Code No. RR070A

研究用

TaKaRa

SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase

说明书

v201908Da

目　　录

内　容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保　　存	1
● 附带缓冲液	1
● PCR 反应液配制	1
● PCR 反应条件	1
● 优化参数设定	2
● 实验例	2
● 扩增产物	5
● Troubleshooting	5

● 制品说明

SpeedSTAR HS DNA Polymerase 是用于快速 PCR 扩增的 Hot Start 型 DNA 聚合酶，与附带的 Fast Buffer Ⅰ或 Fast Buffer Ⅱ组合使用。普通 PCR 酶延伸一般设定为 1 min/kb，而使用 SpeedSTAR HS DNA Polymerase 延伸可设定为 10 sec/kb，实现短时间内的 PCR 扩增。因此，使用该酶可以缩短总反应时间。此外，本酶使用了 Hot Start 型 DNA 聚合酶，能够有效抑制由于引物错配或引物二聚体形成导致的非特异性 PCR 扩增。由于单克隆抗体在 PCR 反应最初的 DNA 变性步骤已变性，因此该酶可直接在常规 PCR 反应条件下使用。

● 制品内容（200 次量，50 μl 反应体系）

SpeedSTAR HS DNA Polymerase (5 U/μl) *1	50 μl
10×Fast Buffer Ⅰ (Mg^{2+} plus) *2	1 ml
10×Fast Buffer Ⅱ (Mg^{2+} plus) *2	1 ml
dNTP Mixture (ea. 2.5 mM)	800 μl

*1：【Storage Buffer】

20 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM	KCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.5%	Tween 20
0.5%	NP-40
50%	Glycerol

【活性定义】

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 为底物，在 74℃，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：Mg^{2+}浓度：10×Fast Buffer Ⅰ，30 mM；10×Fast Buffer Ⅱ，20 mM

● 保　存：　-20℃

● 附带缓冲液

本酶附带两种 Fast Buffer，可根据扩增的目的片段大小选择合适的 buffer。扩增 2 kb 以内片段时，可使用 Fast Buffer Ⅰ；扩增 2-4 kb 片段时，可使用 Fast Buffer Ⅰ或 Ⅱ；扩增 4 kb 以上片段时，可使用 Fast Buffer Ⅱ。使用 Fast Buffer Ⅰ扩增长片段或使用 Fast Buffer Ⅱ扩增短片段可能导致扩增效率降低。

● PCR 反应液配制

试剂	使用量	终浓度
SpeedSTAR HS DNA Polymerase (5 U/μl)	0.25 μl	1.25 U/50 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl	200 μM
Primer 1	10-50 pmol	0.2 μM-1 μM
Primer 2	10-50 pmol	0.2 μM-1 μM
Template	<500 ng	
10×Fast Buffer Ⅰ或 Ⅱ	5 μl	1×
灭菌水	Up to 50 μl	

*：反应液可在室温下配制。配制反应液时，所使用的试剂请于冰上放置。

● PCR 反应条件

本酶适用于 2 Step 或 3 Step PCR 反应条件。若想进行快速 PCR，推荐 2 Step PCR 反应；若想使用较短引物得到更好结果，可进行 3 Step PCR 反应。对于长片段扩增，通常建议延长延伸时间。某些情况下，使用 SpeedSTAR 扩增长片段可能产生 smear 条带。

【2 Step PCR】

– 扩增4～6 kb以下的DNA片段时（使用Fast Buffer Ⅰ or Ⅱ都可以）

95℃	5 sec	30 cycles
65℃	10(～20) sec/kb	

– 扩增6 kb以上的DNA片段时（请使用Fast Buffer Ⅱ）

95℃	5 sec	30 cycles
68℃	10(～20) sec/kb	

*：根据扩增片段大小，优化每步的反应温度来实现有效扩增。

【3 Step PCR】（使用Fast Buffer Ⅰ or Ⅱ都可以）

98℃	5 sec	30 cycles
55℃	10–15 sec	
72℃	5–10 sec/kb	

*：变性条件根据使用的PCR仪型号和反应管种类进行设定，98℃时设定为8～10 sec、95℃时设定为20～30 sec。

● 优化参数设定

为了发挥 SpeedSTAR HS DNA Polymerase 的优良性能、获得良好的 PCR 扩增结果，需要设定适宜的反应参数。

1）酶量：

通常建议 50 μl PCR 使用 1.25 U，可根据模板量或扩增片段大小适当调整加量。酶量过多可能导致非特异性扩增或 smear。酶量过少可能降低扩增效率。

2）模板 DNA 量：

模板过量可能导致非特异性扩增或 smear。50 μl PCR 反应体系中模板 DNA 推荐使用量如下：

–人基因组 DNA 5–500 ng
–大肠杆菌基因组 DNA 50 pg–100 ng
–质粒 DNA 10 pg–1 ng

3）dNTP 和 Mg^{2+}：

附带的 Fast Buffer Ⅰ中 Mg^{2+}终浓度为 3 mM，Fast Buffer Ⅱ中 Mg^{2+}终浓度为 2 mM。反应液中 dNTP 终浓度为 200 μM each 时，可达到理想反应效果。

4）引物：

建议使用专业引物设计软件选择合适的引物序列，如 OLIGO Primer Analysis Software：Molecular Biology Insights。

– 引物长度

一般引物长度为 20–25 mer 即可获得良好的扩增。当扩增大片段 DNA 时，使用的引物为 25～30 mer 可获得良好的扩增。

– GC 含量

GC 含量应在 40–60%之间。GC 碱基分布均匀，3’端避免 GC rich。

– Tm 值

上下游引物 Tm 值应相同。

– 引物浓度

引物浓度可设为 0.2–1.0 μM 之间。引物浓度过低时可能导致扩增产物少。引物浓度过高会抑制特异性扩增，可能导致非特异性扩增。

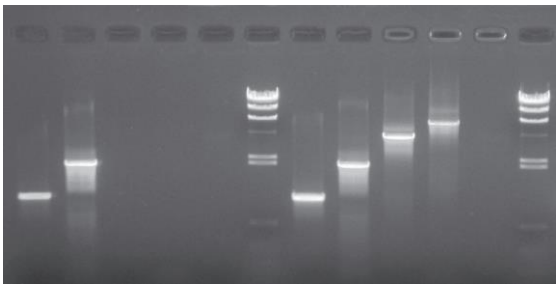
● 实验例

【快速 PCR】

SpeedSTAR 和 *TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version 间扩增片段大小比较：

比较以上两种酶扩增片段大小，采用 2 step PCR，延伸时间为 45 sec。该条件下，SpeedSTAR HS 可扩增 6 kb 片段，*TaKaRa Ex Taq* HS 可扩增 2 kb 片段。*

**TaKaRa Ex Taq* HS 在其最适条件下可以扩增 6 kb 片段。



模板：大肠杆菌基因组DNA

50 ng/50 μl

扩增片段大小：

1. 1 kb
2. 2 kb
3. 4 kb
4. 6 kb
5. 8 kb

PCR 扩增条件：

94℃ 1 min

↓

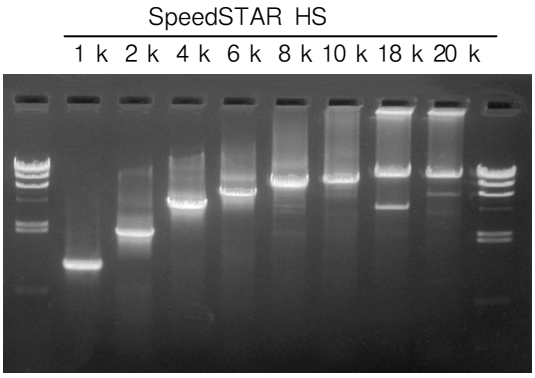
95℃ 5 sec

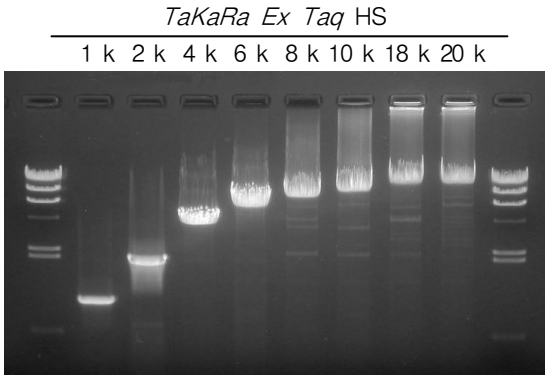
68℃ 45 sec

30 cycles

【高效】

SpeedSTAR 和 *TaKaRa Ex Taq* HS 扩增不同片段大小时的反应时间比较：





PCR 反应条件

◆ 扩增 1 kb 和 2 kb 片段（使用 Fast Buffer Ⅰ）

94℃ 1 min

↓

95℃ 5 sec
65℃ 20 sec] 30 cycles

反应总时间：约 33 min

◆ 扩增 1 kb 和 2 kb 片段

94℃ 1 min

↓

98℃ 10 sec
68℃ 2 min] 30 cycles

反应总时间：约 96 min

◆ 扩增 4 kb 和 6 kb 片段（使用 Fast Buffer Ⅱ）

94℃ 1 min

↓

95℃ 5 sec
65℃ 60 sec] 30 cycles

反应总时间：约 53 min

◆ 扩增 4 kb 和 6 kb 片段

94℃ 1 min

↓

98℃ 10 sec
68℃ 6 min] 30 cycles

↓

72℃ 10 min

反应总时间：约 3 hrs 46 min

◆ 扩增 8 kb 和 10 kb 片段（使用 Fast Buffer Ⅱ）

94℃ 1 min

↓

98℃ 5 sec
68℃ 2 min] 30 cycles

反应总时间：约 83 min

◆ 扩增 8 kb 和 10 kb 片段（使用 Fast Buffer Ⅱ）

94℃ 1 min

↓

98℃ 10 sec
68℃ 10 min] 30 cycles

↓

72℃ 10 min

反应总时间：约 5 hrs 83 min

◆ 扩增 18 kb 和 20 kb 片段（使用 Fast Buffer Ⅱ）

94℃ 1 min

↓

98℃ 5 sec
68℃ 5 min] 35 cycles

↓

72℃ 5 min

反应总时间：约 3 hrs 29 min

◆ 扩增 18 kb 和 20 kb 片段（使用 Fast Buffer Ⅱ）

94℃ 1 min

↓

98℃ 10 sec
68℃ 15 min] 30 cycles

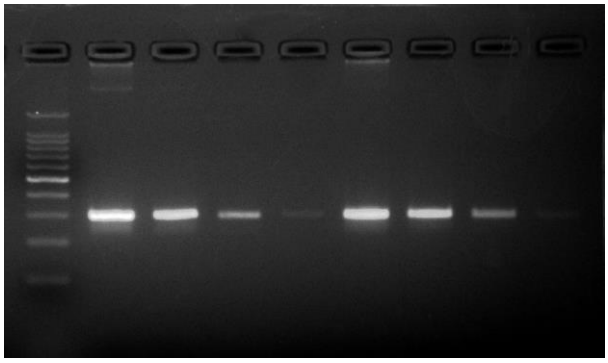
↓

72℃ 10 min

反应总时间：约 8 hrs 16 min

【高灵敏度高效快速 PCR】

SpeedSTAR 和 *TaKaRa Ex Taq* HS 扩增不同片段大小时的检测灵敏度比较:



扩增片段大小 : 300 bp
模板 : 人基因组DNA
1 : 100 ng/50 μl PCR
2 : 10 ng/50 μl PCR
3 : 1 ng/50 μl PCR
4 : 0.1 ng/50 μl PCR

PCR 反应条件

TaKaRa Ex Taq HS

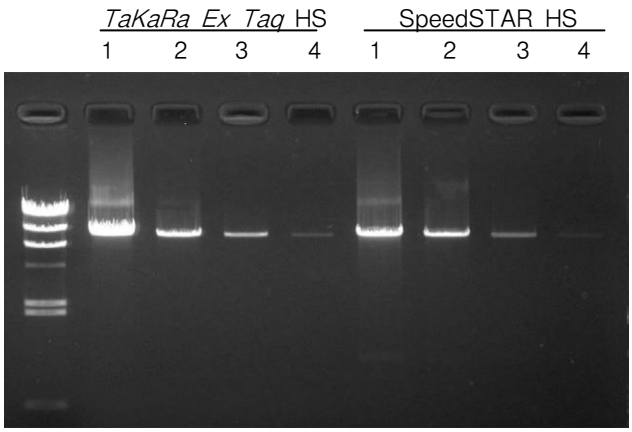
98℃ 5 sec
55℃ 30 sec
72℃ 30 sec
30 cycles

反应总时间: 约 67 min

SpeedSTAR HS (使用 Fast Buffer I)

98℃ 5 sec
55℃ 10 sec
72℃ 5 sec
30 cycles

反应总时间: 约 39 min



扩增片段大小 : 8.5 kb
模板 : 人基因组DNA
1 : 100 ng/50 μl PCR
2 : 10 ng/50 μl PCR
3 : 1 ng/50 μl PCR
4 : 0.1 ng/50 μl PCR

PCR 反应条件

TaKaRa Ex Taq HS

94℃ 1 min
↓
98℃ 5 sec
68℃ 8.5 min
30 cycles
↓
72℃ 10 min

反应总时间: 约 4 hrs 59 min

SpeedSTAR HS (使用 Fast Buffer II)

94℃ 1 min
↓
98℃ 5 sec
68℃ 2 min
35 cycles
↓
72℃ 3 min

反应总时间: 约 1 hr 40 min

● 扩增产物

大多数使用 SpeedSTAR HS DNA Polymerase 得到的 PCR 扩增产物 3’端有一个“A”碱基，可以直接克隆于 T-vector 中。扩增产物经末端平滑化和磷酸化后也可克隆于平滑末端载体中。

● Troubleshooting

问题 1：无扩增产物或扩增效率低

对策：1）延伸时间：设定延伸时间为 20 sec/kb。

2）退火温度：以 2℃间隔降低退火温度；使用 3 step PCR。

3）模板 DNA：重新纯化模板 DNA。扩增长片段时，尽量使用完整的、没有断裂的 DNA。

4）引物：重新设计引物。增加引物加量。

问题 2：出现多余条带或 smear

对策：1）延伸时间：延伸时间过长影响 PCR 反应。

参考以下原则设定延伸时间：2 step PCR：10 – 20 sec/kb；

3 step PCR：5 – 10 sec/kb。

2）退火温度：以 2℃间隔升高退火温度；使用 2 step PCR。

3）模板 DNA：使用适量 DNA。模板量过多影响 PCR 反应。

4）引物：减少引物加量。

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.
SpeedSTAR is a 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

v201908Da