

Gloria U HS DNA Polymerase Kit

目录: RK20721

规格: 50 RXN / 200 RXN (50 µL/RXN)

产品组成:

Gloria U HS DNA Polymerase	RM20409
5X Gloria U Reaction Buffer	RM20123

产品说明

Gloria U 热启动 DNA 聚合酶是通过 Gloria 修饰得到的 DNA 聚合酶, 可有效扩增含尿嘧啶的模板。Gloria U 聚合酶尿嘧啶结合能力失活, 可以高效扩增亚硫酸氢盐处理过 DNA, 而且该酶显示出了与 Gloria Nova 热启动 DNA 聚合酶相同的高产量。Gloria U 热启动高保真 DNA 聚合酶具有 5'-3'聚合酶和 3'-5'外切核酸酶(校正)活性, 但没有 5'-3'外切核酸酶活性。此聚合酶具有有效地参入 dUTP, 同时能够对含有 dUTP 的模板 DNA 进行有效地扩增, 能够识别含有 dUTP 的引物完成扩增的能力。

产品组分

组分	规格 50 RXN	规格 200 RXN
Gloria U HS DNA Polymerase	100 µL	400µL
5X Gloria U Reaction Buffer	500 µL	2 mL

保存条件: -20°C

注意事项

- 每 50 µL 反应体积使用 2 µL 的 Gloria U 热启动 DNA 聚合酶。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预热到 98°C 的 PCR 仪中。
- 反应中每个 dNTP 的浓度为 200 µM。dUTP 的添加量最高可达 200 µM。
- 所有组分在使用前应混匀并瞬时离心。将其他反应组分混合后, 最后加入 Gloria U DNA Polymerase, 防止其 3'-5'核酸外切酶活性对引物的降解。
- 注意 Gloria U 聚合酶的操作方法可能与其他聚合酶的标准有所不同。

操作方法

在打开前, 仔细混匀并离心所有试管, 以确保均匀。

推荐冰上配制反应体系, 将该体系快速转移到 98°C 预热的 PCR 中。请参考以下反应。

以 25 µL 和 50 µL 反应体系为例。

推荐 PCR 反应体系

组分	25 µL	50 µL	终浓度
5X Gloria U Reaction Buffer	5 µL	10 µL	1X
上游引物 (5 µM)	1 µL	2 µL	0.2 µM
下游引物 (5 µM)	1 µL	2 µL	0.2 µM
DNA 模板*	Variable	Variable	<300 ng
dNTPs (10 mM) (可使用 dUTP 进行替代 dTTP)	0.5 µL	1 µL	200 µM
Gloria U HS DNA Polymerase	1 µL	2 µL	
Nuclease-Free Water	to 25 µL	to 50 µL	N/A

注意: 温和混匀反应体系, 如果必要可以通过短暂快速离心将试剂收集到管底。若用户使用无热盖的 PCR 仪, 可以在反应体系表面覆盖一层矿物油。

*, 注: 不同 DNA 模板最佳反应浓度不同, 可参考 PCR 基本原则。

推荐的 PCR 反应程序如下

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 °C	45 s	1
变性	98 °C	10 s	30
退火	55-65 °C	1 min	
延伸	72 °C	30-60 s/kb	
终延伸	72 °C	1-5 min	1
Hold	4-12 °C	∞	1

产品应用

1. 亚硫酸氢盐转化的 DNA 的扩增

亚硫酸氢钠处理将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶不会被转化。在随后的 PCR 扩增过程中, 胸腺嘧啶替换尿嘧啶, 使得可以通过测序将 DNA 甲基化精确到碱基对水

平。Gloria U DNA 聚合酶能够提供高产量的亚硫酸氢盐转化的 DNA，并可进行稳定扩增。

2. 扩增受损的 DNA 样本

胞嘧啶脱氨作用会在一段较长的时间内自行发生，温度升高时脱氨速度加快，并导致 DNA 和游离核苷酸中尿嘧啶的累积。当其他校正酶无效时，Gloria U DNA 聚合酶可以从含有尿嘧啶的受损 DNA 模板中进行高保真扩增。

3. 采用 UDG 预防扩增子污染

Gloria U DNA 聚合酶在扩增过程中很容易掺入 dUTP，可达到 100% 掺入率，因此可与尿嘧啶-DNA-糖基化酶（UDG）联合使用，以防止残留污染。需要在 PCR 中加入 dUTP，以便在扩增前通过 UDG 的消化去除可能污染后续反应的扩增子。