PrimeSTAR® GXL U-Tolerant DNA Polymerase

Code No. R057S **Size: 1 ml (for 40 reactions)**

Code No. R057A **Size: 1 ml x 5 (for 200 reactions)**

Description:
PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase is a novel high-fidelity PCR enzyme that maintains the high fidelity and long-range extension capability of the conventional PrimeSTAR GXL series, while enabling amplification of uracil-containing DNA templates, such as bisulfite-treated DNA. Amplification of GC-rich templates is also possible without the need to set special reaction conditions.
This product is a premix reagent, optimized for fast PCR, in which the components required for PCR (enzyme, buffer, and dNTP mixture, etc.) are premixed in advance.
This enzyme is designed for hot start PCR using a monoclonal antibody that suppresses DNA polymerase activity and 3′ → 5′ exonuclease activity at room temperature.

<Features>
- Amplification of uracil-containing DNA templates
- High fidelity
- Long-range extension capability
- High-speed reaction
- Convenient premix reagent, allowing easy reaction preparation

Storage: -20℃

Note: Repeated excessive freeze-thawing may reduce enzyme activity. Freeze-thaw cycles up to 25 times have been confirmed not to affect performance.
Avoid vigorous vortexing. Mix by inversion and centrifuge briefly before use.

General Composition of PCR Reaction Mixture (total 50 μl):

PrimeSTAR GXL U-Tolerant Premix (2X)	25 μl (final conc. 1X)
primer 1	10 pmol (final conc. 0.2 μM)
primer 2	10 pmol (final conc. 0.2 μM)
Template	See (2) Template on the right
Sterile purified water	up to 50 μl

General PCR Conditions:

98℃	10 sec	30 cycles
55 or 60℃ *1	5 sec	
68℃ *2	5 - 10 sec/kb*3	
or		
98℃	10 sec	30 cycles
68℃ *2	5 - 10 sec/kb*3	

*1 When the Tm value of the primers is more than 55℃, set the annealing temperature to 60℃. When the Tm value is 55℃ or less, set the annealing temperature to 55℃.

Tm (℃) = [(the number of A and T) x 2] + [(the number of G and C) x 4] - 5

*2 For 3-step PCR, set the extension temperature to 68℃.

*3 Estimated extension time setting

amplification of products ≦ 10 kb: 5 sec/kb
amplification of products ＞ 10 kb: 10 sec/kb

The yield of the amplification product may be improved by increasing the extension time.

Selecting PCR Conditions
- For amplification of products ≦ 10 kb in length, try to perform 3-step PCR at first.
- For amplification of products ≧ 10 kb in length, or of GC-rich targets 2-step PCR is recommended.

Optimization of Reaction Parameters:
In order to obtain the best PCR results, it is important to optimize the PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase reaction parameters to fully utilize the enzyme's properties and advantages.

(1) Primer design
Select primer sequences using primer design software

[For ≦ 10 kb amplified products]
For general amplification, 20- to 25-mer primers are suitable. Selection of primers with a Tm value of > 55℃ or 25-mer or longer in length may provide optimal results.

[For >10 kb amplified products]
Design primers that are 25- to 35-mers and that have a Tm value of ≧ 65℃. Avoid high GC-content at the 3′ end of each primer.

[For GC-rich amplified products]
Design primers to have Tm values > 60℃.

Note: Do not use inosine-containing primers with PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase.

(2) Template: Recommended quantities of template DNA (for a 50 μl reaction):

		(for long PCR products)
Human genomic DNA	5 - 500 ng	(100 - 500 ng)
E. coli genomic DNA	100 pg - 200 ng	(10 - 200 ng)
Plasmid DNA	10 pg - 10 ng	(1 - 10 ng)
cDNA	25 - 750 ng	(250 - 750 ng)

Electrophoresis of Amplified Products:
TAE Buffer is recommended for agarose gel electrophoreses of PCR products amplified using PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase. TBE Buffer may distort bands, particularly small products at the bottom of the gel.

Termini of Amplified Products:
Most PCR products amplified with PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase have blunt-end termini. Therefore, direct TA cloning is not possible.
Use the Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Cat. #6027)* for cloning into a blunt-end vector. In-Fusion® cloning with In-Fusion Snap Assembly Master Mix series (Cat. #638947/638948/638949/638943/638944/638954/638955/638956) also can be recommended. If you want to clone amplified products into T-vectors, dA addition to the 3′end is required, and use of the Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Cat. #6019)* is recommended.

Restriction Enzyme Digestion:
Prior to performing restriction enzyme digestion of amplified PCR products, remove all traces of PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase from the reaction mixture by phenol/chloroform extraction or by using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Cat. #740609.10/.50/.250)* kit. A 3′-overhang produced with restriction enzyme, such as *Pst* I, may be removed by the 3′ → 5′ exonuclease activity of PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase if residual polymerase remains in the restriction enzyme reaction.

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

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.
In-Fusion is a registered trademark of Takara Bio USA, 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 from our website at 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.

v202608w

PrimeSTAR® GXL U-Tolerant DNA Polymerase

Code No. R057S　　容量：　1 ml（40 回反応分）

Code No. R057A　　容量：　1 ml × 5（200 回反応分）

● 製品説明

PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase は、従来の PrimeSTAR GXL シリーズが備える高い正確性と長鎖伸長能を維持しつつ、バイサルファイト（bisulfite）処理後などのウラシルを含む DNA を鋳型として増幅できる新規の High Fidelity PCR 酵素である。GC リッチな鋳型においても、特別な反応条件を設定することなく増幅が可能である。
本製品は、PCR に必要なコンポーネント（酵素、バッファー、dNTP Mixture 等）をあらかじめ混合した、高速 PCR 反応に最適化したプレミックス試薬である。
本製品に含まれる酵素は、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添加したホットスタート用 PCR 酵素である。

＜特長＞
・ウラシルを含む DNA 鋳型からの増幅
・高い正確性
・長鎖伸長能
・高速反応
・簡便に反応液調製が可能なプレミックス試薬

● 保存　　－ 20℃

注）過度な凍結融解の繰り返しにより、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。なお、凍結融解は 25 回まで性能に影響がないことを確認しております。
使用前には激しい攪拌を避け、転倒混和後スピンダウンしてください。

● 一般的な PCR 反応液量（Total 50 μl）

PrimeSTAR GXL U-Tolerant Premix（2×）	25 μl（final conc. 1×）
primer 1	10 pmol（final conc. 0.2 μM）
primer 2	10 pmol（final conc. 0.2 μM）
Template	右記の（2）推奨鋳型量を参照
滅菌精製水	up to 50 μl

● 一般的な PCR 条件

98℃	10 sec.	30 cycles
55 or 60℃ ＊1	5 sec.	
68℃ ＊2	5～10 sec./kb ＊3	

または

98℃	10 sec.	30 cycles
68℃ ＊2	5～10 sec./kb ＊3	

＊1：プライマーの Tm 値が 55℃を超える場合はアニーリング温度を 60℃に、Tm 値が 55℃以下の場合はアニーリング温度を 55℃に設定する。

Tm 値（℃）＝［（A、T の数）× 2］＋［（G、C の数）× 4］– 5

＊2：3 step PCR の場合も、伸長温度は 68℃に設定する。

＊3：伸長時間設定の目安

増幅鎖長 ≦ 10 kb：5 sec./kb
増幅鎖長 ＞ 10 kb：10 sec./kb

増幅量を増やしたい場合、伸長時間を長くすることで改善する場合がある。

PCR 条件の選択
・増幅鎖長が 10 kb 以下の場合は、まず 3 step PCR を試す。
・GC リッチな鋳型や 10 kb 以上の長鎖の増幅には、2 step PCR を推奨する。

● 至適パラメーターの設定

PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase の性能を最大限に引き出し、より良い PCR 増幅結果を得るために、至適パラメーターの設定が必要な場合がある。

（1）プライマー設計
プライマーは、できるだけプライマー設計ソフトを利用して、最適な配列を選択する。

［増幅鎖長が≦ 10 kb の場合］
基本的には 20～25 mer のプライマーでも良い結果が得られるが、Tm 値が 55℃を超えるように、もしくはプライマー長が 25 mer 以上となるよう設計することで PCR の成功率がさらに向上する。

［増幅鎖長が＞ 10 kb の場合］
Tm 値が 65℃以上で 25～35 mer のプライマー設計を推奨する。
また、プライマーの 3′ 端側の GC 含量が高くならないように設計する。

［GC リッチなターゲットの場合］
Tm 値が 60℃を超えるプライマーを推奨する。

※ イノシンを含むプライマーの使用は避ける。

（2）推奨鋳型量

		（長鎖増幅の場合）
ヒトゲノム DNA	5～500 ng	（100～500 ng）
大腸菌ゲノム DNA	100 pg～200 ng	（10～200 ng）
プラスミド DNA	10 pg～10 ng	（1～10 ng）
cDNA	25～750 ng	（250～750 ng）

● 増幅産物の電気泳動

PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase 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。

● PCR 産物について：増幅産物の末端形状

PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは、酵素の校正活性により平滑末端になっている。したがって、そのまま TA クローニングはできない。クローニングする場合は、In-Fusion クローニングもしくは平滑末端ベクターへのクローニングを推奨する。In-Fusion クローニングには In-Fusion Snap Assembly Master Mix シリーズ（製品コード 638947/638948/638949/638943/638944/638954/638955/638956）などを使用することができる。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）を使用することができる。T-vector にクローニングしたい場合は 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。

● 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、PrimeSTAR GXL U-Tolerant DNA Polymerase 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。

● 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。

v202608w

タカラバイオ株式会社
ウェブサイト　https://www.takara-bio.co.jp

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel　077-565-6999
Fax　077-565-6995