

PrimeSTAR[®] GXL Premix Fast, Dye plus

Code No. R052A

包装量: 1 ml x 5
(for 200 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, 优化用于高速PCR扩增的2X预混型试剂。此外, 制品中已含有电泳时所必需的色素试剂(绿色:蓝色和黄色的混合色素)和比重试剂, PCR反应后可以直接进行电泳。

本制品在保持高保真的同时, 能够在短时间内完成PCR扩增, 即使对于难以扩增的高GC含量模板, 也不需要设定特别反应条件, 就可以高成功率获得扩增产物。

制品中添加了常温下能抑制DNA聚合酶活性和3' -5' 核酸外切酶活性的单克隆抗体, 适用于Hot Start PCR。

保存

-20°C

注意: 试剂的冻融次数应限制在≤20次。

>20次反复冻融可能会影响性能。

使用前请务必混匀并短暂离心。

一般的PCR反应液组成 (共50 μl)

PrimeSTAR GXL Premix Fast, Dye plus (2X)	25 μl (终浓度 1X)
引物 1	10 pmol (终浓度 0.2 μM)
引物 2	10 pmol (终浓度 0.2 μM)
Template	请参考右侧 (2) 模板
灭菌水	up to 50 μl

PCR反应条件

98°C 10 sec
55 or 60°C*1 5 sec
68°C*2 1-10 sec/kb*3

30 cycles

98°C 10 sec
68°C*2 1-10 sec/kb*3

30 cycles

*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值 (°C) = [(A、T总数) x 2] + [(C、G总数) x 4] - 5

*2 进行3-step PCR反应时, 将延伸温度设定为68°C。

*3 延伸时间设置

扩增产物≤10 kb: 5 sec/kb

扩增产物>10 kb: 10 sec/kb

增加延伸时间可以提高扩增产物的量。

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 Fast, Dye plus 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 Fast, Dye plus 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	5~500 ng	(100~500 ng)
大肠杆菌基因组 DNA	100 pg~200 ng	(10~200 ng)
Plasmid DNA	10 pg~10 ng	(1~10 ng)
cDNA	25~750 ng	(250~750 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 Fast, Dye plus 扩增的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳时, 建议使用 TAE buffer。

当 PCR 产物在琼脂糖凝胶上运行时, 鲜绿色染料分离成蓝色和黄色染料。

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 Fast, Dye plus 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。如果想克隆到 T 载体上, 则需要对 3' 末端进行 dA 加尾反应, 推荐使用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Code No. 6019)。

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 Fast, Dye plus 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' -末端突出切掉。

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.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。

v202402Da