

KOD DNA Polymerase

产品包装:

PK00725	250U KOD,	10×KOD reaction buffer I,	10×KOD reaction buffer II,	25mM MgSO ₄
PK00750	500U KOD,	10×KOD reaction buffer I,	10×KOD reaction buffer II,	25mM MgSO ₄
PK00730	500U KOD×6,	10×KOD reaction buffer I,	10×KOD reaction buffer II,	25mM MgSO ₄

浓度: 2.5u/μl

储存条件: -20℃

产品说明:

KOD DNA polymerase 是从克隆有 *Thermus kodakaraensis* DNA polymerase 基因的载体在大肠杆菌中经诱导表达分离纯化而来。

KOD DNA polymerase 具有强力的 3'→5'核酸外切酶活性,其扩增保真性比 pfu DNA polymerase 更高。KOD DNA polymerase 具有合成速度快特点,聚合速度约为普通 pfu DNA polymerase 的 5 倍, Taq DNA polymerase 的 2 倍,可以在短时间内获得高产量的扩增产物,同时有利于复杂模板样品的扩增。适合于快速扩增保真度要求高的片段。

在 PCR 反应中, KOD DNA polymerase 延伸速度为 4Kb/min。PCR 产物为平端,可直接克隆于平滑末端的载体中,也可以加 A 处理后再进行 TA 载体连接。

产品特点:

高保真: 保真性比 pfu DNA polymerase 更高,是 Taq DNA polymerase 的 10 倍。

快速延伸: 扩增速度是 Taq DNA polymerase 的 2 倍, pfu DNA polymerase 的 5 倍。

高效率: 有利于富含 GC (65%) 和复杂模板的扩增

热稳定: 热稳定性比 Taq DNA polymerase 更好

产品用途:

高保真 PCR 快速扩增; 富含 GC 和复杂模板扩增; 平末端克隆; 定点突变。

单位定义:

在 74℃, 30min 内用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板-引物, 将 10nmol 脱氧核苷酸掺入到酸性不溶物质所需要的酶量定义为 1 单位活力 (U)。

质量控制:

SDS-PAGE 检测纯度大于 90%, 经检测无外源核酸酶活性。

PCR 方法检测无宿主残余 DNA, 能有效扩增人基因组单拷贝基因。

操作步骤: PCR 反应缓冲液 (以 50μl 反应体系为例)

Components	Volume	Final Conc
KOD DNA polymerase	0.25-0.5 μl	1.25-2.5units
10×KOD reaction buffer ⁽²⁾	5 μl	1×
25mM MgSO ₄	1 μl (1-5 μl)	0.5mM(推荐优先使用 0.5mM,可选浓度为 0.5-2.5mM)
dNTP mixture(2.5mM each)	4 μl	0.2-0.4mM
Primer 1 (10 μM)	1-2 μl	0.2-0.4 μM

Primer 2 (10 μ M)	1-2 μ l	0.2-0.4 μ m
Template DNA	1 μ l	As required
PCR water	Up to 50 μ l	NA

注: Buffer I 适应大多数模板的扩增。Buffer II 适应人基因组 DNA 模板和长片段 DNA (5-6kb) 的扩增。

模板 DNA 推荐使用量 (50 μ l PCR 反应体系)

Humang genomic DNA	5-200ng
E.coli genomic DNA	0.1-100ng
λ DNA	10pg-10ng
Plasmid DNA	10pg-50ng
cDNA	<200ng

PCR 反应条件:

Phage and plasmid DNA templates

	0.5Kb target DNA	1-2Kb target DNA	3-4Kb target DNA	5-6kb target DNA
Pre-denature	2min, 94 $^{\circ}$ C	2min, 94 $^{\circ}$ C	2min, 94 $^{\circ}$ C	2min, 94 $^{\circ}$ C
Denature	15s 98 $^{\circ}$ C	15S ,98 $^{\circ}$ C	15s, 98 $^{\circ}$ C	30s, 98 $^{\circ}$ C
Anneal	1-30s 68 $^{\circ}$ C	2s lowest primer Tm	5s lowest primer Tm	30s lowest primer Tm
Extend	None	20s 72 $^{\circ}$ C	40s 72 $^{\circ}$ C	60s 72 $^{\circ}$ C
20-30 cycles				

Genome DNA templates

	Up to 2kb
Pre-denature	2min 94 $^{\circ}$ C
Denature	15s 95 $^{\circ}$ C
Anneal	30s lowers primer Tm
Extend	30-60s 72 $^{\circ}$ C
30-40 cycles	

cDNA templates

	Up to 2kb
Pre-denature	2min 94 $^{\circ}$ C
Denature	20s 98 $^{\circ}$ C
Anneal	30s 68 $^{\circ}$ C
Extend	None
30cycles	

注: PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异,在实际操作中需要根据模板、目的片段的大小、碱基序列和引物长度的长短等具体情况,设定最佳的反应条件(温度、时间等)。

注意事项:

- 1、 KOD DNA polymerase 具有 3' \rightarrow 5' 外切酶活性,在没有 dNTP mixture 的情况下可以降解引物。因此 KOD DNA polymerase 一定要**最后加入**,并且要在冰上操作。
- 2、 PCR 反应液请在冰上配制,然后置于 PCR 仪上进行 PCR 反应。这种冷启动法可增强 PCR 扩增的特异性,减少 PCR 过程中的非特异性反应,能得到良好的 PCR 结果。