

Code No. R040Q

研究用

---

**TaKaRa**

PrimeSTAR<sup>®</sup> HS  
(Premix)

---

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       | 3   |
| ● PCR 反应条件        | 3   |
| ● 参数优化            | 3   |
| ● 扩增产物的电泳、克隆及测序   | 4   |
| ● Troubleshooting | 4   |
| ● 关联产品            | 5   |

## ● 制品说明

本制品是PCR反应用的2倍浓度的Premix制品，内含DNA Polymerase、Buffer、dNTP Mixture等。其中，DNA Polymerase使用了Takara Bio特别开发的兼具高保真性和高扩增效率的PrimeSTAR HS DNA聚合酶。使用本制品可快速配制反应液，减少了PCR操作过程中的污染，也适用于高通量扩增。PrimeSTAR HS DNA聚合酶具有很强的3'→5' Exonuclease活性，显示出很强的校正功能，同时还具有优于 *Taq* DNA Polymerase的高扩增效率。本酶是Hot Start型PCR扩增用DNA聚合酶，可有效防止PCR反应前的引物错配和引物降解。PrimeSTAR HS DNA聚合酶与Takara最适反应Buffer结合使用，可以实现对广泛靶序列的高保真性、高特异性、高成功率的扩增，对于cDNA克隆等要求高保真的PCR反应能够发挥强大的威力。

## ● 制品内容（40次量，50 μl 反应体系）

|                             |                                  |
|-----------------------------|----------------------------------|
| PrimeSTAR HS (Premix)       | 500 μl × 2                       |
| 组成                          |                                  |
| PrimeSTAR HS DNA Polymerase | 1.25 U/25 μl                     |
| dNTP Mixture                | 2 × conc.; 各 0.4 mM              |
| PrimeSTAR Buffer            | 2 × conc.; 2 mM Mg <sup>2+</sup> |

## ● 保存:

长期保存请置于-20℃。4℃可保存3个月。

注：使用频率高时，存放在4℃，反复冻融会降低酶活性。在使用前请轻轻混匀并离心。

## ● 特点

### A. 保真性

通过分析大量序列数据可探知PrimeSTAR HS的突变频率。

#### 【方法】

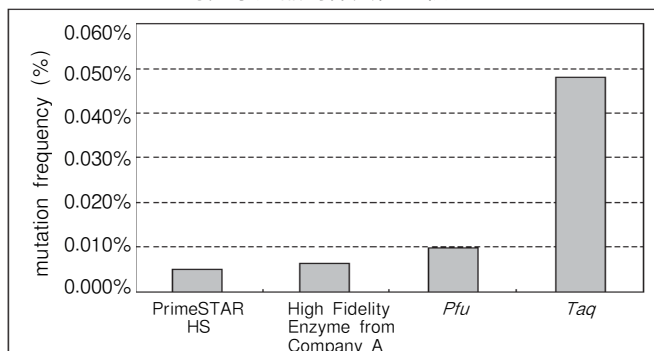
以 *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA为模板，任选8个富含CG的区域（各扩增约500 bp片段）。使用PrimeSTAR HS及其他高保真酶进行PCR扩增后，将各自PCR产物克隆到质粒载体中。并对每种序列挑取复数克隆进行序列分析。

#### 【结果】

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。其保真性是 *Taq* DNA Polymerase的10倍，并且高于Company A的高保真酶。

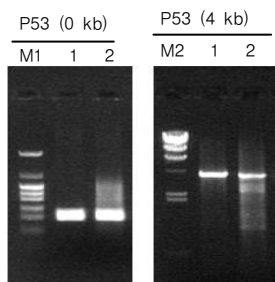
以上方法是研究突变频率的最有效方法。基于以上序列分析结果，对于要求高保真性的PCR扩增，建议使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase。

与竞争产品的保真性比较



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实现高特异性扩增。



1: 55°C退火5 sec.  
 2: 55°C退火30 sec.  
 M1: pHY Marker  
 M2: λ-Hind III digest  
 模板: Human genomic DNA 100 ng  
 50 μl PCR反应体系  
 3 step PCR Method, 30 cycles

C. 以人类基因组DNA为模板扩增

以人基因组DNA和*E.coli*基因组DNA为模板可扩增不同长度的DNA片段。

模板: 人基因组DNA [50 ng/50 μl PCR反应体系]

PCR仪: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™

PCR条件:

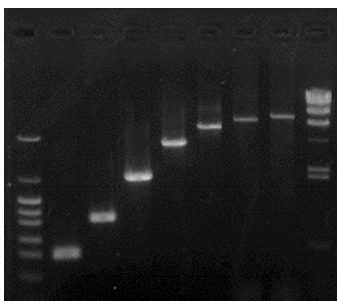
【0.5~6 kb时进行3 Step PCR】

98°C 10 sec. }  
 60°C 5 sec. } 30 Cycles  
 72°C 1 min./kb }

【7.5~8.5 kb时进行2 Step PCR】

98°C 10 sec. }  
 68°C 8 min. } 30 Cycles

M1 1 2 3 4 5 6 7 M2



M1 : pHY Marker

1 : 0.5 kb

2 : 1 kb

3 : 2 kb

4 : 4 kb

5 : 6 kb

6 : 7.5 kb

7 : 8.5 kb

M2 : λ-Hind III digest

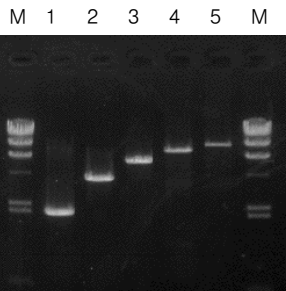
模板: 大肠杆菌基因组DNA 100 pg (50 μl反应体系)。

PCR仪: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice

PCR条件:

3 Step PCR

98°C 10 sec. }  
 60°C 5 sec. } 30 Cycles  
 72°C 1 min./kb }



M : λ-Hind III digest

1 : 2 kb

2 : 4 kb

3 : 6 kb

4 : 8 kb

5 : 10 kb

## ● PCR反应液组成 (50 μl体系)

|                       | 使用量         | 终浓度          |
|-----------------------|-------------|--------------|
| PrimeSTAR HS (Premix) | 25 μl       | 1 ×          |
| Primer 1              | 10–15 pmol  | 0.2 – 0.3 μM |
| Primer 2              | 10–15 pmol  | 0.2 – 0.3 μM |
| Template              | <200 ng     |              |
| 灭菌水                   | up to 50 μl |              |
| Total                 | 50 μl       |              |

## ● 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 (Premix)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)，必须设定变性时间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 $T_m$ 值。使用以下公式\*计算 $T_m$ 值。当 $T_m \geq 55^\circ\text{C}$ 时，设定为5 sec.。当 $T_m < 55^\circ\text{C}$ 时，设定为15 sec.。

\*:  $T_m$ 值 ( $^\circ\text{C}$ ) = 2 (A、T数) + 4 (G、C数) - 5, 该公式适用于长度 $\leq 25$  mer的引物。长于25 mer的引物设定退火时间为5 sec.。

### 【注意】

1. 由于本酶退火效率高，只需设定5 sec.或15 sec.。退火时间过长可能导致PCR产物弥散。
2. 当采用3 step PCR或 $T_m$ 值 $\geq 70^\circ\text{C}$ 的引物产生电泳弥散的PCR产物时，可尝试2 step PCR。请参考“参数设定”和“Troubleshooting”调整PCR条件。

## ● 参数优化

为了发挥PrimeSTAR HS DNA Polymerase的优良性能、获得良好的PCR扩增结果，需要设定最适反应参数。

### 1) 模板DNA量

推荐模板DNA量 (50 μl PCR反应体系)

人基因组DNA : 5 ng – 200 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

质粒DNA : 10 pg – 1 ng

避免使用过量模板DNA，过量模板可能会导致酶反应性能下降。

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。

## 2) 引物和PCR条件

可以使用市售的引物设计软件，如OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights) 来选择合适的引物序列。

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。适合的PCR条件可参阅“PCR反应条件”。

b) 修饰碱基：使用PrimeSTAR HS (Premix)时，避免使用含有次黄嘌呤核苷碱基 (I) 的引物。

c) 简并引物：简并引物可以与PrimeSTAR HS (Premix)一同使用。

## 3) 退火条件

根据“PCR反应条件”确定退火条件。当扩增产物收量低时，按以下方法解决：

【产生Smear或杂带】

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。

【没有目的扩增产物】

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°C。

## ● 扩增产物的电泳、克隆及测序

### 1) 扩增产物的电泳

对使用PrimeSTAR HS (Premix) 获得的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，推荐使用TAE Buffer。

NOTE: 使用TBE Buffer时，电泳带会出现弥散现象，不能获得清晰的、良好的电泳结果。

### 2) 扩增产物末端

使用PrimeSTAR HS (Premix) 获得的PCR扩增产物多数为平滑末端。因此，可直接克隆到平滑末端载体中（如有需要，克隆前进行磷酸化反应），不能直接克隆到T-vectors。克隆到平滑末端载体时，建议使用Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)。

### 3) 限制性内切酶反应

用限制性内切酶消化PCR产物前，使用酚/氯仿抽提去除反应液中的PrimeSTAR HS (Premix)。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PrimeSTAR HS DNA Polymerase具有3' →5' 外切酶活性，直接测序前，建议用酚/氯仿抽提等方法除去酶等蛋白质。

## ● Troubleshooting

### 1) Q: 无扩增产物或扩增效率低

A: i) 延伸时间：延伸时间>1 min./kb。

ii) 退火时间：15 sec.。

iii) 退火温度：以2°C为梯度降低温度。或者，选择3 step PCR。

iv) 模板DNA加量及纯化：使用合适的模板DNA量，请参考“参数优化”。使用纯度高的模板DNA。

v) 引物浓度：在0.2–0.5 μM范围内调整引物终浓度。

2) Q: 琼脂糖凝胶电泳时出现杂带或Smear

A: i) 退火时间: 5 sec.

ii) 退火温度: 以2°C为梯度升高温度。或者, 选择2 step PCR。

iii) 延伸时间: 1 min./kb。避免延伸时间过长。

iv) 模板DNA: 选择适合的DNA模板添加量; 避免使用过量模板DNA。

v) 循环数: 25~30 cycles。

vi) 引物浓度: 0.2~0.3  $\mu$ M (final conc.)范围内选择最适浓度。

## ● 关联产品

PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)

PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)

PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B)

PrimeScript<sup>™</sup> High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R022A/B)

PrimeScript<sup>™</sup> II High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R023A/B)

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 and PrimeScript are trademarks 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: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201805Da