Code No. R010A

研究用

TaKaRa

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase

说明书

v201412Da

目　　录

内　容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保　　存	1
● 特　　点	1
● PCR 反应液组成	3
● PCR 反应条件	3
● 最适参数的设定	4
● 扩增产物的电泳、克隆及测序	5
● Troubeshooting	5
● 实验例	5

● 制品说明

PrimeSTAR HS DNA Polymerase是兼具高保真性和高扩增效率的PCR用DNA聚合酶。因其具有极强的3’→5’Exonuclease活性而显示出超群的校正功能。制品中添加了在常温状态下能够抑制DNA Polymerase活性及3’→5’Exonuclease活性的抗体，有效防止PCR反应前的引物错配和引物消化。与最适反应Buffer配合使用，可以实现对广泛靶序列的高保真性、高灵敏度、高特异性、高成功率的扩增，对于cDNA克隆等要求高保真的PCR反应发挥最强大的威力。

● 制品内容（200 次量）

PrimeSTAR HS DNA Polymerase（2.5 U/μl）	100 μl
5×PrimeSTAR Buffer（Mg^{2+} plus）*	1 ml×2
dNTP Mixture（各 2.5 mM）	800 μl

* Mg^{2+}浓度为5 mM（5×）。

● 保　存:　　−20℃

● 特　点

A.　保真性

通过分析大量序列数据检验PrimeSTAR HS的突变频率。

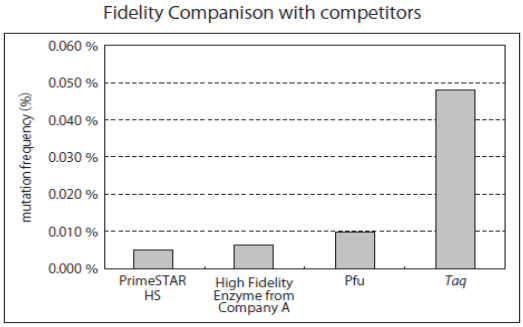
【方法】

以*Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA为模板，任选8个富含CG的区域（各约500 bp），使用PrimeSTAR HS及其他几种不同高保真酶进行PCR扩增后，将各自PCR产物克隆到合适的载体中，并对每种序列挑取复数的克隆进行测序。

【结果】

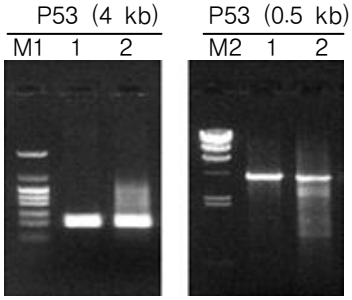
分析使用PrimeSTAR HS扩增的DNA片段序列，249,941个数据中只有12个数据显示错配。其保真性比Company A的高保真酶高，且为*Taq* DNA Polymerase的10倍。

这种检测突变率的方法是实际PCR反应中最适合获得保真度的方法。基于以上序列分析结果，对于注重保真性的PCR扩增反应，建议使用PrimeSTAR HS。



B.　Priming效率高，退火时间短

PrimeSTAR HS DNA Polymerase有极高的Priming效率。因此，5−15 sec.的较短退火时间即可达到高特异性扩增。



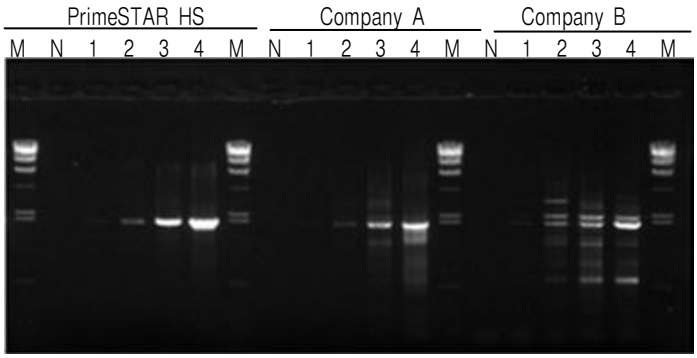
1：55℃退火5 sec.
2：55℃退火30 sec.
M1：pHY Marker
M2：λ−*Hin*d III digest

模板：人基因组DNA 100 ng
50 μl PCR反应体系，
3 step PCR Method，30 cycles

C. 扩增效率高

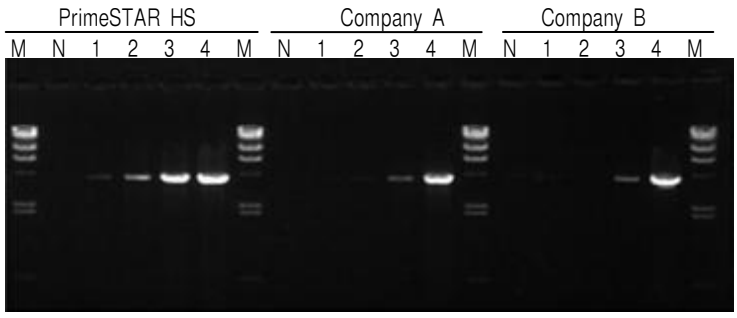
1）与Company A和 Company B的高保真酶比较扩增效率（Target: 人源DCLRE1A基因[2 kb], *E.coli* [4 kb]）。根据操作方法（50 µl PCR 反应体系）配制反应液及设定PCR反应条件。

以下结果表明，PrimeSTAR比其他高保真酶的扩增效率更高。另外，检测灵敏度也高一个数量级。



<Target: 人 DCLRE1A 基因 [2 kb] >

N: No Template
1: 人基因组 DNA 100 pg
2: 人基因组 DNA 1 ng
3: 人基因组 DNA 10 ng
4: 人基因组 DNA 100 ng
M: λ−*Hin*d III digest



<*E.coli* [4 kb]>

N:No Template
1: JM109 基因组 DNA 1 pg
2: JM109 基因组 DNA 10 pg
3: JM109 基因组 DNA 100 pg
4: JM109 基因组 DNA 1 ng
M: λ−*Hin*d III digest

2）以人基因组和*E. Coli* 基因组DNA为模板扩增不同大小的DNA片段。

模板: 人基因组DNA [50 ng/50 µl PCR反应体系]

PCR仪器: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600)

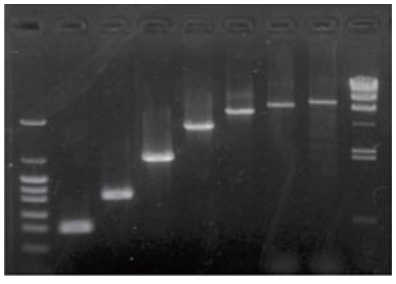
PCR反应条件:

0.5−6 kb: 3 step PCR Method

98℃ 10 sec.
60℃ 5 sec.
72℃ 1 min./kb
] 30 cycles

7.5−8.5 kb: 2 step PCR Method

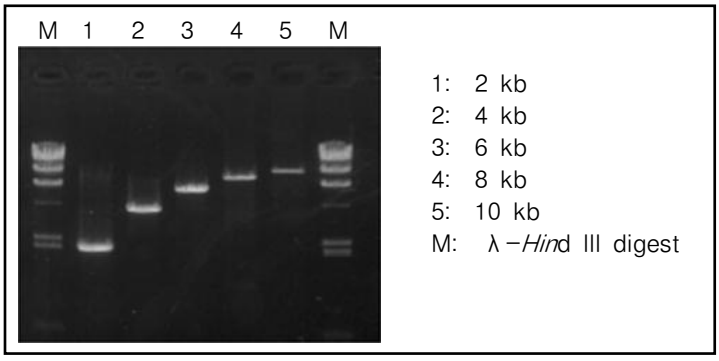
98℃ 10 sec.
68℃ 8 min.
] 30 cycles



1: 0.5 kb
2: 1 kb
3: 2 kb
4: 4 kb
5: 6 kb
6: 7.5 kb
7: 8.5 kb
M1: pHY Marker
M2: λ−*Hin*d III digest

模板：*E.coli* 基因组 DNA［100 pg/50 μl PCR 反应体系］
PCR 仪器：TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice Gradient (Code No. TP600)
PCR 反应条件：

3 step PCR Method
98℃ 10 sec.
60℃ 5 sec.
72℃ 1 min./kb
] 30 cycles



D. 高耐热性

1）3 step PCR Method 30 cycles后残留的酶活性约80%
（98℃ 10 sec.; 55℃ 15 sec.; 72℃ 4 min.）

2）2 step PCR Method 30 cycles后残留的酶活性约85%
（98℃ 10 sec.; 68℃ 4 min.）

● PCR反应液组成（共50 μl）

	Volume	Final conc.
5× PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} Plus)	10 μl	1×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl	200 μM each
Primer 1	10–15 pmol	0.2–0.3 μM
Primer 2	10–15 pmol	0.2–0.3 μM
Template	<200 ng	
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl)	0.5 μl	1.25 units/50 μl
灭菌蒸馏水	up to 50 μl	

*：可在室温下配制PCR反应液。但是，当配制反应液时，请将各组份放于冰上。

● PCR反应条件

① 3 Step 法

98℃ 10 sec.
55℃ 5 sec.或 15 sec.
72℃ 1 min./kb
] 30 cycles

② 2 Step 法

98℃ 10 sec.
68℃ 1 min./kb
] 30 cycles

Takara Bio推荐使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase时，首先尝试3 step PCR反应。

1）变性条件

设定98℃ 5–10 sec.。另外，设定较低的变性温度（94℃）时，请设定变性时间为10–15 sec.。

2）退火温度

首先尝试55℃（可能需要优化）。

3）退火时间

退火时间取决于引物的Tm值。使用以下公式*计算Tm值。当Tm≥55℃时，设定为5 sec.。当Tm<55℃时，设定为15 sec.。

*：Tm值（℃）＝2（NA＋NT）＋4（NC＋NG）－5，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.。

【重要】

1. 由于本酶退火效率高，退火时间只需设定5 sec.或15 sec.。退火时间过长可能导致扩增产物电泳时出现Smear现象。
2. 当采用3 step PCR或Tm值≥70℃的引物产生电泳弥散的PCR产物时，请尝试2 step PCR。其他请参考“最适参数的设定”和“Troubleshooting”来调整PCR条件。

● 最适参数的设定

为了发挥PrimeSTAR HS的最大性能、获得良好的PCR扩增结果，需要设定最适反应参数。

1） 酶量

一般50 μl反应体系推荐使用1.25 units。根据扩增片段大小、模板纯度和加量，酶量也要进行适当调整。

2） 模板DNA使用量

模板DNA的推荐使用量（50 μl反应体系）

人基因组DNA：	5 ng － 200 ng
大肠杆菌基因组DNA：	100 pg － 100 ng
cDNA library：	1 ng － 200 ng
λ DNA：	10 pg － 10 ng
Plasmid DNA：	10 pg － 1 ng

使用过量模板DNA会导致酶活性降低。经亚硫酸氢钠处理后的含尿嘧啶DNA为模板时，不能使用本制品。

3） dNTP和Mg^{2+}浓度

因为dNTP有螯合作用，dNTP浓度过高会降低反应液中有效Mg^{2+}浓度。在反应液中，5×PrimeSTAR Buffer终浓度为1 mM $MgCl_2$与200 μM dNTP是最适合的比例，因此，不必调整dNTP浓度。

NOTE：反应液中不能用dUTP代替dTTP。使用dUTP会大大降低酶活性。

4） 引物和PCR条件

最好使用专业引物设计软件，如OLIGO™ Primer Analysis Software（Molecular Biology Insights），来获得合适的引物序列。

引物设计准则：a）引物长度：对于一般DNA片段的扩增可用20–25 mer。正确PCR条件参考“PCR反应条件”。

b）修饰碱基：使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase时，引物避免含有inosine（I）。

c）简并引物：简并引物可以与PrimeSTAR HS DNA Polymerase一同使用。

5） 退火条件

根据“PCR反应条件”设定退火条件。当扩增产物收量低时，按以下方法解决：

【琼脂糖凝胶上出现Smear条带和杂带时】

a） 缩短退火时间。例如，从15 sec.缩短至5 sec.。

b） 如果退火时间已经是5 sec.，则升高退火温度至58–65℃。

c） 尝试2 step PCR法。

【无目的扩增产物】

a） 延长退火时间。例如，从5 sec.增至15 sec.。

b） 降低退火温度至50–53℃。

● 扩增产物的电泳、克隆及测序

1） 扩增产物的电泳

PrimeSTAR HS DNA Polymerase的PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳时，建议使用TAE Buffer。

NOTE: 使用TBE Buffer时，电泳带会出现聚集在凝胶底部呈扩散的现象。

2） 扩增产物末端

PrimeSTAR HS DNA Polymerase的PCR扩增产物几乎都为平滑末端。因此，它们可直接克隆到平滑末端载体中（必要时，克隆前进行磷酸化反应），但不能克隆到T载体中。克隆到平滑末端载体中时，建议使用Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)。

3） 限制性内切酶处理时

限制性内切酶消化PCR产物前，使用NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)纯化DNA或酚/氯仿抽提除去反应液中的PrimeSTAR HS DNA Polymerase。特别是使用3’-末端突出的限制酶时（例如*Pst* I等），由于PrimeSTAR HS 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

由于本酶具有3’→5’外切酶活性，直接测序前，建议使用酚/氯仿抽提或使用NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等纯化DNA。

● Troubleshooting

1） 问题：无扩增产物或扩增效率低

解决： a）延伸时间：延伸时间>1 min./kb。

b）退火时间：设定为15 sec.。

c）退火温度：以2℃为梯度降低退火温度。另外，选择3 step PCR。

d）模板DNA加量及纯度：使用适合的模板DNA加量；使用高度纯化的模板DNA。

e）引物浓度：在0.2-0.5 μM范围内调整引物终浓度。

2） 问题：琼脂糖凝胶电泳时出现杂带或Smear

解决： a）退火时间：设定为5 sec.。

b）退火温度：以2℃为梯度升高退火温度。另外，选择2 step PCR。

c）延伸时间：设定为1 min./kb。避免延伸时间过长。

d）模板DNA：使用适合的模板DNA加量；避免使用过量的模板DNA。

e）循环数：25-30 cycles。

f） 酶量：在推荐范围内减少酶量；PrimeSTAR HS加量最低为0.625 units/50 μl。

g）引物浓度：0.2 - 0.3 μM (final conc.)范围内选择最适浓度。

● 实验例

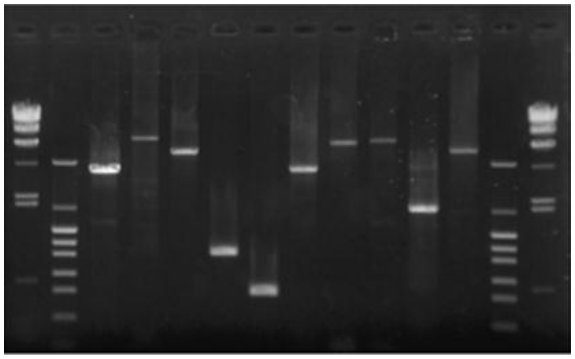
使用相同PCR条件扩增不同长度的人类基因组DNA。

结果表明，PrimeSTAR HS DNA Polymerase可以在相同条件下有效地扩增0.5-8.5 kb长度不等的目的片段。PrimeSTAR HS的高保真性和高效性使其成为从cDNA library扩增DNA的理想选择。

模板：人基因组 DNA 100 ng/50 μl PCR

PCR 反应条件：

98℃	10 sec.	┐	30 cycles
68℃	8 min.	┘	



1:	DCLRE1A	4 kb
2:	β-globin	8.5 kb
3:	β-globin	6 kb
4:	DCLRE1A	1 kb
5:	p53	0.5 kb
6:	p53	4 kb
7:	β-globin	7.5 kb
8:	DCLRE1A	8 kb
9:	DCLRE1A	2 kb
10:	p53	6 kb

M1: pHY Marker
M2: λ-*Hin*d III digest

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

This document has been translated and prepared by Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd. For the latest version of this document, please refer to the Takara Bio Inc. website.

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
4006518761，4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: http://www.takara.com.cn

v201412Da