



产品描述

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, 适用于 ClonMan™ 快速克隆试剂盒 (PN101/PN111/PN112 等)。

产品应用

用于 PCR, 尤其用于 PCR 产物的克隆, DNA 片段的平滑化等。

产品组成

组份	PC306-01 250U	PC306-02 500U	PC306-03 1000U
KOD DNA Polymerase (5U/μl)	50 μl	200 μl	
10 × KOD Buffer	0.5 ml	1 ml	PC306-02×2

产品储存

-20°C保存。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 74°C 30 分钟内, 摄入 10 nmol 的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测 : 10U 的本酶和 0.6 μg λ -Hind III 在 37°C 下孵育 16 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测 : 10U 的本酶和 0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA 在 37°C 下孵育 4 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

RNase 残留检测 : 10U 的本酶和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 1 小时, RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌 DNA 残留检测 : 10U 本品中残留的核酸经 *E.coli* 16s rDNA 特异性的 TaqMan qPCR 检测, *E.coli* 基因组残留低于 10 拷贝。

功能检测 : 50 μl PCR 体系中加入 1.25 U 本酶, 以 100ng 人基因组 DNA 为模板扩增 α -1-antitrypsin gene。30 个循环后将 1/10 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 可见有单一的 360bp 条带。

应用实例

1. 反应体系配置

ddH ₂ O	to 50μl
10 × KOD Buffer	5 μl
25 mM MgCl ₂ ①	optional
dNTP Mixture (10mM each)	1 μl
5 × PCR Enhancer ②	optional
Template③	optional
Primer 1 (10 μM)	2 μl
Primer 2 (10 μM)	2 μl
KOD DNA Polymerase (5U/μl) ④	0.5 μl

①. 对于大多数 PCR 反应, Mg²⁺最佳终浓度为 1.5-2 mM。体系中已含有终浓度为 2 mM 的 Mg²⁺, 如有需要, 可用 25 mM MgCl₂以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg²⁺最佳使用浓度。

②. 推荐仅当扩增片段 GC 含量 > 60%且优化条件也无法正常扩增时使用, 可能会降低保真度。(Protein#PC701)

③. 不同模板最佳反应浓度有所不同, 下表为 50 μl 反应体系推荐模板使用量 :

人基因组 DNA	50 ~ 100 ng
大肠杆菌基因组DNA	50 ~ 100 ng
λ DNA	5 ~ 20 ng
质粒 DNA	5 ~ 20 ng

④. 酶量可在 0.25-1 μl 之间调整。加大酶量在通常情况下可以提高扩增产量, 但有可能会使特异性下降。

2. PCR 反应循环的设置

94°C	2 ~ 5 min	} 30 ~ 35 cycles
94°C	20 sec	
55°C	20 sec	
72°C*	20 ~ 60 sec/kb	
72°C	5 min	

* < 1kbp target DNA (20 sec)/ 1-2kbp target DNA (30 sec)/ 3-4kbp target DNA (40 sec)/ 5-6kbp target DNA (60 sec)

常见问题与解决方案

常见问题	解决方案
没有 PCR 产物	设计的扩增靶序列太长。 建议: 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。 建议: 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。 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。 建议: 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。 建议: 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。 模板量太低。 建议: 提高模板量。