果。

(1) 酶量

为了获得最佳结果，建议每50 μ l体系中加入1.25 U酶。但是，需要根据扩增片段的大小和模板DNA纯度及加量来调整酶量。例如，如果出现弥散条带或非特异性条带，可减少酶量到0.625 U/50 μ l来改善结果。

(2) 模板DNA

推荐模板DNA量（50 μ l反应体系）

人基因组 DNA	5–200 ng
大肠杆菌基因组 DNA	100 pg–100 ng
λ DNA	10 pg–10 ng
质粒 DNA	10 pg–1 ng
cDNA	1–200 ng

NOTE：避免使用过量模板DNA。当使用超过200 ng的模板时，反应效率会降低。含有尿嘧啶的DNA不能作为模板。

(3) dNTP和Mg²⁺浓度

因为dNTP有螯合作用，dNTP浓度高会降低反应液中有有效Mg²⁺浓度。2 $\times$ PrimeSTAR GC Buffer提供的1 mM MgCl₂与200 μ M dNTP相匹配，因此，dNTP浓度不需要调整。

此外，PrimeSTAR HS DNA Polymerase反应液中不能用dUTP代替dTTP。dUTP的使用会大大降低扩增效率。

(4) 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)来获得合适的引物序列。对于一般扩增反应，20–25 mer引物即可获得满意的结果。

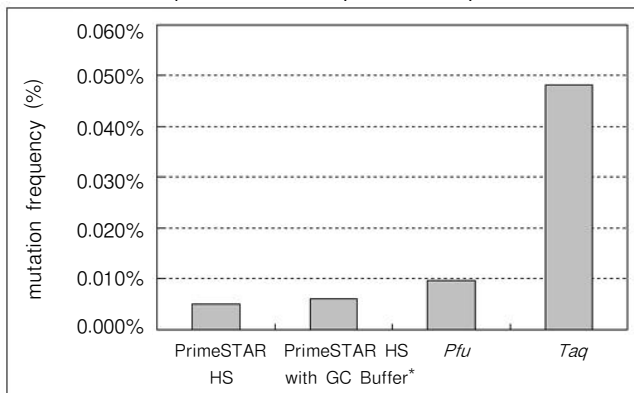
避免将含有inosine的引物与PrimeSTAR HS DNA Polymerase一起使用。但是，简并引物可与此酶同时使用。

● 保真性

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）。PCR扩增后，将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。

本实验中，PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer的保真性比 *Pfu* DNA Polymerase高，和 PrimeSTAR HS DNA Polymerase（使用PrimeSTAR Buffer）相同。序列分析是常用方法中验证酶保真性的准确方法。这些结果表明，在高保真反应中，PrimeSTAR HS with GC Buffer是一种可信赖的酶。

Comparison of Enzyme Fidelity

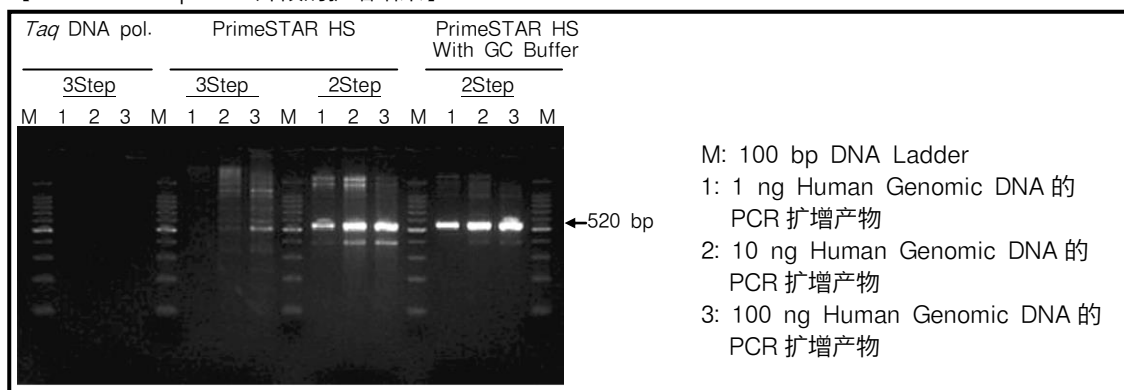


*: 使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer扩增，304,110个碱基中只有25个碱基错配。

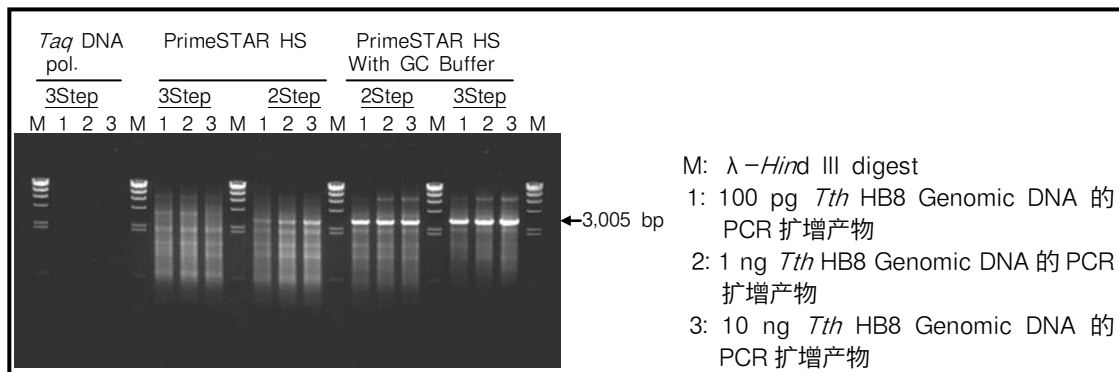
● 实验例

比较1：使用 *Taq* DNA Polymerase、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer，分别扩增了Human *APOE*基因（520 bp，GC含量74.8%）和 *Tth* HB8基因（3,005 bp，GC含量73.2%），按推荐的反应体系和反应条件操作。

【*APOE* 520 bp DNA片段的扩增结果】



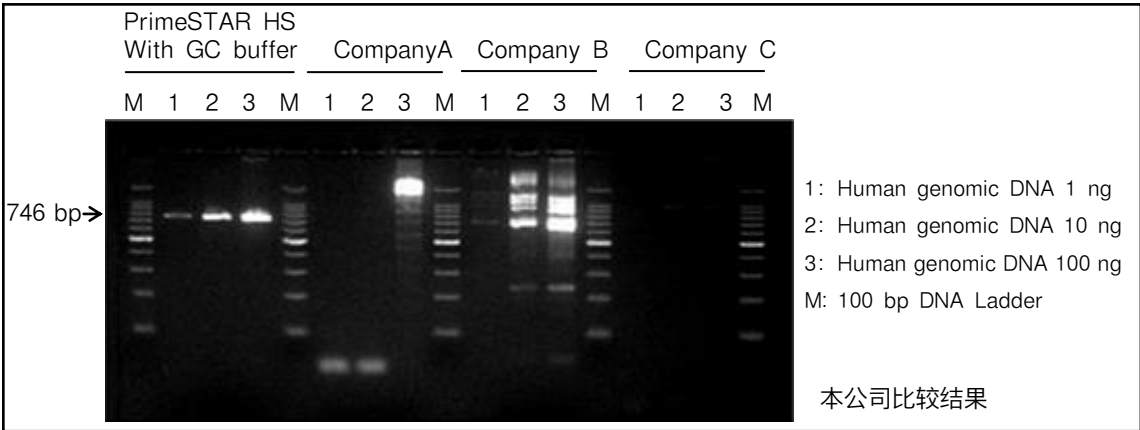
【*Tth* HB8 3,005 bp DNA片段的扩增结果】



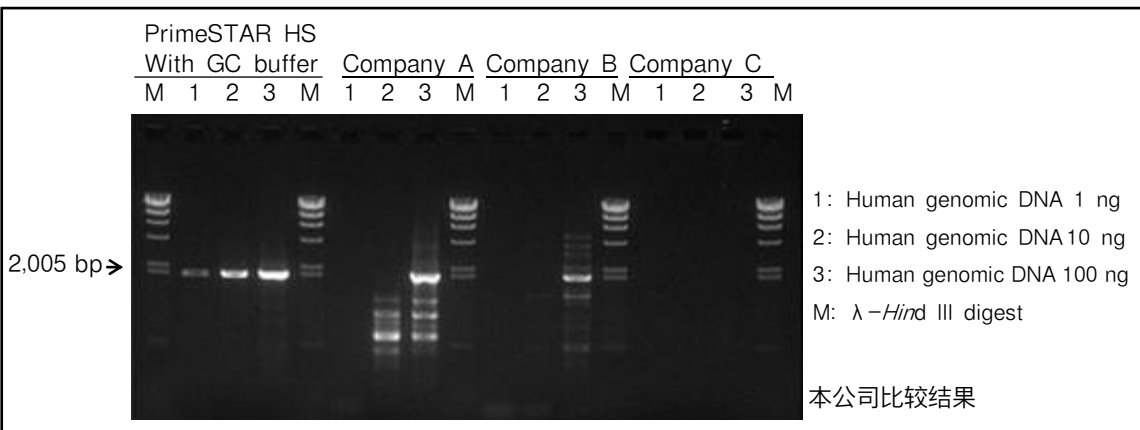
与其他酶相比 PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer 能很好地扩增富含 GC 的片段。

比较2： 比较Company A、 Company B、 Company C和PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer 的高保真酶活性， 以Human *APOE* (746 bp; GC含量73.9%), *TGF β1* (2,005 bp; GC含量68.8%), and *Tth* HB8 (3,005 bp, GC含量73.2)为目的片段。 每种酶使用其各自公司推荐的反应液和PCR 条件。

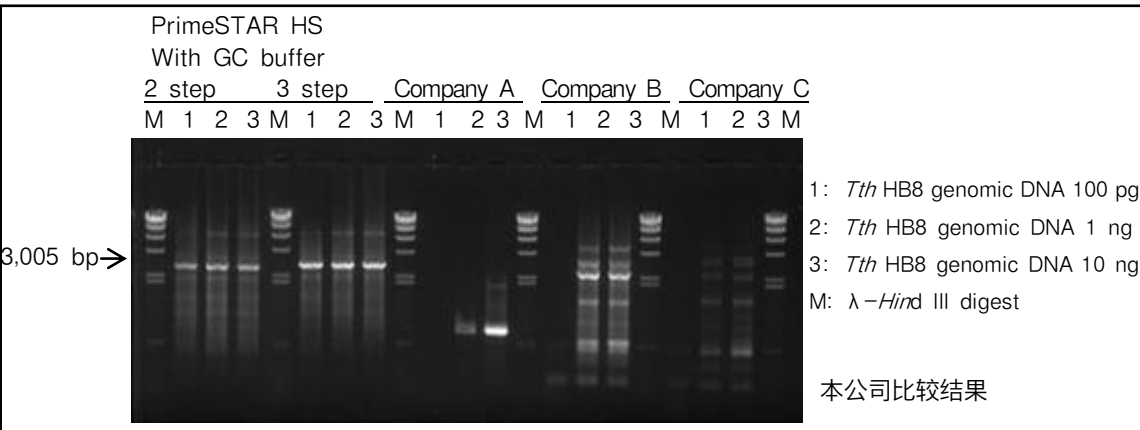
【 Human *APOE* gene 746 bp】

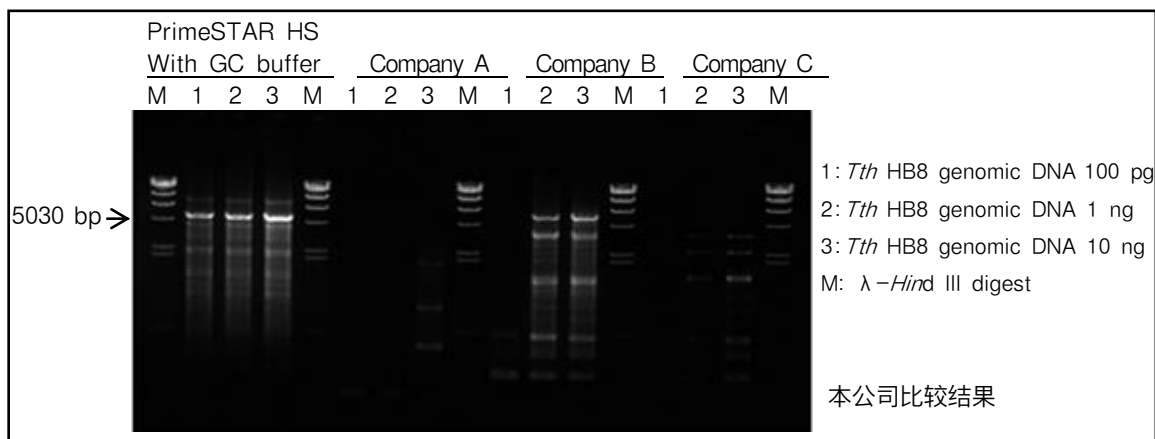


【 Human *TGF β1* gene 2,005 bp】



【 *Tth* HB8 3,005 bp和5,030 bp】





以上结果表明，与其他GC-rich高保真酶相比，PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer能提供更好的扩增效率和更高的特异性。

* 参照 “Troubleshooting”

● 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 DNA Polymerase with GC Buffer获得的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，推荐使用TAE Buffer。TBE Buffer的使用可能导致DNA条带在凝胶底部形成。

2) 克隆

多数使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer获得的PCR扩增产物有平滑末端。因此，它们可直接克隆到平滑末端载体(如有需要，克隆前磷酸化处理)。克隆到平滑末端载体，建议使用Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)。克隆到T载体时，需要在PCR产物的3'末端附加dA碱基。建议使用Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Code No. 6019)。

3) 限制性内切酶反应

用限制性内切酶消化PCR产物前，使用苯酚/氯仿抽提或NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等除去蛋白质。特别是使用3'-末端突出的限制酶时(例如*Pst* I等)，由于PrimeSTAR 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，建议用苯酚/氯仿抽提或NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等除去蛋白质。

● Troubleshooting

Q: 无扩增产物或扩增效率低

(1) 模板DNA量及纯度

→使用适量的模板DNA

→提高DNA纯度

(2) 退火/延伸温度

→以2°C为梯度降低温度

→使用3-step PCR

(3) 引物浓度

→在0.2–0.5 μ M范围内调整引物终浓度

(4) 退火时间

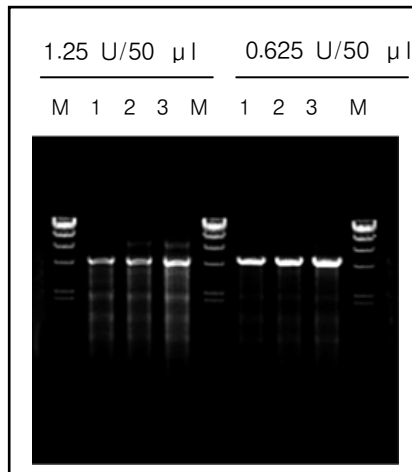
→3-step PCR中设定退火时间为15 sec.

Q: 出现杂带或Smear

(1) 酶量

→减少酶量到0.625 U/50 μ l

【*Tth* HB8 5,030 bp】



(2) 模板DNA量

→使用适量的模板DNA，避免模板DNA过量

(3) 退火/延伸温度

→以2°C为梯度升高温度

(4) 引物浓度

→在0.2–0.3 μ M范围内调整引物终浓度

(5) 循环数

→设为25–30 cycles

● 相关产品

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

PrimeSTAR[®] HS (Premix) (Code No. R040A)

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

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

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。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

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

v201909Da