

Code No. RR070A

研究用

TAKARA

SpeedSTAR™ 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
● 附带缓冲液	1
● PCR 反应液配制	1
● PCR 反应条件	1
● 优化参数设定	2
● 实验例	2
● 扩增产物	5
● Troubleshooting	5

● 制品说明

SpeedSTAR HS DNA Polymerase 是用于快速 PCR 扩增的 Hot Start 型 DNA 聚合酶，与附带的 Fast Buffer I 或 Fast Buffer II 组合使用。普通 PCR 酶延伸一般设定为 1 min/kb，而使用 SpeedSTAR HS DNA Polymerase 延伸可设定为 10 sec/kb，实现短时间内的 PCR 扩增。因此，使用该酶可以缩短总反应时间。此外，本酶使用了 Hot Start 型 DNA 聚合酶，能够有效抑制由于引物错配或引物二聚体形成导致的非特异性 PCR 扩增。由于单克隆抗体在 PCR 反应最初的 DNA 变性步骤已变性，因此该酶可直接在常规 PCR 反应条件下使用。

● 制品内容 (200 次量, 50 μ l 反应体系)

SpeedSTAR HS DNA Polymerase (5 U/ μ l) *1	50 μ l
10 \times Fast Buffer I (Mg ²⁺ plus) *2	1 ml
10 \times Fast Buffer II (Mg ²⁺ plus) *2	1 ml
dNTP Mixture (ea. 2.5 mM)	800 μ l

*1: 【Storage Buffer】

20 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM	KCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.5%	Tween 20
0.5%	NP-40
50%	Glycerol

【活性定义】

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 为底物，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: Mg²⁺浓度: 10 \times Fast Buffer I, 30 mM; 10 \times Fast Buffer II, 20 mM

● 保存: -20°C

● 附带缓冲液

本酶附带两种 Fast Buffer，可根据扩增的目的片段大小选择合适的 buffer。扩增 2 kb 以内片段时，可使用 Fast Buffer I；扩增 2-4 kb 片段时，可使用 Fast Buffer I 或 II；扩增 4 kb 以上片段时，可使用 Fast Buffer II。使用 Fast Buffer I 扩增长片段或使用 Fast Buffer II 扩增短片段可能导致扩增效率降低。

● PCR 反应液配制

试剂	使用量	终浓度
SpeedSTAR HS DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l	200 μ M
Primer 1	10-50 pmol	0.2 μ M-1 μ M
Primer 2	10-50 pmol	0.2 μ M-1 μ M
Template	<500 ng	
10 \times Fast Buffer I 或 II	5 μ l	1 \times
灭菌水	Up to 50 μ l	

*: 反应液可在室温下配制。配制反应液时，所使用的试剂请于冰上放置。

● PCR 反应条件

本酶适用于 2 Step 或 3 Step PCR 反应条件。若想进行快速 PCR，推荐 2 Step PCR 反应；若想使用较短引物得到更好结果，可进行 3 Step PCR 反应。对于长片段扩增，通常建议延长延伸时间。某些情况下，使用 SpeedSTAR 扩增长片段可能产生 smear 条带。

【2 Step PCR】

– 扩增4~6 kb以下的DNA片段时（使用Fast Buffer I or II 都可以）

95°C	5 sec	} 30 cycles
65°C	10(~20) sec/kb	

– 扩增6 kb以上的DNA片段时（请使用Fast Buffer II）

95°C	5 sec	} 30 cycles
68°C	10(~20) sec/kb	

*: 根据扩增片段大小，优化每步的反应温度来实现有效扩增。

【3 Step PCR】（使用Fast Buffer I or II 都可以）

98°C	5 sec	} 30 cycles
55°C	10-15 sec	
72°C	5-10 sec/kb	

*: 变性条件根据使用的PCR仪型号和反应管种类进行设定，98°C时设定为8~10 sec、95°C时设定为20~30 sec。

● 优化参数设定

为了发挥 SpeedSTAR HS DNA Polymerase 的优良性能、获得良好的 PCR 扩增结果，需要设定适宜的反应参数。

1) 酶量:

通常建议 50 μ l PCR 使用 1.25 U，可根据模板量或扩增片段大小适当调整加量。酶量过多可能导致非特异性扩增或 smear。酶量过少可能降低扩增效率。

2) 模板 DNA 量:

模板过量可能导致非特异性扩增或 smear。50 μ l PCR 反应体系中模板 DNA 推荐使用量如下:

-人基因组 DNA	5-500 ng
-大肠杆菌基因组 DNA	50 pg-100 ng
-质粒 DNA	10 pg-1 ng

3) dNTP 和 Mg^{2+} :

附带的 Fast Buffer I 中 Mg^{2+} 终浓度为 3 mM，Fast Buffer II 中 Mg^{2+} 终浓度为 2 mM。反应液中 dNTP 终浓度为 200 μ M each 时，可达到理想反应效果。

4) 引物:

建议使用专业引物设计软件选择合适的引物序列，如 OLIGO Primer Analysis Software : Molecular Biology Insights。

– 引物长度

一般引物长度为 20-25 mer 即可获得良好的扩增。当扩增大片段 DNA 时，使用的引物为 25~30 mer 可获得良好的扩增。

– GC 含量

GC 含量应在 40-60%之间。GC 碱基分布均匀，3' 端避免 GC rich。

- Tm 值

上下游引物 Tm 值应相同。

- 引物浓度

引物浓度可设为 0.2-1.0 μM 之间。引物浓度过低时可能导致扩增产物少。引物浓度过高会抑制特异性扩增，可能导致非特异性扩增。

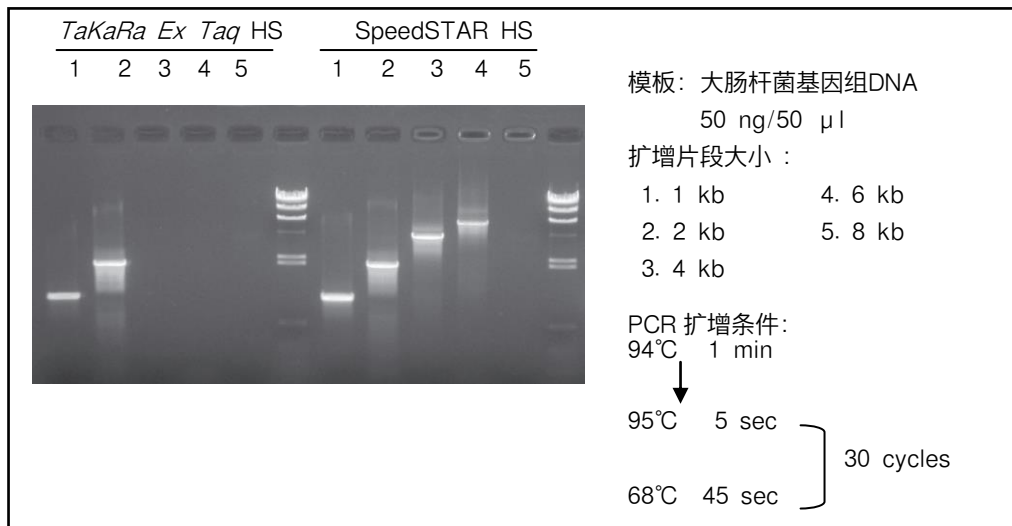
● 实验例

【快速 PCR】

SpeedSTAR 和 *TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version 间扩增片段大小比较:

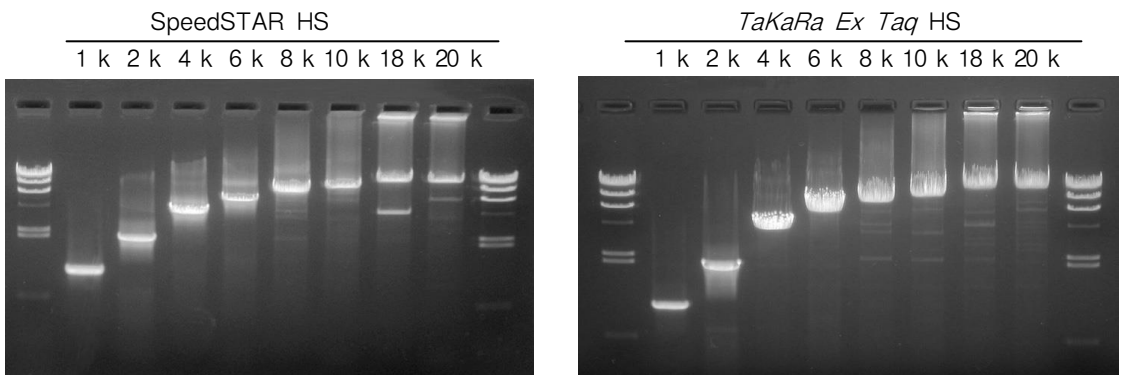
比较以上两种酶扩增片段大小，采用 2 step PCR，延伸时间为 45 sec。该条件下，SpeedSTAR HS 可扩增 6 kb 片段，*TaKaRa Ex Taq* HS 可扩增 2 kb 片段。*

**TaKaRa Ex Taq* HS 在其最适条件下可以扩增 6 kb 片段。



【高效】

SpeedSTAR 和 *TaKaRa Ex Taq* HS 扩增不同片段大小时的反应时间比较:



PCR 反应条件

◆ 扩增 1 kb 和 2 kb 片段 (使用 Fast Buffer I)

94°C 1 min
↓
95°C 5 sec
65°C 20 sec } 30 cycles

反应总时间: 约 33 min

◆ 扩增 1 kb 和 2 kb 片段

94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
68°C 2 min } 30 cycles

反应总时间: 约 96 min

◆ 扩增 4 kb 和 6 kb 片段 (使用 Fast Buffer II)

94°C 1 min
↓
95°C 5 sec
65°C 60 sec } 30 cycles

反应总时间: 约 53 min

◆ 扩增 4 kb 和 6 kb 片段

94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
68°C 6 min } 30 cycles
↓
72°C 10 min

反应总时间: 约 3 hrs 46 min

◆ 扩增 8 kb 和 10 kb 片段 (使用 Fast Buffer II)

94°C 1 min
↓
98°C 5 sec
68°C 2 min } 30 cycles

反应总时间: 约 83 min

◆ 扩增 8 kb 和 10 kb 片段 (使用 Fast Buffer II)

94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
68°C 10 min } 30 cycles
↓
72°C 10 min

反应总时间: 约 5 hrs 83 min

◆ 扩增 18 kb 和 20 kb 片段 (使用 Fast Buffer II)

94°C 1 min
↓
98°C 5 sec
68°C 5 min } 35 cycles
↓
72°C 5 min

反应总时间: 约 3 hrs 29 min

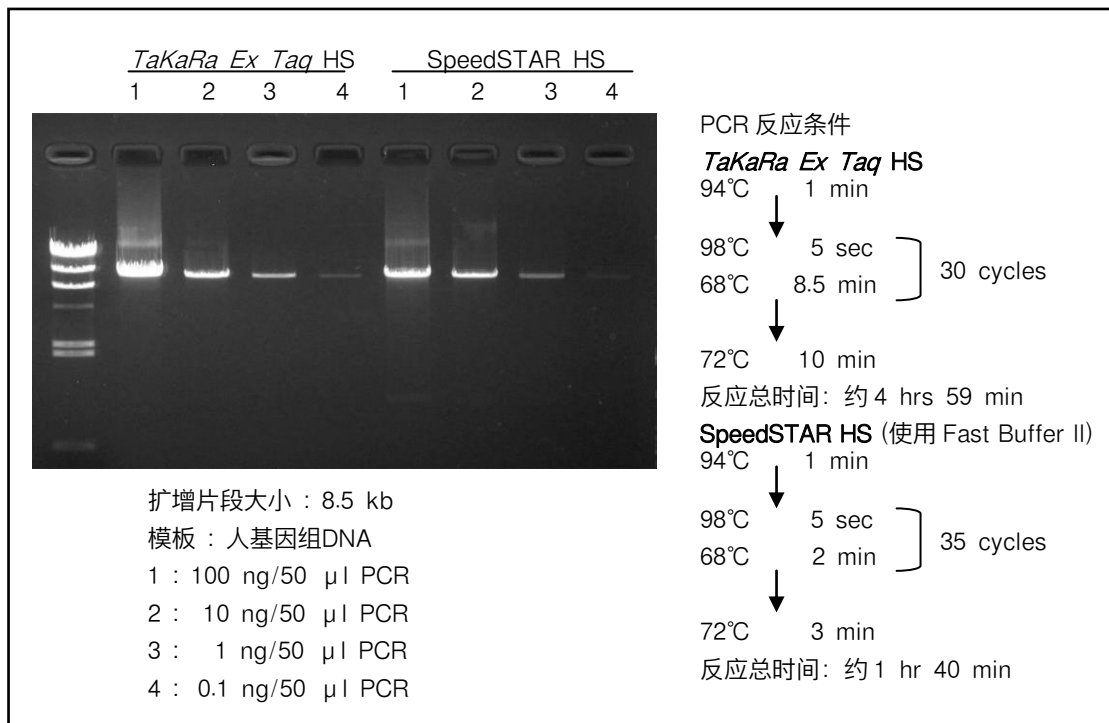
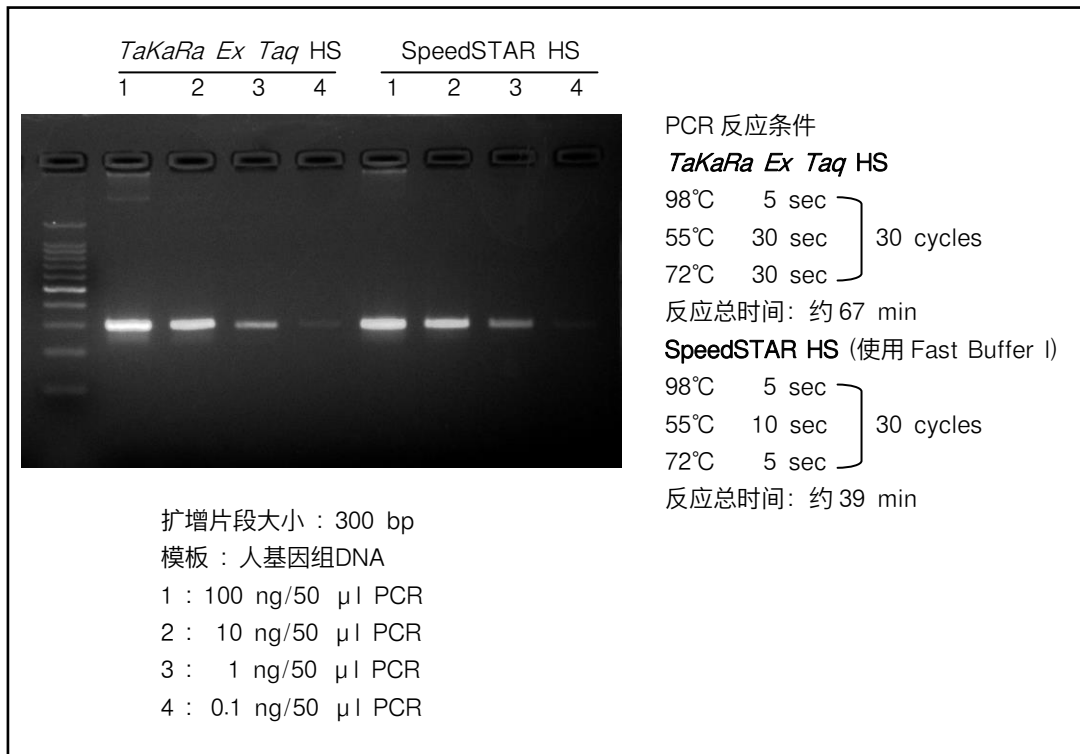
◆ 扩增 18 kb 和 20 kb 片段 (使用 Fast Buffer II)

94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
68°C 15 min } 30 cycles
↓
72°C 10 min

反应总时间: 约 8 hrs 16 min

【高灵敏度高效快速 PCR】

SpeedSTAR 和 *TaKaRa Ex Taq* HS 扩增不同片段大小时的检测灵敏度比较:



● 扩增产物

大多数使用 SpeedSTAR HS DNA Polymerase 得到的 PCR 扩增产物 3' 端有一个“A”碱基，可以直接克隆于 T-vector 中。扩增产物经末端平滑化和磷酸化后也可克隆于平滑末端载体中。

● Troubleshooting

问题 1：无扩增产物或扩增效率低

对策：1) 延伸时间：设定延伸时间为 20 sec/kb。

2) 退火温度：以 2°C 间隔降低退火温度；使用 3 step PCR。

3) 模板 DNA：重新纯化模板 DNA。扩增长片段时，尽量使用完整的、没有断裂的 DNA。

4) 引物：重新设计引物。增加引物加量。

问题 2：出现多余条带或 smear

对策：1) 延伸时间：延伸时间过长影响 PCR 反应。

参考以下原则设定延伸时间：2 step PCR：10 – 20 sec/kb；

3 step PCR：5 – 10 sec/kb。

2) 退火温度：以 2°C 间隔升高退火温度；使用 2 step PCR。

3) 模板 DNA：使用适量 DNA。模板量过多影响 PCR 反应。

4) 引物：减少引物加量。

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

SpeedSTAR 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。

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