

◆ PrimeSTAR® 系列产品及相关制品一览表

【PrimeSTAR® 系列】

制品名称	Code No.	包装量
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase	R050Q	40 次 (50 µl PCR)
	R050A	200 次 (50 µl PCR)
	R050B(A × 4)	800 次 (50 µl PCR)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	R045Q	25 次 (50 µl PCR)
	R045A	100 次 (50 µl PCR)
	R045B(A × 4)	400 次 (50 µl PCR)
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	R010Q	50 U
	R010A	250 U
	R010B(A × 4)	1,000 U
PrimeSTAR® HS (Premix)	R040Q	40 次 (50 µl PCR)
	R040A	100 次 (50 µl PCR)

【相关制品】

制品名称	简介	Code No.	包装量
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit	PCR酶使用PrimeSTAR® GXL	R023A	50 次
		R023B(A × 4)	200 次
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer ★1,2	In-Fusion克隆试剂	639633/34/35	10 次/50 次/100 次
In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin® ★1,3		639639/40/41	10 次/50 次/100 次
In-Fusion® HD Cloning Kit ★1		639648/49/50	10 次/50 次/100 次

★1 : 试剂盒中不附带感受态细胞 (另行准备了感受态细胞的试剂盒)。

★2 : PCR产物为单一片段时, 可直接用于In-Fusion连接反应, 试剂盒中附带用于In-Fusion连接反应前对PCR产物进行预处理的Cloning Enhancer。

★3 : PCR产物为多个DNA片段时, 试剂盒中附带对多个PCR产物进行凝胶回收、纯化的Spin Column。

◆ 相关制品

PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit

Code No. R023

试剂盒中含有添加辅蛋白的PrimeScript™ II RTase和对长链及GC rich模板扩增具有高保真性的PrimeSTAR® GXL, 二者组合使用适用于RT-PCR, 尤其适用于需高保真的长链靶基因的RT-PCR。

模板使用量范围宽广

【方法】以HL60细胞的Total RNA (100 pg~6 µg) 为模板, 使用Oligo dT Primer分别进行反转录反应 (20 µl反应体系), 再以5 µl反转录反应液作为模板进行4 kb的TFR基因的PCR扩增反应。

【结果】使用本试剂盒进行RT-PCR反应时, 在20 µl反转录反应体系中, Total RNA使用量增至6 µg时, 对4 kb的TFR基因也有良好的扩增。



PCR反应中模板使用量: Total RNA 25, 250 pg, 2.5, 25, 50, 125, 250, 500, 750 ng, 1, 1.25, 1.5 µg (由左至右)

注: 本宣传页上的实验结果都来源于Takara Bio Inc.

- 本宣传页上登载的制品, 都是以科研为目的。请不要用于其它方面, 如: 不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可, 严禁产品的转售、转让、以转售、转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可及注册商标信息请在本公司网站上确认: <http://www.takara.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注, 使用的也是各公司的商标或注册商标。

宝日医生物技术 (北京) 有限公司
Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

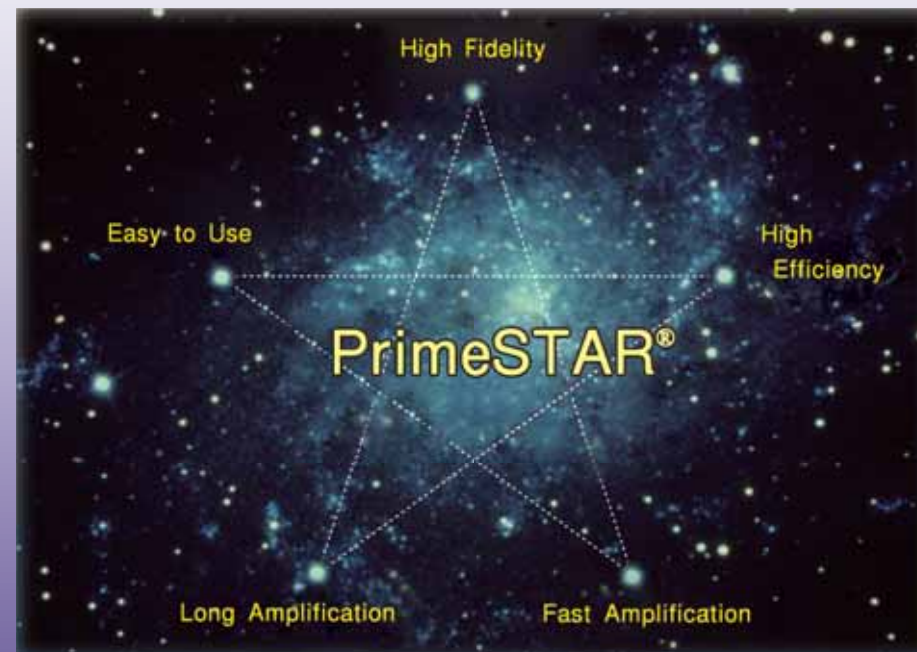
技术咨询电话: 4006518761 4006518769
E-mail: service@takarabiomed.com.cn

Ver.4 2016年12月印刷 2K



www.takara.com.cn

高保真性PCR用聚合酶 PrimeSTAR® 系列



Clontech Takara cellartis
www.takara.com.cn

基础知识~PCR用聚合酶的类型和特长~

PCR反应中使用的耐热性DNA Polymerase从构造上大体分为以下两种类型:

- 以Taq DNA Polymerase为首的嗜热性真细菌来源的Pol I型 (family A) DNA聚合酶
- 以Pfu DNA Polymerase为代表的嗜嗜热性古细菌来源的α型 (family B) DNA聚合酶

一般Pol I型聚合酶都有很强的延伸活性,但不具有3'→5' exonuclease活性,因TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)活性使PCR产物的3'-末端附加一个“dA”碱基。而α型DNA聚合酶虽有更强的耐热性,显示出很强的3'→5' exonuclease活性,但延伸速度慢,PCR扩增产物的3'-末端为平滑末端。

高保真聚合酶大部分都是α型DNA聚合酶

在DNA Polymerase作用下, DNA由5'→3'方向合成复制时,有时会出现错误碱基的摄入,此时α型聚合酶依靠所具有的3'→5' exonuclease活性将错配的碱基除去,摄入正确的碱基,继续顺利地进行延伸反应。因此,α型聚合酶在DNA合成中的保真性大大高于Pol I型聚合酶。

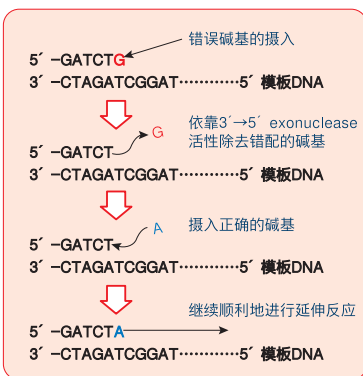
但是,以往的α型聚合酶存在以下几个缺点:

- 反应时间长。
- 扩增效率低,不适用于大片段DNA以及GC rich、AT rich靶基因的扩增。
- 模板DNA的使用量范围小,模板使用量多时对PCR反应有阻害作用。
- 反应条件要求繁琐,不利于操作。



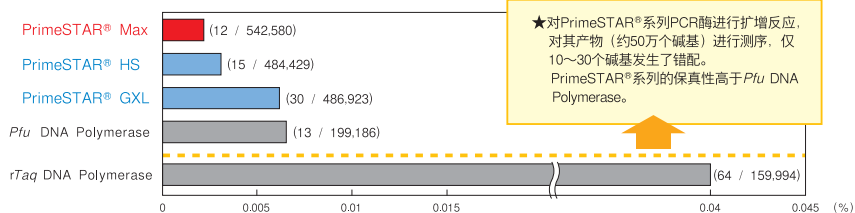
Takara的PrimeSTAR®系列产品是以「便于操作」「反应性能好」为理念研发的高保真聚合酶!

PCR用聚合酶的类型	Pol I型 (family A)	α型 (family B)
来源	Prokaryote	Archaea
3'-5' exonuclease活性	×	○
5'-3' exonuclease活性	○	×
PCR扩增产物的3'-末端形状	附加“dA”碱基	平滑末端
酶名称	• Taq系列 • EmeraldAmp®等	• PrimeSTAR®系列 • Pfu等



PrimeSTAR®系列的基本特点

PrimeSTAR®系列和其他各种PCR用聚合酶的保真性能比较



错配率的计算方法:以GC rich、易发生碱基突变的 *T. thermophilus* HB8基因组DNA为模板,任选10个区域进行PCR扩增后,将各PCR产物克隆至载体中,并对每种序列挑取复数克隆进行测序确认碱基序列。

酶	GC or AT rich 模板的扩增	延伸速度	模板添加量范围	扩增链长 (人基因组DNA)	PCR产物的末端形状	Hot Start
PrimeSTAR® HS	★★★★	★★	★★	≤8.5 kb	平滑末端	○ (使用抗体)
PrimeSTAR® Max	★★★★	★★★★★	★★★★★*	≤6 kb		
PrimeSTAR® GXL	★★★★★	★★★★	★★★★★	≤30 kb		

*当延伸时间延长至1 min/kb时,可以增加模板使用量。

PrimeSTAR®系列的基础酶

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase

Code No. R010

很强的校正能力

非常强的3'→5' exonuclease活性

高Priming效率*

扩增效率高于Taq

经济性

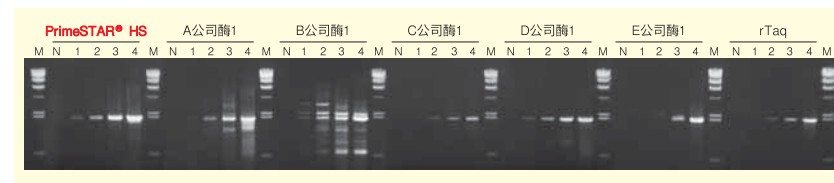
性价比高

※ Priming效率:

DNA Polymerase在引物的3'-末端形成酶/DNA复合物并开始DNA片段的延伸,这一过程称为Priming。任何一种PrimeSTAR®系列的聚合酶都具有高Priming效率。因此,在5~15秒的短退火时间内即可获得高特异性扩增产物。

PrimeSTAR® HS和各公司High Fidelity PCR酶扩增效率的比较

以人基因组DNA为模板,分别使用PrimeSTAR® HS和各公司高保真PCR酶及rTaq,在各自的推荐条件下对PCR扩增效率进行了比较。结果显示PrimeSTAR® HS同其他公司High Fidelity PCR酶相比,即使在模板量很少的情况下也能高效率地扩增。



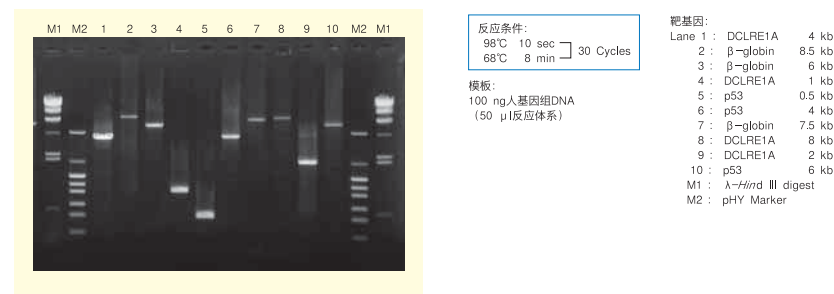
模板: 人基因组DNA
靶基因: DCLRE1A基因 (2 kb)
反应液的配制及PCR反应条件: 使用各公司推荐的操作流程

模板使用量 (50 μl反应体系)
Lane N: Negative Control (无模板)
1: 100 pg
2: 1 ng
3: 10 ng
4: 100 ng
M: λ-Hind III digest

PrimeSTAR® HS的反应条件: 98°C 10 sec
55°C 5 sec
72°C 2 min } 30 Cycles

在同一反应条件下使用PrimeSTAR® HS对各种片段大小的不同靶基因进行PCR扩增

使用PrimeSTAR® HS在同一PCR反应条件下对各种片段大小的不同靶基因进行了PCR扩增反应,结果显示,PrimeSTAR® HS对0.5~8.5 kb的靶基因都可高效率地进行扩增。



PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

Code No. R050

PrimeSTAR® GXL是这样诞生的!

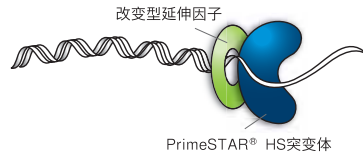
● 突变型酶，可抑制酶与模板的非特异性结合

DNA Polymerase本身与模板DNA结合时会阻碍引物的延伸反应。一般的α型酶易与模板DNA发生非特异性结合，使PCR扩增难以进行。为了改善PCR扩增效果，对PrimeSTAR® HS进行了改良，成功地抑制了酶与模板DNA的过剩结合。

● 采用特别开发的延伸因子

在生物体内，DNA Polymerase与延伸因子形成复合体后进行DNA的复制。

改良型DNA聚合酶和本公司特别开发的延伸因子相组合，是兼具优良的延伸性与通用性为一体的High Fidelity PCR用聚合酶。



PrimeSTAR® HS突变体

大片段DNA的扩增

可扩增~30 kb的DNA片段。

通用性高

适用于GC or AT rich靶基因及高起始量模板扩增。

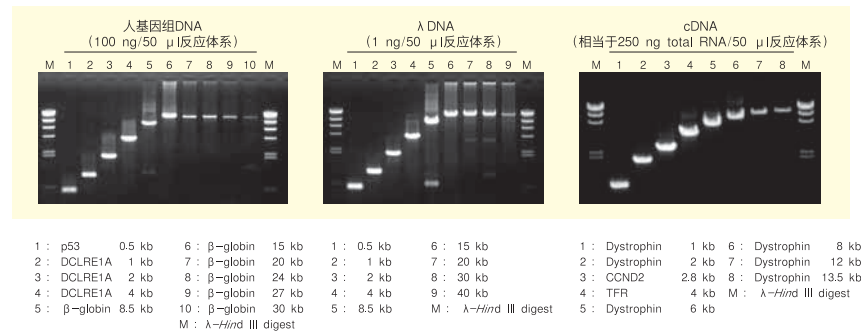
反应速度快

当酶的使用量提高至2倍时，使用高速PCR操作流程，可进行延伸速度为10 sec/kb的高速PCR反应。

大片段靶基因的扩增

评价PCR用聚合酶的反应性能时，扩增片段长度是一个重要的指标。使用PrimeSTAR® GXL对长片段靶基因的扩增进行了确认。

【方法】以人基因组DNA、λ DNA及cDNA为模板，按照PrimeSTAR® GXL推荐的PCR反应条件对各种靶基因进行了PCR扩增。

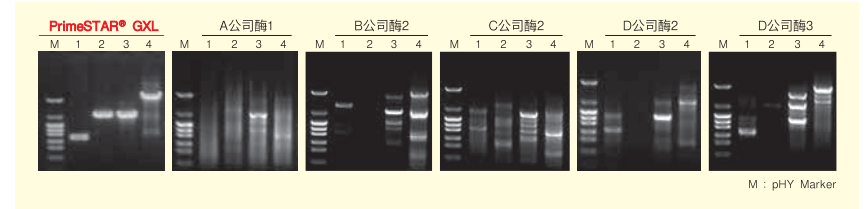


【结果】以人基因组DNA为模板可获得30 kb、以λ DNA为模板可获得40 kb、以cDNA为模板可获得13.5 kb的扩增产物，显示出PrimeSTAR® GXL对各种靶基因都有良好的延伸性。

扩增GC rich靶基因的反应性 (同其他公司High Fidelity PCR酶的比较)

靶基因富含GC序列时，经常会导致PCR扩增难以进行。使用本公司的酶与其他公司的PCR酶对难以扩增的GC rich模板进行PCR反应，对其反应性能进行比较。

【方法】以人基因组DNA和 *T.thermophilus* HB8基因组DNA为模板，对扩增区域GC含量为70%左右的4种GC rich模板分别使用PrimeSTAR® GXL与其他公司的High Fidelity PCR酶进行PCR扩增，对其反应性能进行了比较。反应液的配制及PCR反应条件按照各自推荐的操作流程进行实验。



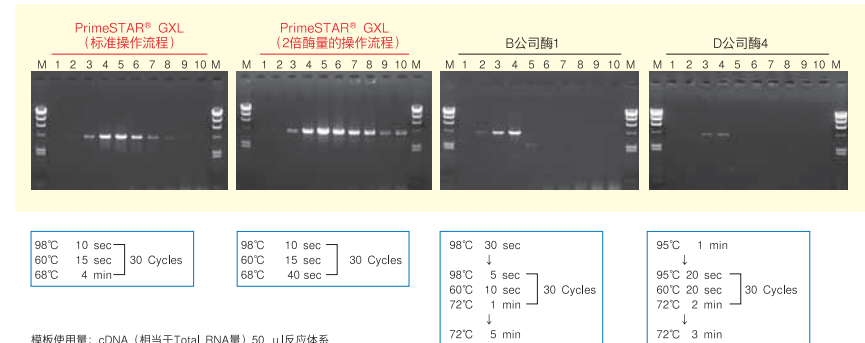
模板: 人基因组DNA (100 ng/50 μl反应体系) 靶基因: *T.thermophilus* HB8基因组DNA (10 ng/50 μl反应体系) 各公司的反应条件:
 靶基因: APOE 746 bp (GC含量 74%) Lane 3: 2,029 bp (GC含量 74%) D公司酶3: 适用于GC rich模板
 Lane 2: TGF β 1 2,005 bp (GC含量 69%) Lane 4: 4,988 bp (GC含量 74%) B公司酶2: 使用GC Buffer

【结果】PrimeSTAR® GXL对GC rich模板可进行高效率的扩增，同时也显示出很高的反应特异性。

反应灵敏度和模板使用量范围 (同其他公司的酶及2倍酶使用量的比较)

PCR扩增产物克隆时，因要求扩增产物的保真性，所以会经常使用High Fidelity PCR酶 (但是，High Fidelity PCR酶容易受反应液中核酸量的影响，因此，以cDNA为模板的扩增比较困难)。以下以cDNA为模板，使用各公司的High Fidelity PCR酶进行PCR扩增反应，对模板使用量范围进行研讨。

【方法】从HL60细胞中提取Total RNA后进行反转录反应，以获得的cDNA为模板，对4 kb的TFR基因进行PCR扩增，确认模板使用量对扩增反应的影响。反应液的配制及PCR反应条件按照各自推荐的操作流程进行实验。



模板使用量: cDNA (相当于Total RNA量) 50 μl反应体系
 Lane 1: 25 pg 4: 25 ng 7: 750 ng 10: 2 μg
 2: 250 pg 5: 250 ng 8: 1 μg M: λ-Hind III digest
 3: 2.5 ng 6: 500 ng 9: 1.5 μg

【结果】同其他公司酶相比，PrimeSTAR® GXL可以在广泛的浓度范围内对cDNA进行良好的扩增。同时将PrimeSTAR® GXL的酶量提高至2倍使用时，模板的适用范围变得更加宽广。

高水平的保真性

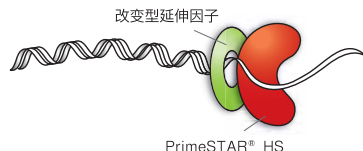
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase

Code No. R045

采用特别开发的延伸因子

在生物体内，DNA Polymerase和延伸因子形成复合体后进行DNA的复制。

PrimeSTAR® Max是PrimeSTAR® HS和本公司特别开发的改变型延伸因子的组合，实现了与生物体内DNA复制时同样的高保真性和快速性。



反应速度快

实现5~10 sec/kb的快速反应

保真性高

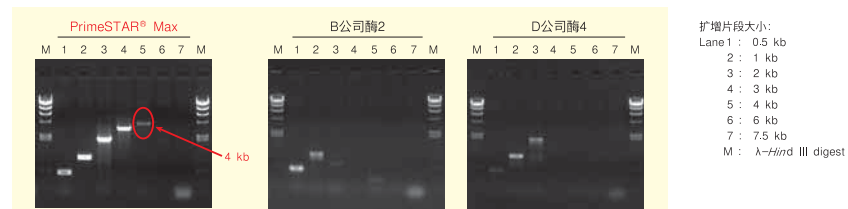
适用于In-Fusion Cloning

操作简便

2 × Premix型适用于高通量检测

快速PCR反应的扩增效率

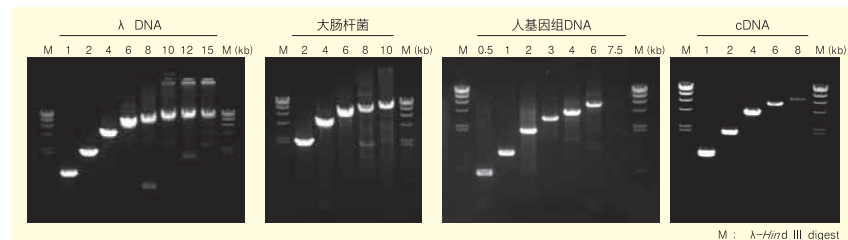
使用各公司的High Fidelity PCR酶对快速PCR反应的扩增效率进行比较。以人基因组DNA为模板，进行延伸时间为10 sec的快速PCR反应。对0.5~7.5 kb的DNA片段进行扩增比较。结果显示，PrimeSTAR® Max的扩增效率高于其他公司的酶，可良好地扩增4 kb的DNA片段。



模板: 100 ng人基因组DNA (50 μl反应体系) PCR反应条件: 3 step, 延伸时间, 10 sec, 30 Cycles

使用各种模板可获得的DNA片段大小 (快速PCR反应)

以λ DNA、大肠杆菌、人基因组DNA及cDNA为模板，退火时间设定为5 sec或者15 sec，延伸时间设定为5 sec/kb (以cDNA为模板时设定为10 sec/kb) 进行PCR反应，确认可获得的DNA片段大小。

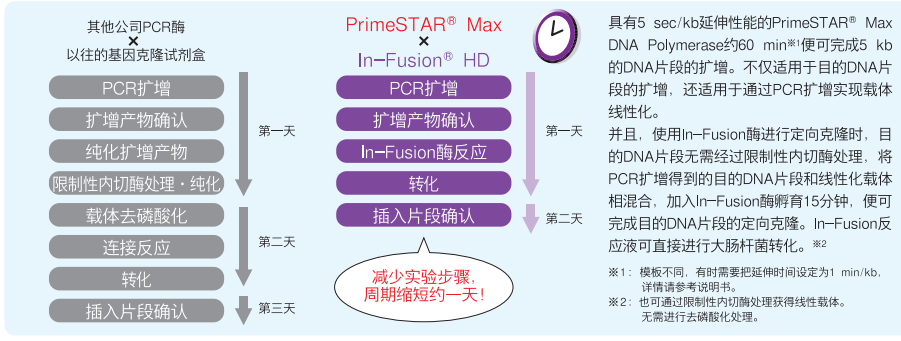
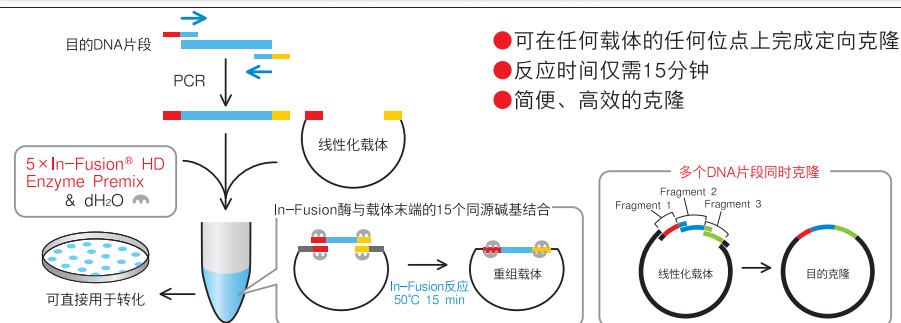


延伸时间为5 sec/kb的快速PCR反应，可以良好地扩增~15 kb的DNA片段。
延伸时间为5 sec/kb的快速PCR反应，可以良好地扩增~10 kb的DNA片段。
延伸时间为5 sec/kb的快速PCR反应，可以良好地扩增~6 kb的DNA片段。
延伸时间为10 sec/kb的快速PCR反应，可以良好地扩增~6 kb的DNA片段。

兼备高保真性和高扩增效率的PrimeSTAR®系列与In-Fusion®配套使用，可以实现更快速的基因克隆!

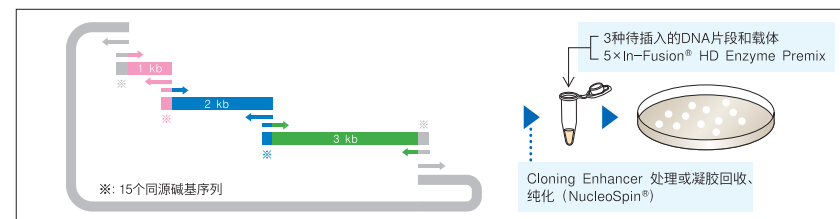
In-Fusion® HD Cloning Kit

Code No. 639648/49/50



多个DNA片段 (1 kb、2 kb、3 kb) 同时克隆

【方法】使用PrimeSTAR® Max分别扩增1 kb、2 kb、3 kb的目的DNA片段和2.7 kb的载体，使用In-Fusion® HD试剂盒进行定向克隆。再使用高转化效率的感受态细胞*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Takara Code: 9128) 转化并进行蓝/白斑筛选。



【结果】对3个DNA片段 (1 kb、2 kb、3 kb) 同时克隆，随机挑选10个克隆子进行菌落PCR，对插入片段进行确认。其中有7个克隆子是正确地插入了目的片段的阳性克隆 (1 kb + 2 kb + 3 kb)。

插入片段大小 (kb)	克隆数 (1/5涂菌量)	阳性克隆数
1 kb+2 kb+3 kb	192	7/10