

# PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2

**Code No. R047S**      **Size: 625  $\mu$ l**  
**(for 25 reactions)**

**Code No. R047A**      **Size: 625  $\mu$ l x 4**  
**(for 100 reactions)**

## Description:

PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 is a high-performance PCR amplification system that offers the highest levels of fidelity and extension speed. By adding factors that enable rapid and accurate amplification, and optimizing the reaction composition, the success rate of target amplification in high-speed reactions has been improved while maintaining the fidelity of PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Cat. #R045A/B). PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 is a fully compatible and superior alternative to the existing one. Since this product is a 2X premixed reagent with an antibody-mediated hot start formulation to suppress DNA Polymerase activity and 3'  $\rightarrow$  5' exonuclease activity, it allows quick preparation of reactions at room temperature and is useful for high-throughput applications.

## <Features>

- Ultimate fidelity
- High-speed reaction (extension)
  - \* It can handle reactions involving large amounts of template DNA, which would ordinarily be difficult to amplify in high-speed reactions.
- High yield to the existing one
- Convenient premixed reagent, allowing easy reaction preps at room temperature

**Storage:** -20°C

**Note:** Gently mix well before use and centrifuge briefly. Repeated freeze-thaw of the Premix may reduce its activity.

## Electrophoresis, Cloning, and Sequencing of Amplified Products:

### (1) Electrophoresis

TAE Buffer is recommended for agarose gel electrophoresis of amplified products that are obtained using PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2.

**Note:** Use of TBE Buffer may result in DNA band patterns that are enlarged at the bottom of the gel.

### (2) Termini of amplified products

Most PCR products amplified with PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 have blunt-end termini. Accordingly, they can be cloned directly into blunt-end vectors. If necessary, phosphorylate the amplified products before cloning. Use of Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Cat. #6027) is recommended for cloning into a blunt-end vector. In addition, In-Fusion cloning system is also applicable.

### (3) Restriction enzyme reaction

Prior to performing restriction enzyme digestion of amplified PCR products, remove all traces of PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 from the reaction mixture by phenol/chloroform extraction or by using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Cat. #740609.10/.50/.250)\*. Particularly for 3'-protruding restriction enzymes such as *Pst* I, the 3'-protruding termini produced by these enzymes may be deleted by 3'  $\rightarrow$  5' exonuclease activity of PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2, if residual polymerase remains present in the restriction digest reaction.

### (4) Direct sequencing

Perform phenol/chloroform extraction of PCR products prior to direct sequencing to ensure inactivation of 3'  $\rightarrow$  5' exonuclease activity. Alternatively, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up\* may be used to purify DNA prior to sequencing.

\* Not available in all geographic locations. Check for availability in your area.

## General Composition of PCR Reaction Mixture (Total 50 $\mu$ l):

PrimeSTAR Max Ver.2 Premix (2X)	25 $\mu$ l (final conc. 1X)
Primer 1	10 - 15 pmol (final conc. 0.2 - 0.3 $\mu$ M)
Primer 2	10 - 15 pmol (final conc. 0.2 - 0.3 $\mu$ M)
Template	See "Template" chapter
Sterile purified water	up to 50 $\mu$ l

**Note:** The PCR reaction mixture can be prepared at room temperature. However, keep each of the reaction components on ice during the preparation process.

## PCR Conditions:

When performing rapid amplification protocols using PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2, 3-step reactions are recommended for best results.

For amplification of long or GC-rich targets, 2-step reactions are recommended when enhanced specificity is desired.

98°C *1	10 sec	} 30 - 35 cycle
55°C	5 or 15 sec*2	
68°C *3	5 - 10 sec/kb*4	
or		
98°C *1	10 sec	} 30 - 35 cycle
68°C *3	5 - 10 sec/kb*4	

### \*1 Denaturing conditions

During cycling, denaturation at 98°C for 5 to 10 sec is recommended. Denaturation at 94°C is also possible, but the time should be extended to 10 to 15 sec.

### \*2 Annealing time

For primer T<sub>m</sub> values of 55°C or greater, anneal for 5 sec.  
For primer T<sub>m</sub> values less than 55°C, anneal for 15 sec.

### [Important note]

Because the priming efficiency of PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 is extremely high, longer annealing times may cause smearing of PCR products visible during electrophoresis analysis.

### \* T<sub>m</sub> value calculation:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\text{NA} + \text{NT}) + 4(\text{NC} + \text{NG}) - 5$$

where N represents the number of primer nucleotides having the specified identity (A, T, C, or G)

### \*3 Extension temperature

Set to 68°C for both 2-step and 3-step PCR.

### \*4 Extension time (as a guideline)

Amplified Product Sizes  $\leq$  6 kb : 5 sec/kb (10 sec/kb for cDNA)  
Amplified Product Sizes > 6 kb : 10 sec/kb (20 sec/kb for cDNA)  
In some cases, increasing the extension time can increase the amplification yield.

\* Select primer sequences using primer design software such as OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc.).

\* Do not use inosine-containing primers with PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2.

## Template:

Recommended quantities of template DNA (for 50  $\mu$ l reaction)

Human genomic DNA	5 - 500 ng
<i>E. coli</i> genomic DNA	100 pg - 200 ng
Plasmid DNA	10 pg - 10 ng
cDNA	Equivalent of 10 - 1,000 ng of total RNA

\* Do not use templates containing uracil, such as bisulfite-treated DNA.

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.

## Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc.

If you require licenses for other use, please contact us by our website at [www.takarabio.com](http://www.takarabio.com).

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

# PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2

Code No. R047S 容量: 625  $\mu$ l  
(25 回反応分)

Code No. R047A 容量: 625  $\mu$ l  $\times$  4  
(100 回反応分)

## ● 製品説明

PrimeSTAR Max DNA Polymerase Ver.2 は、世界最高レベルの正確性と伸長速度を有する PCR 酵素である。迅速かつエラーの無い複製に寄与する促進因子を添加し、あわせて反応液組成を最適化することで、従来品 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B) の高い正確性を維持しながら、高速反応での増幅成功率が向上している。本製品は、従来品と置き換えが可能で、それ以上の性能を持つ。

本酵素は常温下での DNA Polymerase 活性および 3'→5' exonuclease 活性を抑えるモノクローナル抗体を用いたホットスタート用酵素であり、反応コンポーネントがプレミックス化されているため、常温で迅速に反応液を調製できる。

## <特長>

- ・非常に高い正確性
- ・高速反応 (トップクラスの伸長速度)
  - ※一般的に多量の鋳型 DNA の存在下では困難な高速反応にも対応
- ・従来品より増幅産物量がアップ
- ・簡便なプレミックス試薬。常温での反応液調製が可能

## ● 保存 - 20℃

注) 使用前には激しい攪拌を避け、転倒混和後スピンドアウンしてください。過剰に凍結融解を繰り返すと本製品に含まれる酵素の活性が低下する場合があります。

## ● 増幅産物の電気泳動、クローニング、シーケンスについて

### (1) 増幅産物の電気泳動

本酵素を用いて増幅した PCR 産物を電気泳動する場合は、TAE Buffer の使用を推奨する。TBE Buffer を使用すると、泳動パターンがやや裾広がりになり、きれいな泳動結果が得られない場合がある。

### (2) 増幅産物のクローニング

本酵素を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは平滑末端になっている。したがって、PCR 産物をそのまま (必要に応じてリン酸化を行って) 平滑末端のベクターにクローニングすることが可能である。平滑末端ベクターへのクローニングには Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) の使用を推奨する。T-vector にクローニングしたい場合には、3' 末端への dA 付加反応を行う必要があり、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (製品コード 6019) の使用を推奨する。また、In-Fusion クローニングも利用できる (弊社ウェブサイト参照)。

### (3) 制限酵素処理を行う場合

増幅産物を制限酵素処理する場合は、フェノール/クロロホルム処理、または NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/50/250) などを用いてタンパク質除去操作を行う。特に 3'-突出型の制限酵素 (例えば Pst I など) の場合、本酵素の 3'→5' exonuclease 活性が残存していると、制限酵素処理中に 3'-突出末端が削られる。

### (4) ダイレクトシーケンスを行う場合

本酵素は 3'→5' exonuclease 活性を有するため、ダイレクトシーケンスを行う前にフェノール/クロロホルム処理、または NucleoSpin Gel and PCR Clean-up などを用いたタンパク質除去操作を推奨する。

## ● 一般的な PCR 反応液量 (Total 50 $\mu$ l)

PrimeSTAR Max Ver.2 Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ l (final conc. 1 $\times$ )  
Primer 1 10~15 pmol (final conc. 0.2~0.3  $\mu$ M)  
Primer 2 10~15 pmol (final conc. 0.2~0.3  $\mu$ M)  
Template 「●推奨鋳型量」の項を参照  
滅菌精製水 up to 50  $\mu$ l

注) PCR 反応液の調製は室温でも可能です。ただし、酵素などの各試薬は氷上に置いてご使用ください。

## ● PCR 条件

本酵素を用いた PCR 反応では、伸長因子の効果を最大限発揮させるために 3 ステップでの反応を推奨する。GC rich な鋳型や長鎖などの特異性が要求される増幅には、2 ステップでの反応を推奨する。

98℃ \*1 10 sec.  
55℃ 5 or 15 sec.\*2  
68℃ \*3 5~10 sec./kb\*4 } 30~35 cycle

もしくは

98℃ \*1 10 sec.  
68℃ \*3 5~10 sec./kb\*4 } 30~35 cycle

### \* 1: 変性条件

98℃、5~10 sec. を推奨する。94℃で行う場合は 10~15 sec. に設定する。

### \* 2: アニール時間

Tm 値が 55℃以上の場合、5 sec. に設定する。  
Tm 値が 55℃未満の場合は、15 sec. に設定する。

### 【重要】

本酵素はプライミング効率が非常に高い酵素ですので、アニール時間が長くなると、スミアが生じる場合があります。

### ※ Tm 値の計算方法

Tm 値 (°C) = 2 (NA + NT) + 4 (NC + NG) - 5

プライマーの長さが 25 mer 以下の場合に適用する。25 mer を超える場合は、アニール時間を 5 sec. に設定する。

### \* 3: 伸長温度

3 step PCR、2 step PCR ともに 68℃に設定する。

### \* 4: 伸長時間 (目安)

増幅鎖長  $\leq$  6 kb : 5 sec./kb (鋳型が cDNA の場合は 10 sec./kb)  
増幅鎖長  $>$  6 kb : 10 sec./kb (鋳型が cDNA の場合は 20 sec./kb)  
伸長時間を長くすることで増幅量を増やせる場合がある。

※ プライマーは、プライマー設計ソフト (OLIGO Primer Analysis Software など) を利用するなどして、最適な配列を選択する。

※ 本酵素ではイノシンを含むプライマーの使用は避ける。

## ● 推奨鋳型量 (50 $\mu$ l 反応系の場合)

ヒトゲノム DNA 5~500 ng  
大腸菌ゲノム DNA 100 pg~200 ng  
プラスミド DNA 10 pg~10 ng  
逆転写産物 (cDNA) total RNA 10~1,000 ng 相当

※ バイサルファイト処理した DNA などのウラシルを含む鋳型は使用できない。

## ● 注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

v202403Da