

Gloria Nova HS PCR Kit

TEL: 400-999-6126

目录号: RK20714

WEB: www.abclonal.com.cn

规格: 50 RXN / 200 RXN (50 µL/RXN)

产品组成:

Gloria Nova HS DNA Polymerase (2,000 U/mL)	RM20405
5X Gloria Nova HF Buffer	RM20182
2.5X Gloria Nova GC Buffer	RM20183
dNTPs (10 mM each)	RM20120

产品说明

Gloria Nova HS DNA 聚合酶是一种全新的具有优异扩增性能的高保真 DNA 聚合酶。Gloria Nova HS DNA 聚合酶具有独特的结构, 融合了持续合成增强结构域, 提高了保真度和延伸速度, 是分子克隆的理想选择。Gloria Nova DNA Polymerase 添加了能够抑制酶活性的单克隆抗体, 可进行高特异性的热启动 PCR。Gloria Nova 是目前保真度最高的热稳定 DNA 聚合酶之一, 其保真度显著高于 *Taq* DNA 聚合酶和 *Pyrococcus furiosus* DNA 聚合酶。Gloria Nova HS DNA 聚合酶具有 5'-3' 持续合成活性和 3'-5' 核酸外切酶活性, 其扩增产物为平末端。本试剂盒中包含 5X Gloria Nova HF Buffer 和 2.5X Gloria Nova GC Buffer 两种 buffer。其中 5X Gloria Nova HF Buffer 对多种模板如动植物基因组 DNA 和 cDNA 等均有很好的扩增效率。而 2.5X Gloria Nova GC Buffer 对难以扩增的 GC rich、AT rich 等复杂模板均能够进行很好的扩增。

产品来源

Gloria Nova HS DNA Polymerase 基因在大肠杆菌中诱导表达并分离纯化得到。

活性定义

1 活性单位(U)是指在 74°C 30 min 内, 将 10 nmol 脱氧核苷酸掺入到酸不溶性物质所需的酶量。

保存温度

-20°C

酶储存液

20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 µg/mL BSA, 50% Glycerol, 1X Stabilizers, pH 7.4 @ 25°C

热失活: 否

5'-3' 核酸外切酶活性: 无

3'-5' 核酸外切酶活性: 有

产物末端: 平末端

产品规格及组成:

组分	50 RXN	200 RXN
Gloria Nova HS DNA Polymerase (2,000 U/mL)	50 µL	200 µL
5X Gloria Nova HF Buffer	500 µL	1 mL*2
2.5X Gloria Nova GC Buffer	1 mL	1 mL*4
dNTPs (10 mM each)	50 µL	200 µL

操作说明

标准操作

- 推荐将所有的反应组分在冰上配制, 然后快速将反应体系转移到已经预热到 98°C 的 PCR 仪中。
- 所有组分在使用前应混匀并瞬时离心。请将其他反应组分混合后, 再最后加入 Gloria Nova HS DNA 聚合酶, 以防止其 3'-5' 核酸外切酶活性降解引物。
- 注意, Gloria Nova HS 聚合酶的操作方法可能与其他聚合酶的标准方法不同。因此, 请使用下面推荐的反应条件以获得最佳扩增效果。

推荐的 PCR 反应

5X Gloria Nova HF Buffer 反应体系

组分	加入量 (25 µL 体系)	加入量 (50 µL 体系)	终浓度
5X Gloria Nova HF Buffer	5 µL	10 µL	1X
上游引物 (10 µM)	0.5 µL	1 µL	0.2 µM
下游引物 (10 µM)	0.5 µL	1 µL	0.2 µM
DNA 模板*	Variable	Variable	<300 ng
dNTPs (10 mM)	0.5 µL	1 µL	0.2 mM
Gloria Nova HS DNA Polymerase	0.5 µL	1 µL	2 U/50 µL
ddH ₂ O	to 25 µL	to 50 µL	N/A

2.5X Gloria Nova GC Buffer 反应体系

组分	加入量 (25 μ L 体系)	加入量 (50 μ L 体系)	终浓度
2.5X Gloria Nova GC Buffer	10 μ L	20 μ L	1X
上游引物 (10 μ M)	0.5 μ L	1 μ L	0.2 μ M
下游引物 (10 μ M)	0.5 μ L	1 μ L	0.2 μ M
DNA 模板*	Variable	Variable	<300 ng
dNTPs (10 mM)	0.5 μ L	1 μ L	0.2 mM
Gloria Nova HS DNA Polymerase	0.5 μ L	1 μ L	2 U/50 μ L
ddH ₂ O	to 25 μ L	to 50 μ L	N/A

*，注：不同的 DNA 模板最佳反应浓度不同，可参考 PCR 基本原则。

推荐的 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	45 s	1
变性	98°C	10 s	25-35
退火	55-65°C	20-30 s	
延伸	72°C	10-30 s /kb	
终延伸	72°C	1-5 min	1
Hold	4-12°C	∞	1

PCR 基本原则

1. 模板

使用高质量纯化的 DNA 模板可以增加 PCR 的成功率。

推荐加入的 DNA 模板量 (50 μ L 反应体系)

DNA 类型	模板量*
植物、动物及人基因组 DNA	10 ng-300 ng
<i>E.coli</i> 、 <i>lambda</i> 基因组	10 ng-100 ng
质粒 DNA	1 pg-10 ng

*，注：如果 DNA 模板是从 cDNA 合成反应中获得的，则添加的体积应小于总反应体积的 10%。若扩增长片段，可适当增加模板投入量。

2. 引物

寡核苷酸引物长度通常在 20-40 nt 之间，理想的 GC 含量是 40-60%。可以使用软件（例如 Primer 3）设计和分析引物。PCR 反应体系中每条引物的终浓度可以在 0.2-1 μ M 范围内调整，一般使用 0.4 μ M。

3. 添加剂

添加剂能够改善困难模板的 PCR 扩增，如高 GC DNA 或二级结

构丰富的 DNA 模板。但需注意，2.5X Gloria Nova GC Buffer 中已经含有多种添加剂，如果使用其他的添加剂有可能会影响聚合酶的性能。

4. Gloria Nova HS DNA 聚合酶浓度

在 PCR 反应体系中一般推荐 Gloria Nova HS DNA 聚合酶的浓度是 2 U/50 μ L，可以通过优化 Gloria Nova HS DNA 聚合酶的浓度，提高产物的产量及特异性。

5. Buffer

该产品中含有 5X Gloria Nova HF Buffer 和 2.5X Gloria Nova GC Buffer。对于普通 PCR，可以选用 5X Gloria Nova HF Buffer，适用于多种模板、长片段模板的扩增；而对于高 GC DNA 或二级结构丰富的 DNA 模板，2.5X Gloria Nova GC Buffer 的扩增效果更好。

6. 变性

98°C 预变性 45 s 能使大多数纯化的 DNA 模板充分变性，但对于复杂的模板，可以将预变性时间延长到 3 min 以充分变性。在扩增循环中，对大多数 DNA 模板推荐的变性条件是 98°C 5-10 s。

7. 退火

Gloria Nova HS DNA 聚合酶的退火温度高于其它大多数 DNA 聚合酶。通常，对大于 20 nt 的引物，按(较低引物 Tm+3)°C 进行退火 10-30 s；对小于 20 nt 的引物，则应采用与较低引物 Tm 值相当的退火温度。使用新的引物对进行扩增时，最好通过温度梯度优化实验确定退火温度。使用两步法进行扩增循环时，需要将退火和延伸温度设置为同一温度。

8. 延伸

推荐延伸温度为 72°C，延伸时间取决于扩增基因的长度和复杂程度。通常可以按 10-30 s/kb 的延伸速度来计算延伸时间。对于复杂的扩增子，建议按 1 min/kb 的延伸速度计算延伸时间。

9. 循环数

通常进行 25-35 个循环可以得到足量的 PCR 产物。

10. PCR 产物

Gloria Nova HS DNA 聚合酶产生的 PCR 产物是平末端；如果下一步进行克隆实验，建议使用平末端克隆。如果需要进行 T/A 克隆，在加 A 前应先纯化 DNA，因为 Gloria Nova HS DNA 聚合酶会将降解产生的 dA 突出。可以使用 Taq DNA 聚合酶 (ABclonal RK20600) 或 Klenow exo⁻ (ABclonal RK20526) 对纯化的 DNA 加 dA。