

Code No. R045A

研究用

Takara

PrimeSTAR[®] Max
DNA Polymerase

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● PCR 反应液的配制	1
● PCR 反应条件	1
● 参数优化	2
● PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的特点	3
● 扩增产物的 Agarose Gel 电泳、克隆和测序	7
● Troubleshooting	8
● 关联产品	8

● 制品说明

PrimeSTAR Max DNA Polymerase 不仅兼备了 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 所具有的高扩增效率、高灵敏度和高特异性功能，还是延伸速度很快、保真性能很高的 PCR 用 DNA 聚合酶。制品本身具有的高退火效率和特别开发的延伸因子使引物的退火时间和延伸时间大幅缩短，实现了 PCR 反应的高速化。同时，针对由于核酸含量较高而难以扩增的反应体系，也只需正常设定延伸时间即可进行扩增，大大简化了操作过程。本制品是添加了在常温下能够抑制 DNA Polymerase 活性和 3' → 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，在常温下可以快速配制反应液。

● 制品内容 (100 次量)

PrimeSTAR Max Premix (2X)	625 μl × 4
---------------------------	------------

* Mg²⁺ 浓度为 2 mM (2X)，dNTP 浓度是各 0.4 mM (2X)。

● 保存: -20°C。

注意：反复冻融活性可能降低。

● PCR 反应液的配制 (Total 50 μl)

试剂	使用量	终浓度
PrimeSTAR Max Premix (2X)	25 μl	1X
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	

* 请参照参数优化。

注意：PCR 反应液的配制可在室温下进行，但 DNA 聚合酶等试剂在配制前请于冰上放置。

● PCR 反应条件

使用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 进行快速扩增反应时，为了发挥延伸因子的最大效率，建议使用 3 Step PCR 反应条件。

(A) DNA 量为 200 ng/50 μl 以下的 PCR 反应体系*

98°C	10 sec	} 30~35 Cycles
55°C	5 sec or 15 sec	
72°C	5 sec/kb	

(B) DNA 量为 200 ng/50 μl 以上的 PCR 反应体系*

98°C	10 sec	} 30~35 Cycles [3-step PCR]
55°C	5 sec or 15 sec	
72°C	30~60 sec/kb	

or

98°C	10 sec	} 30~35 Cycles [2-step PCR]
68°C	30~60 sec/kb	

* 以反转录反应产物为模板进行高速 PCR 反应时（延伸速度为 5~10 sec/kb），在 50 μl 反应体系中，cDNA 的使用量为相当于 125 ng Total RNA 以下。

设定的延伸时间延长（延伸速度提高到 1 min/kb）时，50 μl 反应体系中模板的使用量可增加至相当于约 750 ng Total RNA 的量。

[请参照 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的特点：模板使用量与反应速度（cDNA 为模板时）]

- 变性条件 使用 98°C 时，建议设定为 5~10 sec；使用 94°C 时，建议设定为 10~15 sec。
- 退火温度 请先设为 55°C。
- 退火时间 T_m 值（按照下面的公式计算）为 55°C 以上时，设定为 5 sec；
T_m 值（按照下面的公式计算）为 55°C 以下时，设定为 15 sec。

※ T_m 值的计算方法

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

此公式适用于 25 mer 以下的 Primer。Primer 超过 25 mer 时，退火时间设定为 5 sec。

<重要>

由于本制品是具有高退火效率的 DNA 聚合酶，退火时间一般设定为 5 sec 或 15 sec。退火时间不宜过长，退火时间过长会导致扩增产物电泳时出现 Smear 现象。

3 step PCR 出现 Smear 时，请尝试使用 2 step PCR。

其他请参照“参数优化”和“Troubleshooting”部分内容。

● 参数优化

为了发挥 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的最大性能、获得良好的 PCR 扩增结果，需要设定适宜反应参数。

(1) 模板 DNA 使用量

*【50 μl 高速（5 sec/kb）PCR 反应体系中，模板 DNA 的推荐使用量】

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

50 μl PCR 反应体系中模板 DNA 量超过 200 ng 时，延伸时间设定为 30~60 sec/kb，可获得良好的扩增效果。

以反转录反应产物为模板进行高速（5~10 sec/kb）PCR 反应时，在 50 μl 反应体系中 cDNA 的量设定为相当于或小于 Total RNA 25~125 ng。

[请参照 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的特点：C.模板使用量与反应速度（以 cDNA 为模板时）]
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) 扩增片段大小

进行 5 sec/kb 的高速扩增反应时（反转录反应产物为模板时，按 5~10 sec/kb 设定）可获得良好的扩增结果，可扩增的 DNA 片段大小分别为：

人基因组 DNA	~ 6 kb
大肠杆菌基因组 DNA	~ 10 kb
反转录反应产物（cDNA）	~ 6 kb
λ DNA	~ 15 kb

扩增片段超过上述长度时，可以尝试延伸时间设定为 15~30 sec/kb。PCR 扩增成功与否也受模板的使用量、模板纯度、靶基因序列等因素影响。

(3) Primer 与 PCR 反应条件

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.)。

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。

根据 [PCR 反应条件] 选择反应条件。

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

(4) 退火条件

根据 [PCR 反应条件] 设定退火条件。PCR 扩增不良时请进行以下调整。

<产生 Smear 和杂带时>

- ① 缩短退火时间。如果退火时间设定为 15 sec 时改为 5 sec。
- ② 退火时间已设定为 5 sec 时，将退火温度提高至 58~63℃。
- ③ 使用 2 step PCR 法。

<无目的扩增产物或目的扩增产物量少时>

- ① 延长退火时间。如果退火时间为 5 sec 时设定为 15 sec。
- ② 将退火温度降低至 50~53℃。

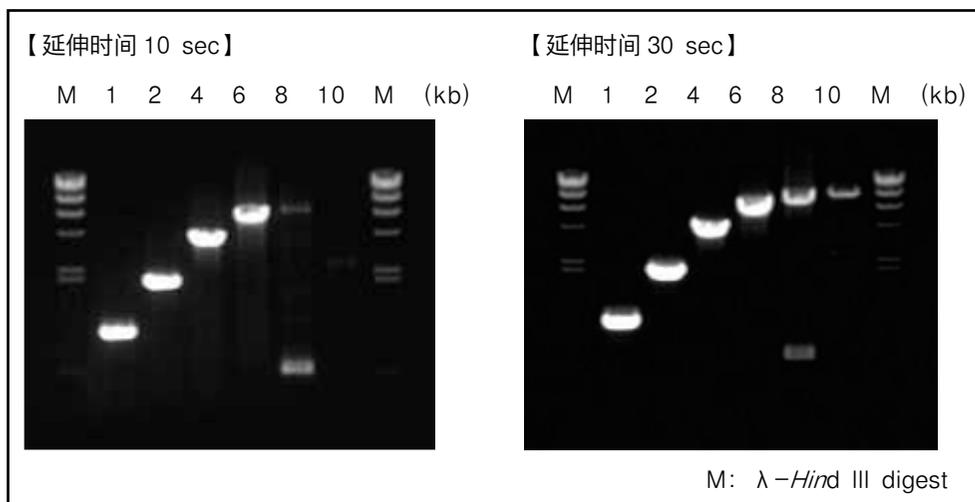
● PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的特点

A、扩增速度

(1) 以 λ DNA 为模板扩增 1 kb~10 kb 片段时，退火时间设定为 5 sec，延伸时间设定为 10 sec 或 30 sec。

Template	λ DNA	1 ng/50 μ l
PCR 仪	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice	
PCR 反应条件	98℃	10 sec
	55℃	5 sec
	72℃	10 or 30 sec

} 30 Cycles



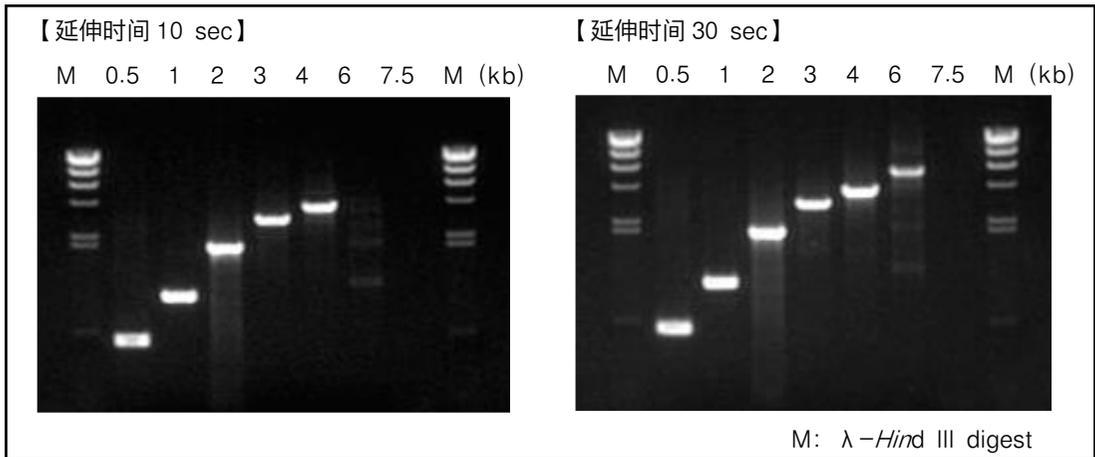
延伸时间为 10 sec 和 30 sec 时，分别可以良好地扩增 6 kb 和 8 kb 的 DNA 片段，说明以 λ DNA 为模板的 PCR 反应体系可以将延伸时间按照 5 sec/kb 设定。

(2) 以人基因组 DNA 为模板扩增 0.5 kb~7.5 kb 片段时，退火时间设定为 5 sec，延伸时间设定为 10 sec 或 30 sec。

Template	人基因组 DNA	100 ng/50 μ l
PCR 仪	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice	

PCR 反应条件

98°C	10 sec	} 30 Cycles
55°C	5 sec	
72°C	10 or 30 sec	



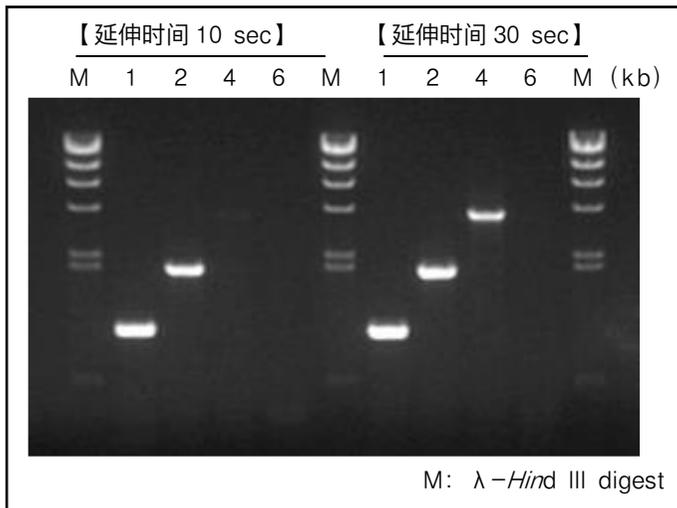
延伸时间为 10 sec 和 30 sec 时，分别可以良好地扩增 4 kb 和 6 kb 的 DNA 片段，说明以人基因组 DNA 为模板的 PCR 反应体系可以将延伸时间按照 5 sec/kb 设定。

(3) 以 cDNA 为模板扩增 1 kb~6 kb 片段时，退火时间设定为 15 sec，延伸时间设定为 10 sec 或 30 sec。

Template cDNA (相当于 100 ng Total RNA) /50 μ l
 PCR 仪 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice

PCR 反应条件

98°C	10 sec	} 30 Cycles
55°C	15 sec	
72°C	10 or 30 sec	

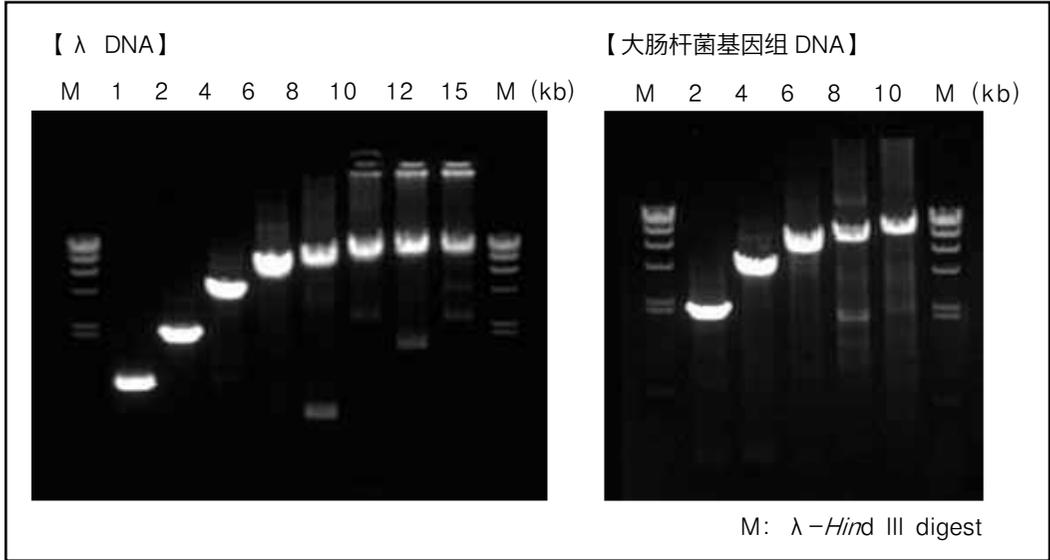


延伸时间为 10 sec 和 30 sec 时，分别可以良好地扩增 2 kb 和 4 kb 的 DNA 片段，说明以 cDNA 为模板的 PCR 反应体系可以将延伸时间按照 5~10 sec/kb 设定。

B、扩增片段大小

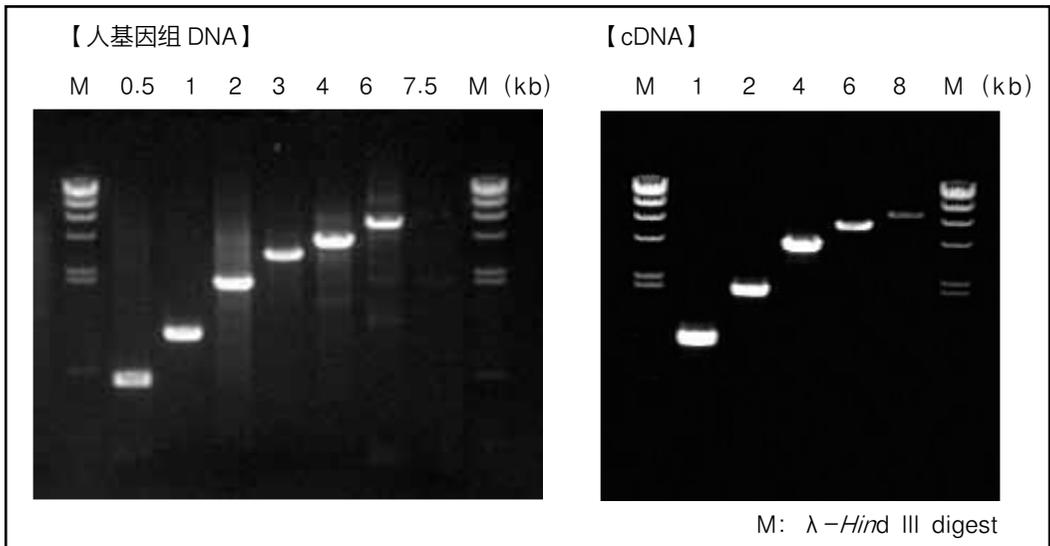
以 λ DNA、大肠杆菌基因组 DNA、人基因组 DNA 和 cDNA 为模板时，退火时间设定为 5 sec 或 15 sec，延伸时间按照 5 sec/kb 设定 (cDNA 为模板时设定为 10 sec/kb)，可得到各 DNA 扩增片段。

Template	λ DNA	1 ng	
	大肠杆菌基因组 DNA	50 ng	
	人基因组 DNA	100 ng	
	cDNA	相当于 100 ng Total RNA	
PCR 仪	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice		
PCR 反应条件	98°C 10 sec	} 30 Cycles	
	55°C 5 sec or 15 sec		
	72°C 5 or 10 sec/kb		



延伸速度为 5 sec/kb 的高速 PCR 反应，
可以良好地扩增 15 kb 的 DNA 片段。

延伸速度为 5 sec/kb 的高速 PCR 反应，
可以良好地扩增 10 kb 的 DNA 片段。

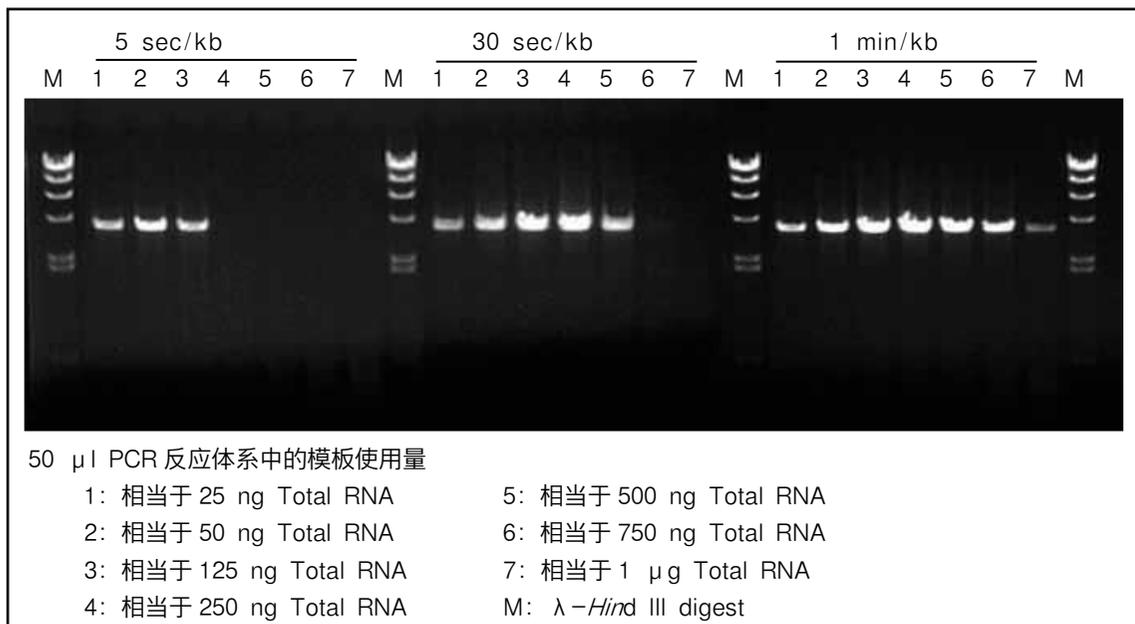


延伸速度为 5 sec/kb 的高速 PCR 反应，
可以良好地扩增 6 kb 的 DNA 片段。

延伸速度为 10 sec/kb 的高速 PCR 反应，
可以良好地扩增 6 kb 的 DNA 片段。

C、模板使用量与反应速度 (cDNA 为模板时)

使用各种浓度的 Total RNA 进行反转录反应, 以获得的 cDNA 作为模板, 扩增 Transferrin Receptor (TFR) 基因 4 kb 片段, 其延伸时间分别设定为 20 sec (5 sec/kb)、2 min (30 sec/kb) 和 4 min (1 min/kb), 并对扩增效率进行了比较。



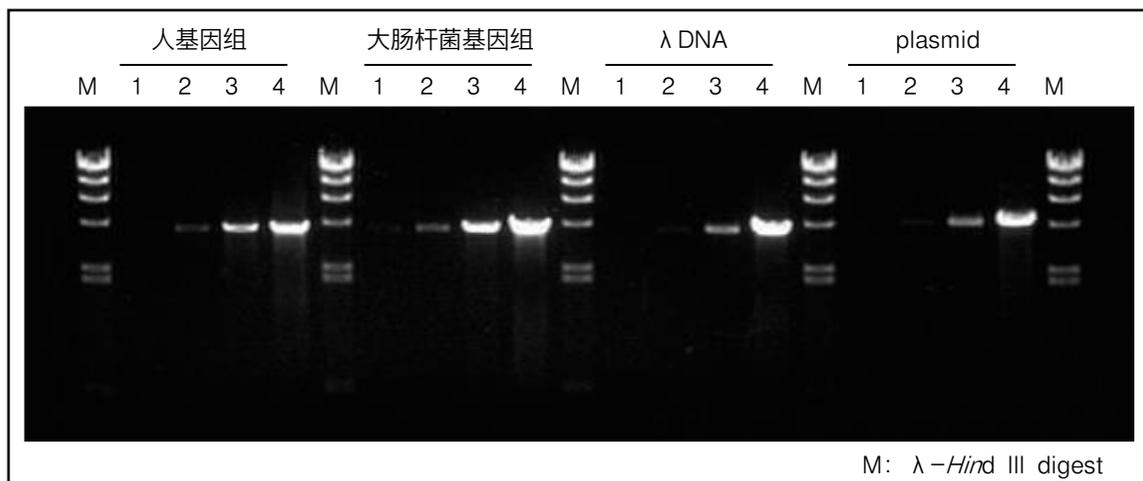
延伸速度为 5 sec/kb 的高速 PCR 反应时, 50 μ l PCR 反应体系中, 模板使用量应少于 125 ng Total RNA 相当量。延伸时间延长 (\sim 1 min/kb) 时, cDNA 的使用量可提高至 750 ng Total RNA 相当量。

D、灵敏度

分别以人基因组 DNA、大肠杆菌基因组 DNA、 λ DNA 和 plasmid DNA 为模板, 延伸时间设为 20 sec, 扩增 4 kb 的目的 DNA 片段, 确认反应灵敏度。

PCR 仪 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice

PCR 反应条件	98°C 10 sec	} 30 Cycles
	55°C 5 sec	
	72°C 20 sec	



	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
基因组 DNA	100 pg	<u>1 ng</u>	10 ng	100 ng
大肠杆菌 DNA	1 pg	<u>10 pg</u>	100 pg	1 ng
λ DNA	100 fg	1 pg	<u>10 pg</u>	100 pg
plasmid DNA	100 fg	1 pg	<u>10 pg</u>	100 pg

E、保真性

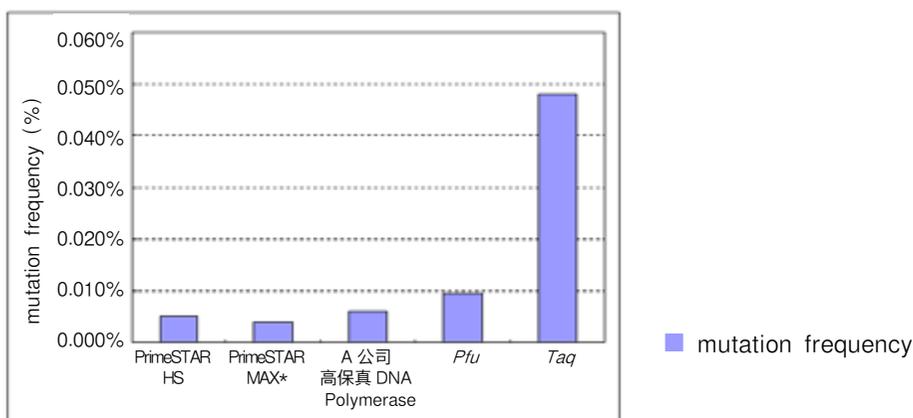
通过分析序列数据检验 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的突变频率。

【方法】以富含 GC 序列的 *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA 为模板，任选 8 个区域（各扩增约 500 bp 片段），使用几种不同的高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增后，将各自 PCR 产物克隆至载体中，并对每种序列挑取复数的克隆进行测序，比对 mutation frequency（突变频率）。

【结果】PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的保真性是 *Taq* DNA Polymerase 的 10 倍，并高于 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 和 A 公司的高保真 DNA 聚合酶。

这种检测突变率的方法是实际 PCR 反应中非常适合获得保真度的方法。在注重保真性反应中可放心使用本制品。

几种不同的高保真 DNA 聚合酶的保真性能比较



* PrimeSTAR Max DNA Polymerase 的 PCR 扩增产物（230,129 个碱基）的测序结果表明，仅有 9 个碱基发生了错配。

● 扩增产物的 Agarose Gel 电泳、克隆和测序

(1) 扩增产物的 Agarose Gel 电泳

PrimeSTAR Max DNA Polymerase 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 的 PCR 扩增产物几乎都为平滑末端，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。

如果要将 PCR 产物克隆到 T-vector 中，需要在 PCR 产物 3' 端添加 dA 碱基，请使用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Code No. 6019)。

(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 and 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 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) 直接测序时

由于本酶具有 3' →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。

● Troubleshooting

现象	问题点	对策
无扩增产物或 扩增效率不良时	延伸时间 循环圈数 退火时间 退火温度 反应液量 模板 DNA 的纯度和量 引物浓度	按照 10~60 sec/kb*速度设定。 设定为 35~40 Cycles。 设定为 15 sec。 每次间隔 2°C降低温度。 尝试 25 μl 反应体系。 使用适量的模板 DNA; 提高 DNA 模板的纯度。 合适的终浓度在 0.2~0.5 μM 之间选择。
出现杂带或 Smear 时	退火时间 退火温度 模板 DNA 的量 循环圈数 引物浓度	设定为 5 sec。 每次间隔 2°C上升温度至 63°C。尝试 2-step PCR。 使用适量的模板 DNA, 不要过量。 设定为 25~30 Cycles。 合适的终浓度在 0.2~0.3 μM 之间选择。

* 热处理后的样品等含有多量 RNA 的粗提样品作为模板时, 延伸时间按照 60 sec/kb 设定, 可使 PCR 反应有所改善。

● 关联产品

PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R022A/B)
 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)
 PrimeSTAR® HS (Premix) (Code No. R040A)
 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)
 PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (Code No. R046A)
 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)
 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)
 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® (Code No. 6019)
 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch (Code No. TP350)

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.

PrimeScript and Thermal Cycler Dice 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（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>

v202011Da