

G5-Neo™ Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase (RedDye Plus)**货号:** G566**保存条件:** -20 °C**产品介绍:**

本品含有G5-Neo Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase和精心优化的2 × RedCrystal PCR Buffer Mix(含dNTPs、Mg²⁺离子、红色电泳指示剂等)。酶 + Red Buffer mix产品形式平衡了实验便捷性和实验过程中可能酶量优化的需求(一些难以扩增的体系或者杂带严重的引物体系微调酶量可能可以优化之)。G5-Neo添加了在常温下能够抑制其5'→3'聚合酶活性和3'→5'外切酶活性的化合物组合,提高了PCR特异性,可进行热启动PCR。此外G5-Neo添加了独特的延伸因子、特异性促进因子以及平台期解抑制因子,其性能卓越。基于定向进化,G5-Neo对PCR抑制物有很强的耐受性,可用于血液样品、细菌、真菌、植物组织、动物组织的直接PCR。G5-Neo具有5'→3'聚合活性和3'→5'的外切活性,保真度为Taq DNA Polymerase的50倍。本品扩增真核基因组(复杂模板)产物可达20 kb,扩增质粒(简单模板)产物可达40 kb,扩增产物为平端。除G5-Neo和Buffer Mix两个组分,PCR体系里面只需加入模板、引物和水即可。本产品含有电泳指示剂,可在PCR反应完成后直接点样进行电泳。

产品组成:

组分	G566-01
G5-Neo Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase(1 U/μL)	100 μL
2 × RedCrystal PCR Buffer Mix (含dNTPs、Mg ²⁺ 离子红色电泳指示剂)	1.25 mL × 2
DNase free H ₂ O	1.25 mL × 2

产品特点:

兼 · 模板种类兼容性强, GC兼容性强, 可用于样品直接扩增; 快 · 30-60秒/kb满足大部分扩增需求;
长 · 扩增长度长达40 kb(质粒); 真 · 保真度高;

温馨提示:

- G5-Neo Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase不能单独与DNase free H₂O混合, 必须在PCR Buffer Mix环境里;
- 过多RNA会抑制PCR, 如果基因组或者cDNA残留大量RNA, 可以稀释后使用或者重新纯化样本后使用;
- 镁离子是PCR关键因子, EDTA(EDTA抗凝血)等会螯合镁离子, 此类物质要远离PCR试剂, 含此类物质的模板请稀释模板使用或者补充镁离子;
- 请不要使用dUTP和含尿嘧啶的引物和模板;
- 一些难以扩增的体系或者杂带严重的引物体系微调酶量, 比如增加或者降低30-50%的标准酶量;
- 如果需要TA克隆PCR产物, 请务必纯化PCR产物后使用加A反应, 因为G5-Neo有非常强的校对活性;
- F/R引物的T_m最好接近, T_m值控制在55-65°C, 引物长度最好在22nt以上;
- 错配或者引入的序列最好放在引物5'端, 引物的3'端序列与模板要严格互补。引物不与模板配对的序列不参与T_m值的计算。

产品使用**A.推荐体系**

2 × RedCrystal PCR Buffer Mix、G5-Neo™ Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase 放冰上备用, 在冰上或者室温依次加入以下组分(G5-Neo最后加入), 推荐使用50μL体系(避免小体积移液器难以操作和PCR过程中小体积挥发):

	补足至 50* μL	补足至 20* μL
DNase free H ₂ O		
2 × RedCrystal PCR Buffer(含dNTPs,Mg ²⁺ 离子)	25 μL	10 μL
上游引物(10 μM)	2 μL	0.8 μL
下游引物(10 μM)	2 μL	0.8 μL
模板	X* μL	X* μL
G5-Neo High-Fidelity DNA Polymerase(1 U/μL)	1 μL	0.4 μL
Total	50 μL	20 μL

*可以等比例降低体系体积, 但不要小于20 μL。

*加入模板量一般基因组50 - 200 ng, 质粒0.1 - 10 ng, cDNA 1-5μL(未稀释cDNA体积不要超过体系的1/10体积)。

全血0.5μL-1μL(过多可能带入EDTA螯合镁离子), 叶片直径0.5-1毫米圆片(不要过多), 细胞直接加入1000-1万个作为模板。

B. 推荐程序

95 °C 30秒或者3 分钟[&]

95 °C 15 秒

Y* °C 15 秒

72 °C 30 秒/kb[#] (15-60秒/kb)

72 °C 5分钟彻底延伸

4 °C 保存

30-35 循环数

&: 基因组、cDNA预变性3分钟, 质粒、病毒等预变性30秒, 粗品预变性时间为5-10分钟。

*: 退火温度一般在 $T_m \pm 5^\circ\text{C}$ 之间尝试, 无产物或者产物少降低退火温度, 有非特异性产物提高退火温度, 也可以做一个退火温度梯度PCR来寻找最适退火温度。

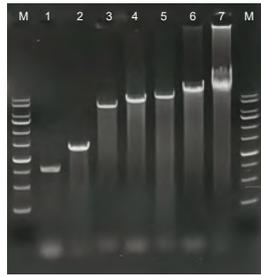
#: 默认情况下以30秒/kb为初始条件, 难扩增体系或者粗品模板可以尝试 60秒/kb, 简单体系或者简单模板可以尝试15秒/kb。

@: 一些难扩增体系, 退火时间调整为30秒, 延伸时间调整为90秒/kb, 酶量调整为1.5 μL -2 μL /50 μL 体系 (注意这样调整可能增加非特异性扩增)

案例

1. 几种长度DNA片段的扩增案例:

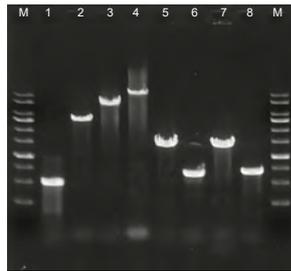
以人的cDNA、人的基因组、 λ DNA为模板, 使用G5-Neo Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase扩增1.5kb、2.6kb、7kb、8.5kb、10kb、17.5kb、20kb的片段, 使用标准体系配置, 延伸时间为: 30秒/kb。



M: 1 kb DNA Marker
1: 1.5kb, Human cDNA
2: 2.6kb, Human Genomic DNA
3: 7kb, Human Genomic DNA
4: 8.5kb, Human Genomic DNA
5: 10kb, Human Genomic DNA
6: 17.5kb, Human Genomic DNA
7: 20kb, λ DNA

2. 几种粗品扩增案例:

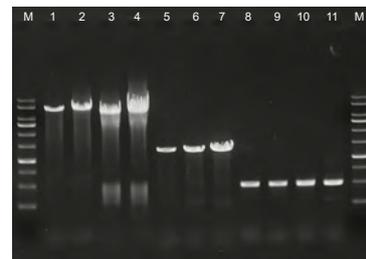
以水稻叶片、EDTA采血管采集的人全血、人293细胞、酵母、番茄叶片直接为模板, 使用G5-Neo Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase直接扩增1kb、5kb、7kb、10kb、2.6kb、1.2kb、2.7kb、1.3kb的片段, 使用标准体系配置, 延伸时间为: 30秒/kb, 预变性时间为10分钟(裂解样本)。



M: 1 kb DNA Marker
1: 1kb, 水稻叶片(直径0.5-1毫米)
2: 5kb, 水稻叶片(直径0.5-1毫米)
3: 7kb, EDTA采血管采集的人全血(0.5 μL)
4: 10kb, EDTA采血管采集的人全血(0.5 μL)
5: 2.6kb, 人293细胞(0.5 μL , 1.5×10^4 个/ μL)
6: 1.2kb, 酵母(0.5 μL)
7: 2.7kb, 酵母(0.5 μL)
8: 1.3kb, 番茄叶(直径0.5毫米)

3. 不同延伸速度案例:

以人的基因组、 λ DNA为模板, 使用G5-Neo Hot-Start High-Fidelity DNA Polymerase扩增7kb、6.9kb、2.6kb、1kb的片段, 使用标准体系配置, 延伸速度分别为: 1sec/kb、5sec/kb、15sec/kb、30sec/kb。



M: 1 kb DNA Marker
1: 7kb, Human Genomic DNA, 15sec/kb延伸
2: 7kb, Human Genomic DNA, 30sec/kb延伸
3: 6.9kb, λ DNA, 15sec/kb延伸
4: 6.9kb, λ DNA, 30sec/kb延伸
5: 2.6kb, Human Genomic DNA, 5sec/kb延伸
6: 2.6kb, Human Genomic DNA, 15sec/kb延伸
7: 2.6kb, Human Genomic DNA, 30sec/kb延伸
8: 1kb, Mouse Genomic DNA, 1sec/kb延伸
9: 1kb, Mouse Genomic DNA, 5sec/kb延伸
10: 1kb, Mouse Genomic DNA, 15sec/kb延伸
11: 1kb, Mouse Genomic DNA, 30sec/kb延伸

本品技术原理图

