

产品组分

组分名称	组分编号	规格 1	规格 2
		1 mL	5 mL
Gloria Nova HS 2X Master Mix	RM20408	1 mL	1 mL × 5

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 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。

保存温度

-20°C

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 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 反应体系

组分	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

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, 推荐延长预变性时间到 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> DNA, lambda DNA	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 µM 范围内调整, 一般使用 0.2 µM。

3. 变性

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 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