

Gloria Nova HS 2X



WEB: www.abclonal.com

Master Mix

版本号: M16B01V1.1

目录: RK20717

规格: 1 mL / 5 mL

浓度: 2X

产品组成:

Gloria Nova HS 2X Master Mix	RM20408
------------------------------	---------

产品说明

Gloria Nova HS DNA 聚合酶具有高保真性和优异的扩增性能, 具有独特的结构, 是一种全新的类似 *Pyrococcus furiosus* 来源的突变酶, 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 HS DNA 聚合酶添加了能够抑制 5'-3'聚合酶活性的单克隆抗体, 可进行高特异性的热启动 PCR。Gloria Nova 拥有优异的保真性, 是目前保真度最高的热稳定 DNA 聚合酶之一。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, 无 5'-3'核酸外切酶活性, 其扩增产物是平末端。

Gloria Nova HS 2X HF Master Mix 是经过优化的预混液, 包含有 DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、KCl、稳定剂等, 只需加入模板和引物即可进行扩增, 针对多种模板如动物、植物、cDNA 等, 均有良好的扩增效率。

产品来源

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

活性定义

1 活性单位(U)是指在 74°C 30 min, 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

操作说明

标准操作

1. 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。
2. 注意, Gloria Nova HS 2X Master Mix with Dye 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。

推荐的反应体系如下:

组份	25 μL	50 μL	终浓度
Gloria Nova HS 2X Master Mix	12.5 μL	25 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
Nuclease-free Water	to 25 μL	to 50 μL	N/A

* 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	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

* 注: 对复杂的模板, 例如高 GC 序列, 可以延长预变性时间到 3 min 以充分变性。

** 注: 适当延长延伸时间有助于扩增产量的提高, 更多推荐条件可参考 PCR 基本原则。

PCR 基本原则

1. 模板

使用高质量纯化的 DNA 模板将增加 PCR 的成功率, 在 50 μL 反应体系中推荐加入的 DNA 模板量如下:

DNA 类型	模板量
植物, 动物及人基因组 DNA	10 ng-100 ng
<i>E.coli</i> , lambda 基因组	500 pg-200 ng
质粒 DNA	1 pg-10 ng

注意: 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是 20-40 nt, 理想 GC 含量 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 0.1-1 μ M 范围内调整, 一般使用 0.2 μ M。

3. 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。98°C 预变性 45 s 对大多数纯化的 DNA 模板能充分变性, 对复杂的模板, 例如高 GC 序列, 可以延长预变性时间到 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。

4. 退火

Gloria Nova HS DNA 聚合酶的退火温度往往高于其他 PCR 聚合酶。通常, 可以默认退火温度为 60°C; 对大于 20 nt 的引物, 按(较低引物 T_m+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 T_m 相当的退火温度。使用每个新的引物对进行扩增时, 需要通过温度梯度确定优化退火温度。使用两步法进行扩增循环, 温度梯度可以设置为与延伸温度相同。

5. 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 速度进行延伸。延伸时间对于简单模板如 *E.coli*, Lambda 在 10 s/kb 左右; 对于较为复杂的模板可以适当延长延伸时间在 20-30 s/kb 左右。对于复杂的扩增子, 如基因组 DNA, 建议按 1 min/kb 速度进行延伸。如果需要, 可以降低 cDNA 模板延伸速度到 1 min/kb。

6. 循环数

通常进行 25-35 个循环可以得到足量的 PCR 产物。

7. 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, 推荐使用无缝克隆 (ABclonal RK21020) 和拓扑克隆试剂盒 (ABclonal RK30130)。

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。

8. 复杂模板

对于常规 PCR 无法扩增的复杂模板(如长片段, T_m 分布不均匀, 特殊结构模板), 可以尝试两步法或者 touchdown 法。

两步法推荐反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	45 s	1
变性	98°C	10 s	25-35
退火/延伸*	65-72°C	60 s/kb	
终延伸	65-72°C	1-5 min	1
Hold	4-12°C	∞	1

*注: 一般情况下推荐 68°C, 具体可以根据 T_m 值改变

Touchdown 推荐反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	45 s	1
变性	98°C	10 s	5
延伸	74°C	10-30 s/kb	
变性	98°C	10 s	5
延伸	72°C	10-30 s/kb	
变性	98°C	10 s	5
延伸	70°C	10-30 s/kb	
变性	98°C	10 s	25
延伸	68°C	10-30 s/kb	
终延伸	72°C	1-5 min	1
Hold	4-12°C	∞	1