

PrimeSTAR® GXL Premix

Code No. R051S

包装量: 1 ml
(for 40 PCR reactions)

制品说明

本制品是由PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio研发的高保真酶)、反应缓冲液和dNTP Mixture组成的优化的2X预混型试剂。本制品是适用于扩增反应困难的高保真酶,包括长片段、GC-rich区域和过量模板。本制品可以高保真扩增30 kb以上大片段;对于难以扩增的高GC含量模板,也不需要设定特别反应条件就可获得扩增产物。

保存

-20°C (长期保存)。4°C可保存三个月。
使用频率高时,请于4°C保存,尽量避免多次反复冻融,以免降低酶活性。
使用时请轻柔颠倒混匀,瞬时离心。

PCR反应液组成 (共50 μl)

PrimeSTAR GXL Premix (2X)	25 μl(终浓度 1X)
引物 1	10-15 pmol(终浓度 0.2-0.3 μM)*
引物 2	10-15 pmol(终浓度 0.2-0.3 μM)*
Template	请参考右侧 (2) 模板
灭菌水	up to 50 μl

* 当扩增产物在10 kb以上时,引物的终浓度为0.2 μM。

PCR反应条件

【扩增产物≤10 kb时】

98°C	10 sec	} 30 cycles
55 or 60°C*1	15 sec	
68°C*2	1 min/kb	
or		
98°C	10 sec	} 30 cycles
68°C	1 min/kb	

*1 Tm值为55°C以上时,退火温度设定为60°C。

Tm值为55°C或以下时,退火温度设定为55°C。

$Tm \text{ 值 } (^{\circ}\text{C}) = [(A, T \text{ 总数}) \times 2] + [(C, G \text{ 总数}) \times 4] - 5$

*2 进行3-step PCR反应时,将延伸温度设定为68°C。

【扩增产物为10 kb-30 kb时】

98°C	10 sec	} 30 cycles
68°C	10 min	

【扩增产物≥30 kb时】

98°C	10 sec	} 30 cycles
68°C	15 min	

PCR反应条件的选择。

- 扩增产物在10 kb以下时,请先尝试3-step PCR。
- 扩增产物在10 kb以上或GC rich模板时,推荐使用2-step PCR,可提高反应特异性。

参数优化

为了发挥 PrimeSTAR GXL Premix 的最大性能、获得良好的 PCR 扩增结果,有必要按照适宜参数进行设定。

(1) Primer 的设计

引物最好利用专业引物设计软件进行设计。

【扩增产物≤10 kb时】

一般引物长度为 20-25 mer 即可获得良好的扩增,当引物的 Tm 值在 55°C以上,或引物长度在 25 mer 以上,可进一步提高 PCR 反应的成功率。

【扩增产物>10 kb时】

建议引物 Tm 值在 65°C以上,引物长度为 25-35 mer,设计引物时 3' 端的 GC 含量不要过高。

【靶基因 GC rich 时】

建议引物的 Tm 值在 60°C以上。

Note: 使用 PrimeSTAR GXL Premix 时,避免使用含次黄嘌呤核苷碱基 (Inosine) 的引物。

(2) 模板

建议使用的模板量如下(50 μl 反应体系):

		(扩增大片段时)
人基因组 DNA	5 ng~500 ng	(100 ng~500 ng)
大肠杆菌基因组 DNA	100 pg~200 ng	(10 ng~200 ng)
Plasmid DNA	10 pg~10 ng	(1 ng~10 ng)
cDNA	25 ng~750 ng	(250 ng~750 ng)

Note: 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。

扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

使用PrimeSTAR GXL Premix扩增的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳时,建议使用TAE Buffer。

Note: 使用TBE Buffer会导致电泳带在凝胶底部扩散,不能获得清晰的、良好的电泳结果。

扩增产物的克隆

使用 PrimeSTAR GXL Premix 扩增的 PCR 产物大部分都为平滑末端,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。将 PCR 产物克隆于 T 载体时,请使用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR(Code No. 6019)进行加 A 处理。

限制酶处理时

对扩增产物进行限制酶处理时,先进行苯酚/氯仿处理或使用 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 GXL Premix 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。

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.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。

v201903Da