

## KOD DNA Polymerase

### 包装量:

目录编号	包装单位
155601	250 U
155602	500 U

Components	155601	155602
KOD DNA Polymerase	250 U	500 U
10 × KOD Buffer	1 ml	1 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。

**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)

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

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充加水的量后,建议先加水,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 20 sec	72°C 30 sec	72°C 40 sec	72°C 60 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 $\mu$ l 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 sec
Step 3	Ta 20 sec
Step 4	72°C 20 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/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