

Imagene®

KOD DNA Polymerase

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

KOD DNA Polymerase

包装量:

| 目录编号 | 包装单位 |
|----------|-------|
| PR112-01 | 250 U |
| PR112-02 | 500 U |

| Components | PR112-01 | PR112-02 |
|---------------------------------|----------|----------|
| KOD DNA Polymerase | 250 U | 500 U |
| 10 × KOD Buffer | 1 ml | 1 ml |
| SuperPure dNTP mix (10 mM Each) | 0.1 ml | 0.2 ml |

产品储存: -20°C 保存

制品说明: KOD DNA Polymerase 是从克隆有 *Thermococcus Kodakaraensis* DNA 聚合酶基因的质粒在大肠杆菌中经诱导表达分离纯化而来。该酶所具有的超强 3'→5' 外切酶活性使得其扩增保真性比 Pfu DNA Polymerase 更高, 保真性是 Taq 的约 50 倍, 同时具有合成速度快的特点, 聚合速度约为普通 Pfu DNA Polymerase 的 5 倍, Taq DNA Polymerase 的 2 倍, 达到 100-138bp/秒, 可以在短时间内获得高产量的扩增产物, 特别适合于高保真地扩增 6kb 以内的 PCR 产物, 扩增所得的 DNA 为平末端, 可用于基因克隆、表达及突变分析等分子生物学实验。

注意: 高保真 KOD 对于 dNTP 纯度要求很高, 因此建议用本酶配套的超纯 dNTP mix。

活性定义: 75°C 活性测定条件下, 在 30min 内摄入 10nmoles 的 dNTPs 使成为酸性不溶物时所需要酶的活性定义为 1U。

用途: PCR, 尤其用于 PCR 产物的克隆, DNA 片段的平滑化。

建议 PCR 条件(以 50 μl 反应体系为例)

用无菌PCR级别的水补至终体积50 μl 。实际操作中计算好需补加水的量后，建议先加

| Components | Volume | Final Concentration |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Template | Variable | <0.5 μg |
| Forward Primer 10 μM | 1 μl | 0.2 μM |
| Reverse Primer 10 μM | 1 μl | 0.2 μM |
| 10 \times KOD Buffer | 5 μl | 1 \times |
| DNTP Mixture(10mM each) | 1 μl | 0.2 mM |
| KOD DNA Polymerase | 0.25-0.5 μl (1.25-2.5 U) | - |
| dH ₂ O | Up to 50 μl | |

水，然后按上述顺序添加其它成分，最后添加KOD DNA Polymerase。充分混匀后，离心数秒使反应混合物沉到管底。然后将反应管置于PCR仪中进行扩增。

注意：在冰浴上混合PCR各种成分，防止KOD DNA 聚合酶降解引物和模板。

PCR条件的优化

1. 质粒或者噬菌体模板：

模板量5-20ng，循环参数如下表

| Cycling parameters | <1kbp target DNA | 1-2kbp target DNA | 3-4kbp target DNA | 5-6kbp target DNA |
|---------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Step 1 | 94°C 2 min | 94 ° C 2 min | 94°C 2 min | 94°C 2 min |
| Step 2 | 94°C 20 sec | 94 ° C 20 sec | 94°C 20 sec | 94°C 30 sec |
| Step 3 | Ta 20 sec | Ta 20 sec | Ta 20 sec | Ta 30 sec |
| Step 4 | 72 ° C 5-15 sec | 72 ° C 20-30 sec | 72 ° C 40-50 sec | 72°C 60-70 sec |
| Step 5 | 72°C 5 min | 72 ° C 5 min | 72°C 5 min | 72°C 5 min |
| Repeat step 2-4 for 30-35cycles | | | | |
| Ta= Tm - 5°C | | | | |

2. 基因组DNA和cDNA模板：

基因组DNA模板量为50-100ng，1-2 μl cDNA（起始转录用的RNA为500ng），循环参数如下表

| | |
|---------------------------------|------------------|
| Cycling parameters | <2kbp target DNA |
| Step 1 | 94°C 2 min |
| Step 2 | 94°C 20-30 sec |
| Step 3 | Ta 15-20 sec |
| Step 4 | 72°C 20-60 sec |
| Step 5 | 72°C 5 min |
| Repeat step 2-4 for 30-35cycles | |
| Ta= Tm - 5°C | |

问题与解决方法:

| 问题 | 可能的原因 | 解决方法 |
|-----------|--|---|
| 没有 PCR 产物 | 设计的扩增靶序列太长 | 设计稍短的扩增靶序列，以基因组DNA为模板KOD 适合扩增不超过2kb左右的产物，以质粒和噬菌体DNA为模板适合扩增6kb以下的DNA。 |
| PCR 条带弥散 | 没有在冰上混合PCR反应液 KOD 扩增延伸速度为 1Kb/15-30 秒，具有比其它聚合酶更快的延伸速度 延伸时间过长，有时会有拖尾弥散效应。 | PCR 反应液应该在冰上混合，KOD DNA 聚合酶应该最后加，以防止KOD DNA聚合酶降解引物和模板。 如出现拖尾效应，可缩短退火延伸时间或者减少酶量。 |
| 低产量 | 模板为高GC含量 模板量太低 | 加入DMSO 2-5%，由于该酶的耐热性好，在应用于GC 含量高的模板等以及易产生高级结构的模板时，可在96°C以上进行变性。 提高模板量 |

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com

