

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2, Dye plus

Code No. TCH047

包 装 量: 625 µl x 4
(for 100 reactions)

制品说明:

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2, Dye plus 是兼具高保真性和高扩增速度的 PCR 用 DNA 聚合酶。制品中通过添加能够快速准确扩增的促进因子, 并优化了反应组分, 在保持高保真性的同时, 提高了高速反应中目的基因扩增的成功率。PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2, Dye plus 是一款完全兼容且优于现有产品的替代品。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, 在常温下可快速配制反应液, 可用于高通量分析。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。

<产品特点>

- 非常高的保真性
- 高速反应 (延伸)
- * 针对模板 DNA 含量较高而难以扩增的反应, 也可以进行高速扩增
- 与现有产品相比, 扩增产量增加
- 方便的预混型试剂, 常温下可以快速配制反应液
- 预混染料, PCR 反应后可以直接进行电泳

保 存: -20℃

注意: 使用前避免剧烈混匀, 轻轻颠倒混匀离心后使用。制品中含有酶, 过度反复冻融可能降低酶活性。

扩增产物的电泳、克隆和测序:

1) 电泳

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2, Dye plus 的 PCR 扩增产物进行 Agarose Gel 电泳时, 建议使用 TAE Buffer。使用 TBE Buffer 时, 电泳条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 Ver.2, Dye plus 的 PCR 扩增产物大多都为平滑末端, 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。T 载体克隆时需要在产物 3' 端加 dA 尾, 推荐使用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Code No. 6019)。此外, 也可以使用 In Fusion 克隆系统。

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 和 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 PstI 等), 由于 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2, 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' -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 和 PCR Clean up (Code No. 740609.10/.50/.250) 中的 PCR Clean up 除去蛋白质。

PCR 反应液配制 (Total 50 µl):

PrimeSTAR Max Ver.2 Premix, Dye plus (2X) 25 µl (终浓度 1X)

Primer 1 10~15 pmol (终浓度 0.2~0.3 µM)

Primer 2 10~15 pmol (终浓度 0.2~0.3 µM)

模板 请参考“模板推荐使用量”

灭菌水 Up to 50 µl

注意: PCR 反应液的配制可在室温下进行, 但在制备过程中, 请将每个反应组分都放置在冰上。

PCR 反应条件:

当使用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2, Dye plus 进行快速扩增反应时, 推荐 3 步反应以获得最佳效果。

GC rich 和长片段扩增等需要提高特异性时, 建议进行两步法反应。

98℃ ^{*1}	10 sec	} 30~35 Cycles
55℃	5 or 15 sec ^{*2}	
68℃ ^{*3}	5~10 sec/kb ^{*4}	

or

98℃ ^{*1}	10 sec	} 30~35 Cycles
68℃ ^{*3}	5~10 sec/kb ^{*4}	

*1 变性条件

在 98℃ 时, 建议设定为 5~10 sec。

在 94℃ 时, 建议设定为 10~15 sec。

*2 退火时间

Tm 值为 55℃ 以上时, 设定为 5 sec。

Tm 值为 55℃ 以下时, 设定为 15 sec。

【重要提示】

由于 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2, Dye plus 的 priming 效率高, 退火时间过长可能导致 PCR 产物电泳时出现 smear 现象。

※ Tm 值的计算方法:

$Tm (°C) = 2 (NA+NT) + 4 (NC+NG) - 5$

其中 N 表示 A, T, C 或 G 这 4 种核苷酸分别在引物中的数量。

该公式适用于长度 ≤ 25 mer 的引物。25 mer 以上长度的引物设定退火时间为 5 sec。

*3 延伸温度

两步法和三步法 PCR 均设置为 68℃。

*4 延伸时间 (以此为准则)

扩增产物 ≤ 6 kb: 5 sec/kb (10 sec/kb for cDNA);

扩增产物 > 6 kb: 10 sec/kb (20 sec/kb for cDNA)

在某些情况下, 延长延伸时间可以提高扩增产量。

*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.)。

*使用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2, Dye plus 时, 避免使用含次黄嘌呤核苷碱基 (Inosine) 的引物。

模板推荐使用量 (50 µl 反应体系):

人基因组 DNA 5~500 ng

大肠杆菌基因组 DNA 100 pg~200 ng

质粒 DNA 10 pg~10 ng

cDNA 相当于 10~1,000 ng 总 RNA

*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。

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。

v202509Da