

Code No. R010A

研究用

---

**Takara**

PrimeSTAR<sup>®</sup> HS  
DNA Polymerase

---

说明书

# 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	4
● PCR 反应条件	4
● 参数优化	4
● 扩增产物的电泳、克隆及测序	5
● Troubleshooting	6
● 实验例	6
● 关联产品	6

## ● 制品说明

PrimeSTAR HS DNA Polymerase是Takara Bio特别开发的兼具高保真性和高扩增效率的PCR用DNA聚合酶。因其具有非常强的3' →5' Exonuclease活性而显示出很好的校正功能，同时还具有优于 *Taq* DNA Polymerase的高扩增效率。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。此外，因其还具有很强的Priming效率，可以设定较短的退火时间，从而缩短了反应时间。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 of 的扩增，对于cDNA克隆等要求高保真的PCR反应发挥强大的威力。

## ● 制品内容 (200 次量、50 μl 反应体系)

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

### \*1: 【贮存溶液】

50 mM	Tris-HCl (pH8.2, 4°C)
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	Tween 20
0.1%	NP-40
50%	Glycerol

### 【活性定义】

用活性化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，在74°C、30分钟内，摄入10 nmol的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为1个活性单位 (U)。

\*2: Mg<sup>2+</sup>浓度为5 mM (5×)。

## ● 保存: -20°C

## ● 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。

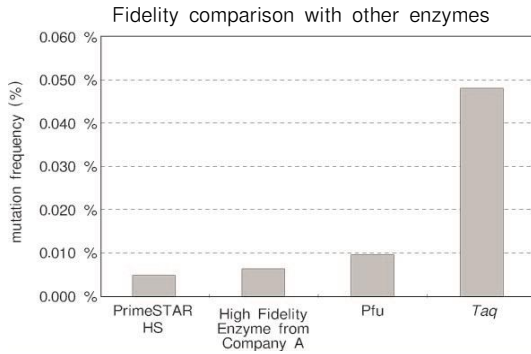
#### 【方法】

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。

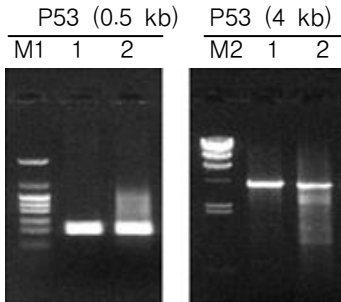
这种检测突变率的方法是实际PCR反应中非常适合获得保真度的方法。基于以上序列分析结果，对于注重保真性的PCR扩增反应，建议使用PrimeSTAR HS。



本公司比较结果

B. Priming效率高, 退火时间短

PrimeSTAR HS DNA Polymerase有很高的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。



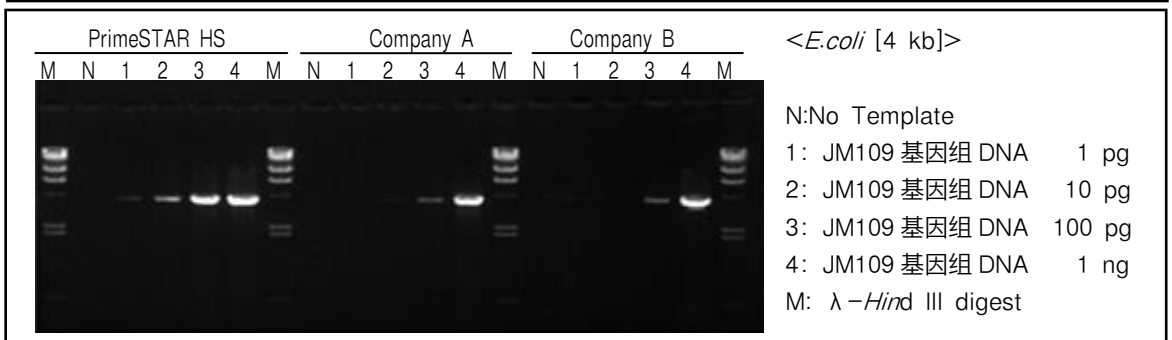
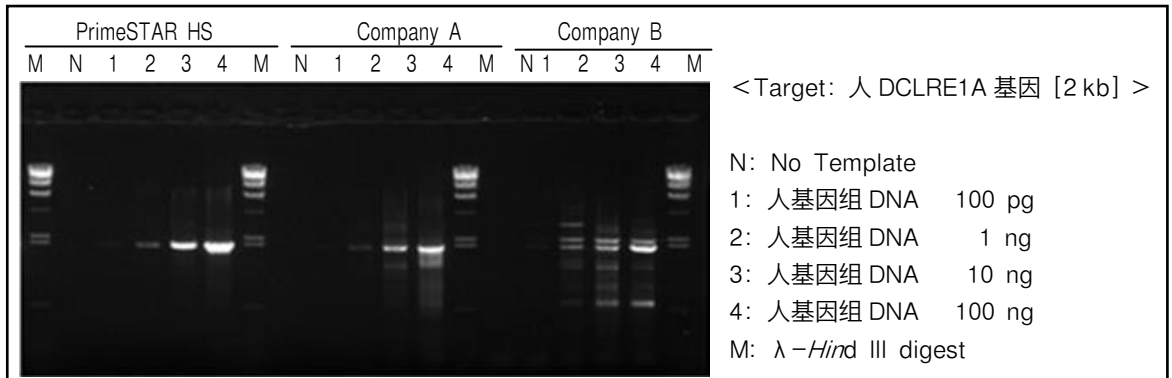
1: 55°C退火5 sec  
2: 55°C退火30 sec  
M1: pHY Marker  
M2: λ-Hind III digest

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。



本公司比较结果

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  $\mu$ l PCR反应体系]

PCR仪器: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™

PCR反应条件:

0.5–6 kb: 3 step PCR Method

98°C 10 sec

60°C 5 sec

72°C 1 min/kb

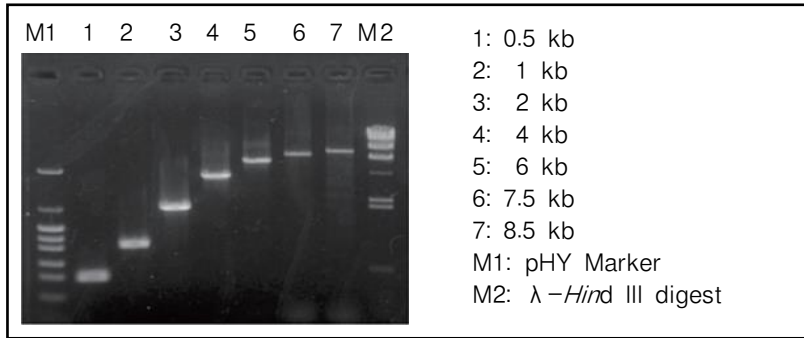
30 cycles

7.5–8.5 kb: 2 step PCR Method

98°C 10 sec

68°C 8 min

30 cycles



模板: *E.coli* 基因组 DNA [100 pg/50  $\mu$ l PCR 反应体系]

PCR 仪器: TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice™

PCR 反应条件:

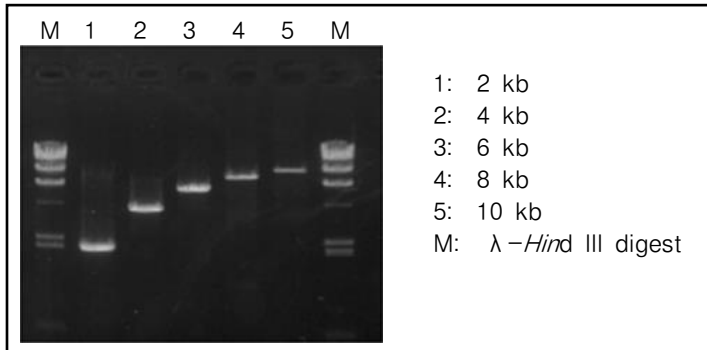
3 step PCR Method

98°C 10 sec

60°C 5 sec

72°C 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°C 10 sec; 55°C 15 sec; 72°C 4 min)

2) 2 step PCR Method 30 cycles后残留的酶活性约85%

(98°C 10 sec; 68°C 4 min)

## ● PCR反应液组成 (共50 μl)

	Volume/Amount	Final conc.
5× PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> 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 U/50 μl
灭菌水	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°C	10 sec	} 30 cycles
55°C	5 sec 或 15 sec	
72°C	1 min/kb	

### ② 2 Step 法

98°C	10 sec	} 30 cycles
68°C	1 min/kb	

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

#### 2) 退火温度

首先尝试55°C（可能需要优化）。

#### 3) 退火时间

退火时间取决于引物的T<sub>m</sub>值。使用以下公式\*计算T<sub>m</sub>值。当T<sub>m</sub>≥55°C时，设定为5 sec。当T<sub>m</sub><55°C时，设定为15 sec。

\*:  $T_m \text{值} (^{\circ}\text{C}) = 2(\text{NA} + \text{NT}) + 4(\text{NC} + \text{NG}) - 5$ ，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T<sub>m</sub>值≥70°C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“参数优化”和“Troubleshooting”来调整PCR条件。

## ● 参数优化

为了更好地发挥PrimeSTAR HS的性能、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 U。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 – 200 ng
大肠杆菌基因组DNA :	100 pg – 100 ng
cDNA library :	1 – 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，不能使用本产品。

### 3) dNTP和Mg<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>浓度。在反应液中，5×PrimeSTAR Buffer终浓度为1 mM MgCl<sub>2</sub>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

建议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。

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增至15 sec。

b) 降低退火温度至50–53°C。

## ● 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扩增产物大部分为平滑末端。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），建议使用Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)。克隆到T载体时，需要在PCR产物的3'末端附加dA碱基。建议使用Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Code No. 6019)。

### 3) 限制性内切酶处理时

限制性内切酶消化PCR产物前，请使用NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)或苯酚/氯仿抽提除去蛋白质。特别是使用3'末端突出的限制酶时（例如*Pst* I等），由于PrimeSTAR 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，建议使用苯酚/氯仿抽提或使用NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)等除去蛋白质。

## ● 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°C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°C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 U/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

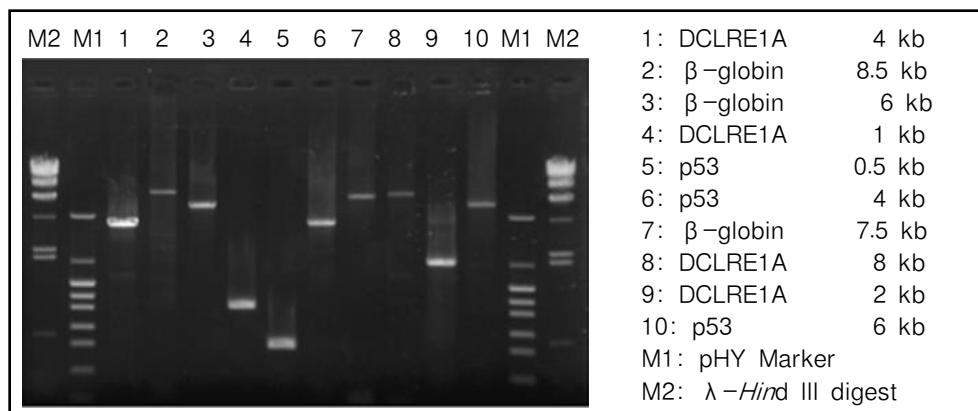
使用相同PCR条件扩增不同长度的人类基因组DNA。

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°C	10 sec	}	30 cycles
68°C	8 min		



## ● 关联产品

- PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B)
- PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)
- PrimeSTAR<sup>®</sup> HS (Premix) (Code No. R040A)
- Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)
- Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR<sup>®</sup> (Code No. 6019)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)



PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice is a 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，请联络我们，或访问我们网站[www.takara-bio.com](http://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。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v201908Da