

## 产品组分

组分名称	组分编号	规格 1	规格 2
		50 RXN(50 $\mu$ L 体系/RXN)	200 RXN (50 $\mu$ L 体系/RXN)
Gloria Nova HS DNA Polymerase (2,000 U/mL)	RM20405	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L
5X Gloria Nova HF Buffer	RM20182	500 $\mu$ L	1 mL $\times$ 2
2.5X Gloria Nova GC Buffer	RM20183	1 mL	1 mL $\times$ 4
dNTPs (10 mM each)	RM20120	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L

## 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，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，无 5'-3'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。

## 保存温度

-20°C

## 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。

## 酶储存液

20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 $\mu$ g/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. 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。
3. 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，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

#### 5X Gloria Nova HF Buffer 反应体系

组分	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	终浓度
5X Gloria Nova HF Buffer	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1X
上游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
下游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
DNA 模板*	Variable	Variable	<300 ng
dNTPs (10 mM)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 mM
Gloria Nova HS DNA Polymerase	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	2 U/50 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	to 25 $\mu$ L	to 50 $\mu$ L	N/A

#### 2.5X Gloria Nova GC Buffer 反应体系

组分	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	终浓度
2.5X Gloria Nova GC Buffer	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	1X
上游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
下游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
DNA 模板*	Variable	Variable	<300 ng
dNTPs (10 mM)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 mM
Gloria Nova HS DNA Polymerase	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	2 U/50 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	to 25 $\mu$ L	to 50 $\mu$ L	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：适当延长延伸时间有助于扩增产量的提高，对于复杂的扩增模板，如基因组 DNA，建议按 60 s/kb 速度进行延伸，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  $\mu$ L 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-300 ng
<i>E.coli</i> , lambda 基因组	10 ng-100 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  $\mu$ M 范围内调整，一般使用 0.2  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $T_m+3$ )°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  $T_m$  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，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。