

Code No. R050A

研究用

TaKaRa

PrimeSTAR[®] GXL DNA
Polymerase

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 操作流程	1
● 参数优化	3
● 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳、克隆	4
● Troubleshooting	5
● PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 的特点和实验例	5
● 关联产品	8

● 制品说明

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 是在 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 基础上进行改良的，制品中添加了 Takara 特别开发的 Extension 因子，使 PCR 反应性能有了飞跃性的提高，是一种高保真 DNA 聚合酶。

本制品不仅具有非常高的保真性，还兼备了其他高保真酶没有的优良的扩增性，可以扩增 30 kb 以上的大片段 DNA，并且，对于难以扩增的高 GC 含量模板，也不需要更换 Buffer 及设定特别反应条件就可获得扩增产物，成功率高，操作简便。相对于含有多量核酸易发生反应阻害的其他高保真 PCR 酶反应体系，本酶的模板量使用范围变得格外宽广。譬如可简单地从高浓度 cDNA 中检测出低表达量的基因等。

本制品是添加了在常温下能够抑制 DNA Polymerase 活性的抗体的 Hot Start 型 DNA 聚合酶，可有效地防止非特异性扩增。

本制品标准 PCR 反应的延伸时间为 1 min./kb。但当酶的使用量提高至 2 倍时，延伸时间缩短为 10 sec/kb，可对广泛的靶基因进行高速 PCR 扩增。

● 制品内容 (200 次量) *1

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/ μ l) *2	200 μ l
5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer (Mg ²⁺ plus) *3	1 ml $\times$ 2
dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 μ l

*1 标准操作流程、50 μ l 反应体系的使用次数。

*2 酶贮存液

50 mM	Tris-HCl (pH8.2, 4°C)
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	Tween 20
0.1%	Nonidet P-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)。

*3 Mg²⁺ 浓度为 5 mM (5 $\times$)。

● 保 存: -20°C。

● 操作流程

不仅介绍了延伸时间为 1 min/kb 的标准 PCR 反应操作流程，还介绍了 DNA 聚合酶的使用量为 2 倍、延伸时间为 10 sec./kb 的高速 PCR 反应的操作流程。

PCR 反应液的配制可在室温下进行，但 DNA 聚合酶等各种试剂在配制前请于冰上放置。

A. 标准操作流程

1. PCR 反应液的配制。

试剂	使用量	终浓度
5× PrimeSTAR GXL Buffer	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	参考参数优化(3)	
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1 μl	1.25 U/50 μl
灭菌水	up to 50 μl	

* 扩增 10 kb 以上的大片段 DNA 时，引物的终浓度为 0.2 μM。

2. PCR 反应条件。

【扩增 DNA 片段 ≤ 10 kb 时】

98°C	10 sec.	} 30 Cycles [3-step PCR]
55°C or 60°C*1	15 sec.	
68°C*2	1 min./kb	
or		
98°C	10 sec	} 30 cycles [2-step PCR]
68°C	1 min/kb	

*1 T_m 值（按照下面的公式计算）为 55°C 以上时 → 退火温度设定为 60°C。

T_m 值为 55°C 以下时 → 退火温度设定为 55°C。

$$\text{※T}_m \text{ 值 (°C)} = [(nA + nT) \times 2] + [(nC + nG) \times 4] - 5$$

n 表示引物中碱基个数

*2 进行 2 step PCR 和 3 step PCR 反应时，均可以将 Extension 温度设定为 68°C。

【扩增 DNA 片段为 10 kb–30 kb 时】

98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	10 min.	

【扩增 DNA 片段为 ≥ 30 kb 时】

98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	15 min.	

3. PCR 反应条件的选择。

- 扩增 10 kb 以下 DNA 片段时，请先尝试 3 step PCR。
- 对 GC rich 模板或扩增 10 kb 以上 DNA 片段时，推荐使用 2 step PCR。
- 无扩增产物或出现 Smear、非特异性扩增产物时，请参考 Troubleshooting 进行调整。

B. 高速 PCR 操作流程

1. PCR 反应液的配制。

试剂	使用量	终浓度
5× PrimeSTAR GXL Buffer	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	参考参数优化(3)	
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	2 μl	2.5 U/50 μl
灭菌水	up to 50 μl	

* 扩增 10 kb 以上的大片段 DNA 时，引物的终浓度为 0.2 μM。

2. PCR 反应条件。

【扩增 DNA 片段≤10 kb 时】

98°C	10 sec.	} 30 Cycles [3-step PCR]
55°C or 60°C*1	15 sec.	
68°C*2	10 sec./kb	

*1 T_m 值（按照下面的公式计算）为 55°C 以上时→退火温度设定为 60°C。

T_m 值为 55°C 以下时→退火温度设定为 55°C。

※T_m 值 (°C) = [(nA + nT) × 2] + [(nC + nG) × 4] – 5

n 表示引物中碱基数

*2 进行 3 step PCR 反应时，也将 Extension 温度设定为 68°C。

【扩增 DNA 片段为 10 kb–20 kb 时】

98°C	10 sec.	} 30 cycles [2-step PCR]
68°C	20 sec./kb	
or		
98°C	10 sec.	} 30 Cycles [3-step PCR]
60°C	15 sec.	
68°C	10 sec./kb	

3. PCR 反应条件的选择。

- 扩增 10 kb 以下 DNA 片段时，请使用 3 step PCR，不建议使用 2 step PCR。
- 扩增 10 kb 以上 DNA 片段时，要想缩短反应时间，请使用 3 step PCR；要想获得高特异性扩增，建议使用 2 step PCR。
- 对于 GC rich 模板，建议使用标准操作流程。
- 无扩增产物或出现 Smear、非特异性扩增产物时，请参照 Troubleshooting 进行调整。

● 参数优化

为了发挥 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 的最大性能、获得良好的 PCR 扩增结果，有必要按照适宜参数进行设定。

(1) Primer 的设计

引物最好利用专业引物设计软件进行设计（选择适宜的引物序列），如 OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc.)。

【扩增 DNA 片段≤10 kb 时】

一般引物长度为 20–25 mer 即可获得良好的扩增, 当引物的 T_m 值 (使用操作流程中的公式计算) 在 55°C 以上, 或引物长度在 25 mer 以上, 可进一步提高 PCR 反应的成功率。使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 时, 避免使用含次黄嘌呤核苷碱基 (Inosine) 的引物。

【扩增 DNA 片段>10 kb 时】

建议引物 T_m 值在 65°C 以上, 引物长度为 25–35 mer, 设计引物时 3' 端的 GC 含量不要过高。

【靶基因 GC rich 时】

建议引物的 T_m 值在 60°C 以上。

NOTE: 使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 时, 避免使用含次黄嘌呤核苷碱基 (Inosine) 的引物。

(2) dNTP 与 Mg^{2+}

由于 dNTP 具有螯合作用, dNTP 浓度过高就会使实际参与反应的 Mg^{2+} 浓度下降。

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 配带的 5 × PrimeSTAR GXL Buffer 中含有的 Mg^{2+} 终浓度为 1 mM、dNTP 终浓度为 200 μ M each, 是获得良好扩增结果的适宜反应体系。尽量避免变更 dNTP 在反应体系中的浓度。

使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 时, 不能用 dUTP 代替 dTTP (使反应性能明显下降)。

(3) 模板

建议使用的模板量如下(50 μ l 反应体系):

	(普通扩增时)	(扩增大片段 DNA 时)
人基因组 DNA	5 ng~500 ng	100 ng~500 ng
大肠杆菌基因组 DNA	100 pg~200 ng	10 ng~200 ng
Plasmid DNA	10 pg~10 ng	1 ng~10 ng
cDNA	25 ng~750 ng	250 ng~750 ng

* 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。

● 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳、克隆

(1) 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

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

NOTE: 使用 TBE Buffer 会导致电泳带在凝胶底部扩散, 不能获得清晰的、良好的电泳结果。

(2) 扩增产物的克隆

使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 扩增的 PCR 产物几乎都为平滑末端, 因此可直接 (必要时进行磷酸化反应) 克隆于平滑末端载体中。将 PCR 产物克隆于不带磷的平滑末端载体中时, 请使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027) 对 PCR 产物进行磷酸化处理。

(3) 限制酶处理时

对扩增产物进行限制酶处理时, 先进行苯酚/氯仿处理或使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Code No. 740609.50/.250) 等除去蛋白质。特别是使用 3'–末端突出的限制酶时 (例如 *Pst*I 等), 由于 PrimeSTAR GXL 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。

● Troubleshooting

现象	问题点	对策
无扩增产物、 扩增效率不良	引物的 T _m 值	参考参数优化 (1) 进行引物设计。
	退火温度	每次间隔 2°C 降低温度。
	引物浓度	合适的终浓度在 0.3~0.5 μM 之间选择。
	操作流程	尝试使用高速 PCR 操作流程。
	循环圈数	设定为 35~40 Cycles。
	模板纯度和量	使用适量的模板 DNA， 提高 DNA 的纯度。
出现杂带或 Smear 时	引物的 T _m 值	参考引物设计部分内容调整。
	退火温度	每次间隔 2°C 提高温度至 63°C。 尝试使用 2 Step PCR。 引物的 T _m 值在 50°C 以下时，尝试在 50°C~55°C 之间选择。
	Extension 时间	扩增片段在 1 kb 以下时，尝试将 Extension 时间缩短至 10 sec/kb。
	引物浓度	引物终浓度为 0.2 μM。
	循环圈数	设定为 25~30 Cycles。
	模板纯度	提高 DNA 的纯度。

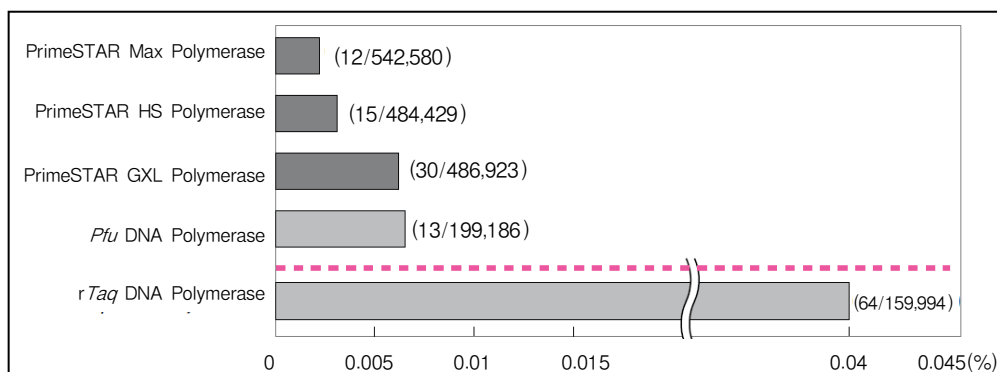
● PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 的特点和实验例

A. 保真性

通过分析序列数据检验 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 突变频率。

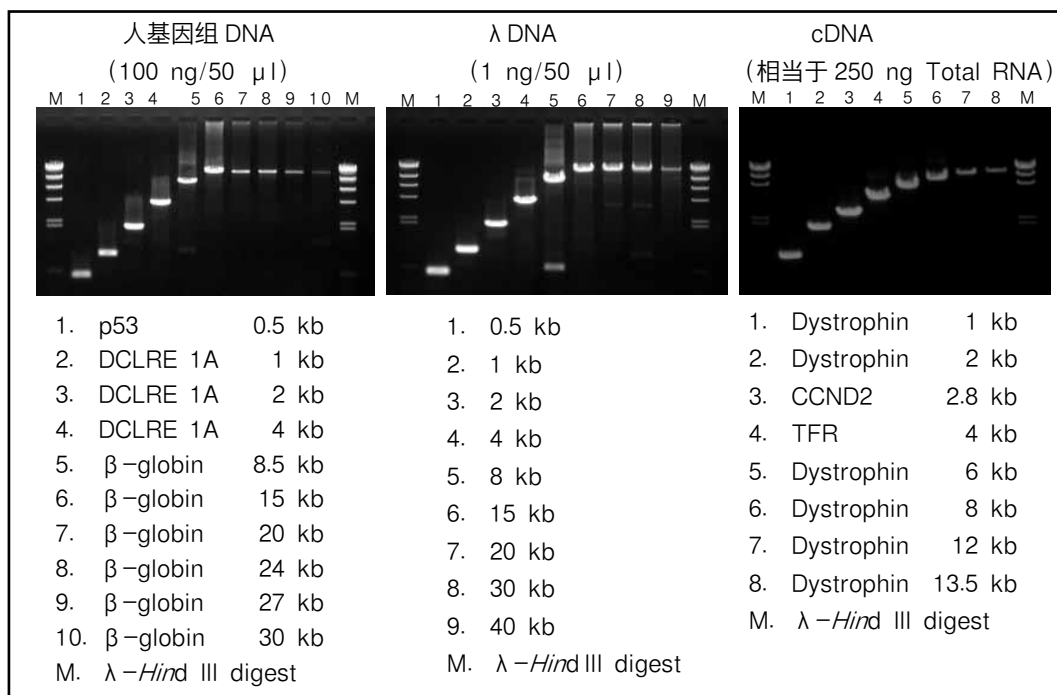
【方法】以富含 GC 序列并容易发生碱基突变的 *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA 为模板，任选 10 个区域（各扩增片段约 500 bp），使用几种不同的高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增后，将各自 PCR 产物克隆至载体中，并对每种序列挑取复数的克隆进行测序。以错配碱基数对总解析碱基数的比率来测定 mutation frequency（突变频率）。

【结果】使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 扩增的 PCR 产物（486,923 个碱基）的测序结果表明，有 30 个碱基发生了错配。从下图可以看出，本酶的保真性优于 *Pfu* DNA Polymerase。



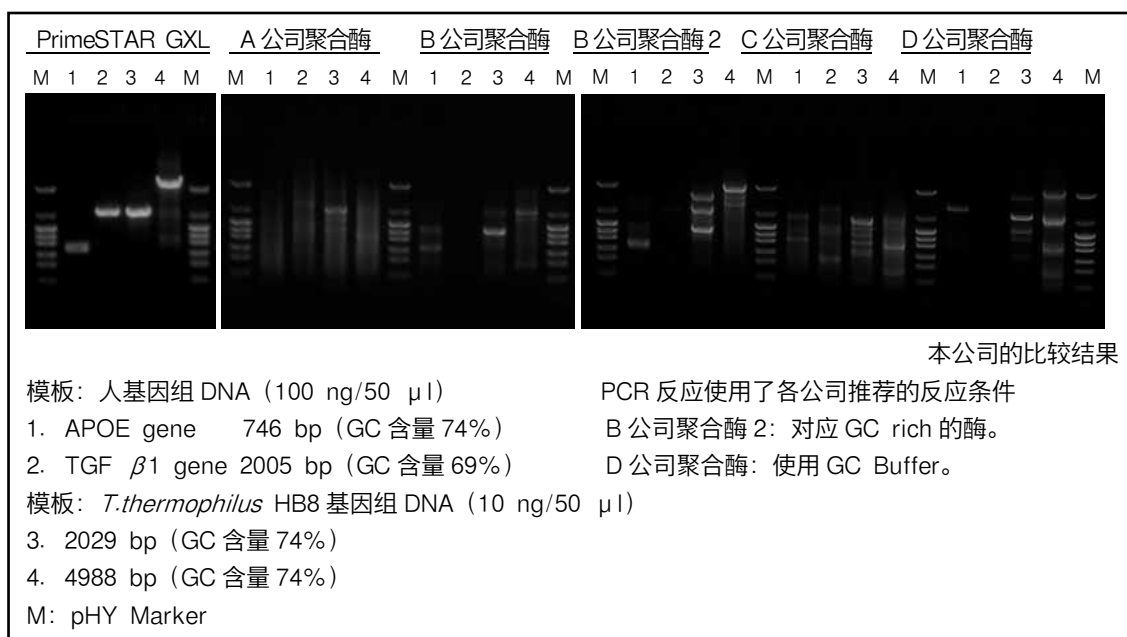
B. 延伸性

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 有着卓越的延伸性，可以扩增其他高保真 PCR 酶无法扩增的大片段 DNA。已确认以人基因组 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。



C. GC rich 靶基因的 DNA 扩增

对于易产生非特异性扩增的 GC rich 模板，无需更换特殊 Buffer 或设定特殊反应条件，即可实现高特异性的 PCR 扩增。按照各自实验操作，比较各公司同类酶性能如下：

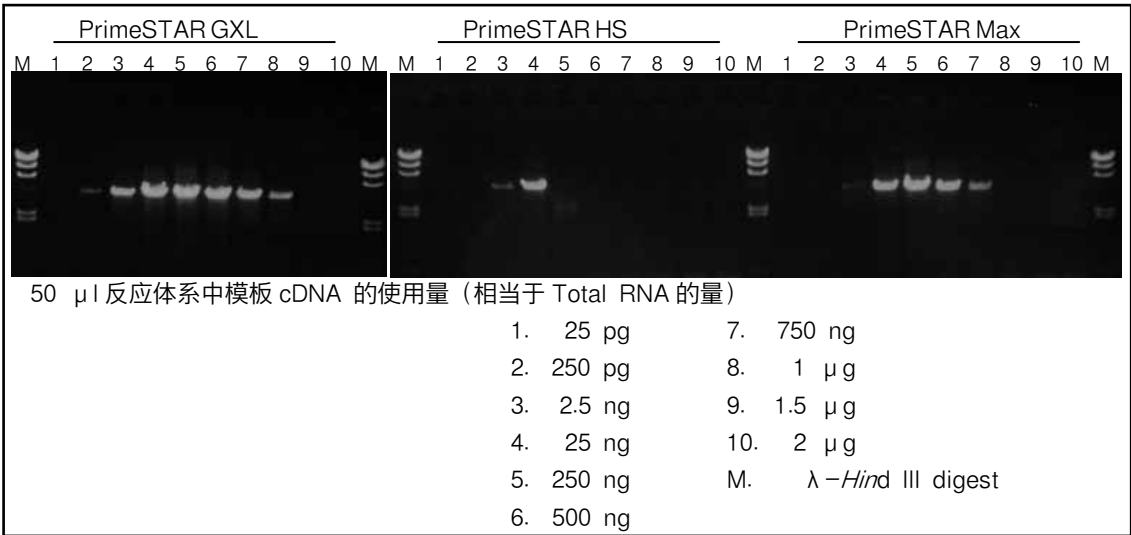


本公司的比较结果

D. 反应灵敏度与模板使用量范围

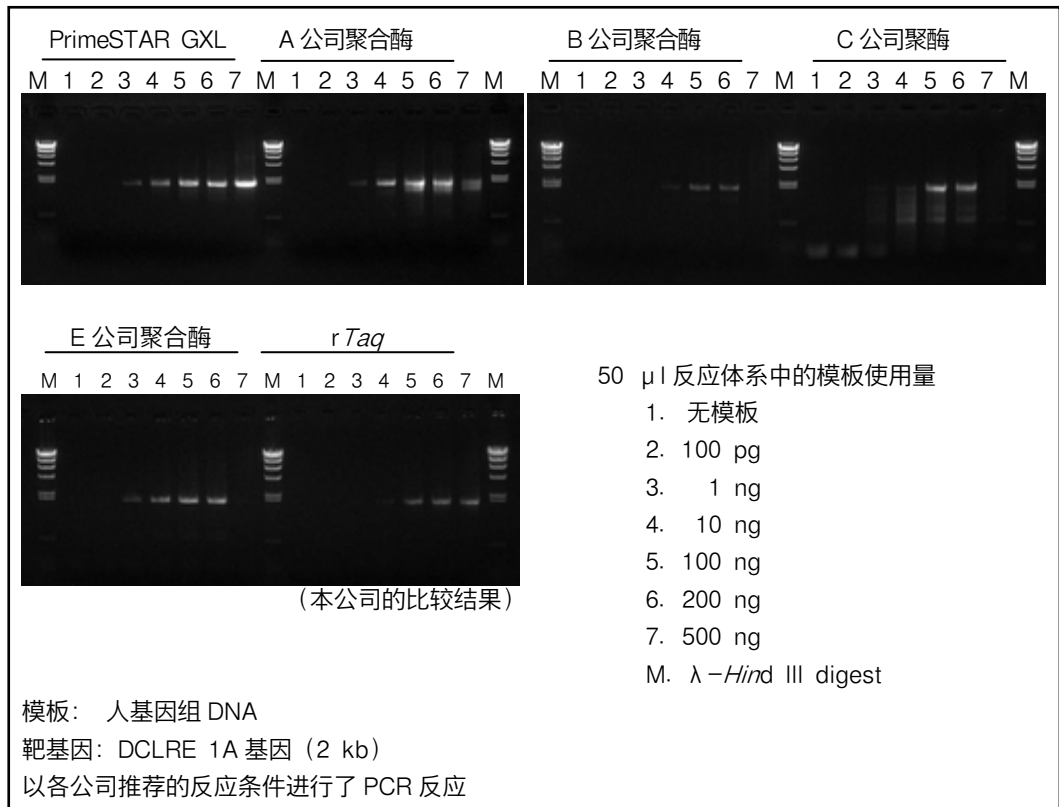
一般高保真 PCR 聚合酶容易受到反应液中剩余核酸量的影响，因此以 cDNA 为模板的扩增比较困难。而 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 对模板使用范围的适用性变得更宽，可以进行以 cDNA 为模板的高效 PCR 反应。

(1) 使用各种浓度的 HL60 细胞来源 Total RNA 进行反转录反应后获得的 cDNA 作为模板，分别使用 PrimeSTAR 系列聚合酶扩增 4 kb 的 transferrin receptor (TFR) 基因，并对反应灵敏度和模板量的使用范围进行了比较。



使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 可以在宽广的浓度范围内对 cDNA 进行良好的扩增，说明本制品具有良好的反应灵敏度及宽广的模板添加量范围。

(2) 以不同使用量的人基因组 DNA 为模板，对 PrimeSTAR GXL 和各公司的高保真 PCR 酶及 *rTaq* 的扩增效率进行了比较。



从以上结果可以看出，PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 比其他公司的高保真 PCR 酶及 *rTaq* 具有更高的反应灵敏度和更好的扩增性能。同时其他公司的高保真 PCR 酶存在由于模板使用量过多导致 PCR 反应受到抑制的现象，而在相同条件下使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 却可以获得良好的扩增结果。

● 关联产品

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)

PrimeSTAR[®] HS (Premix) (Code No. R040A)

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Code No. R045A)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[™] Gradient (Code No. TP600)

Mighty Cloning Reagent Set (Blunt end) (Code No. 6027)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Code No. 740609.50/.250)

Agarose L03 (Code No. 5003)

PrimeGel[™] Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)

PrimeSTAR is a registered trademark of TAKARA BIO INC.

Thermal Cycler Dice and PrimeGel 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。

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.takara.com.cn>

v201702Da