

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:101002-250  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

# KOD DNA 聚合酶

## KOD DNA Polymerase

使用手册 V1.4

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>KOD DNA Polymerase 是从克隆有 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> 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 100-138 bp/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 6 kb 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。</p>																										
<p><b>规格及成分</b></p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>塑料袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>KOD DNA 聚合酶 (5 U/uL)</td> <td>101002a</td> <td>50 uL</td> </tr> <tr> <td>10×KOD DNA 聚合酶缓冲液</td> <td>101002b</td> <td>1.0 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>101002sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	塑料袋包装	KOD DNA 聚合酶 (5 U/uL)	101002a	50 uL	10×KOD DNA 聚合酶缓冲液	101002b	1.0 mL	使用手册	101002sc	1 份													
成份	编号	塑料袋包装																									
KOD DNA 聚合酶 (5 U/uL)	101002a	50 uL																									
10×KOD DNA 聚合酶缓冲液	101002b	1.0 mL																									
使用手册	101002sc	1 份																									
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20℃保存、有效期一年。</p>																										
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>DNA 模板、引物、超纯水</p>																										
<p><b>使用方法</b></p>	<p>一、建议PCR条件 (以50 μL反应体系为例)</p> <table border="1" data-bbox="435 1131 1428 1659"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>体积</th> <th>终浓度</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>模板</td> <td>-</td> <td>&lt;0.5μg</td> </tr> <tr> <td>正向引物 (10 μM)</td> <td>1 μL</td> <td>0.2 μM</td> </tr> <tr> <td>反向引物 (10 μM)</td> <td>1 μL</td> <td>0.2 μM</td> </tr> <tr> <td>10×KOD DNA 聚合酶缓冲液</td> <td>5 μL</td> <td>1×</td> </tr> <tr> <td>dNTP Mixture (10mM each)</td> <td>1 μL</td> <td>0.2 mM</td> </tr> <tr> <td>KOD DNA 聚合酶</td> <td>0.25-0.5 μL (1.25-2.5U)</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>补足到 50 μL</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>注: 实际操作中计算好需补加水的量后, 建议先加水, 然后按上述顺序添加其它成分, 最后添加KOD DNA聚合酶。最好在冰浴上混合PCR各种成分, 防止KOD DNA聚合酶降解引物和模板。待各成分充分混匀后, 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。</p> <p>二、关于PCR条件的优化</p>			成分	体积	终浓度	模板	-	<0.5μg	正向引物 (10 μM)	1 μL	0.2 μM	反向引物 (10 μM)	1 μL	0.2 μM	10×KOD DNA 聚合酶缓冲液	5 μL	1×	dNTP Mixture (10mM each)	1 μL	0.2 mM	KOD DNA 聚合酶	0.25-0.5 μL (1.25-2.5U)	-	超纯水	补足到 50 μL	-
成分	体积	终浓度																									
模板	-	<0.5μg																									
正向引物 (10 μM)	1 μL	0.2 μM																									
反向引物 (10 μM)	1 μL	0.2 μM																									
10×KOD DNA 聚合酶缓冲液	5 μL	1×																									
dNTP Mixture (10mM each)	1 μL	0.2 mM																									
KOD DNA 聚合酶	0.25-0.5 μL (1.25-2.5U)	-																									
超纯水	补足到 50 μL	-																									

1. 质粒或者噬菌体模板（模板量5-20 ng，循环参数如下表）

循环参数	目标 DNA <1 kb	目标 DNA <2 kb	目标 DNA 3-4 kb	目标 DNA 5-6 kb
Step 1	94°C 2 分钟	94°C 2 分钟	94°C 2 分钟	94°C 2 分钟
Step 2	94°C 20 秒	94°C 20 秒	94°C 20 秒	94°C 30 秒
Step 3	Ta 20 秒	Ta 20 秒	Ta 20 秒	Ta 30 秒
Step 4	72°C 20 秒	72°C 30 秒	72°C 40 秒	72°C 60 秒
Step 5	72°C 5 分钟	72°C 5 分钟	72°C 5 分钟	72°C 5 分钟
Repeat step 2-4 for 30-35 个循环				
Ta= Tm - 5°C				

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

循环参数	目标 DNA <2 kb
Step 1	94°C 2 分钟
Step 2	94°C 20-30 秒
Step 3	Ta 15-20 秒
Step 4	72°C 20-60 秒
Step 5	72°C 5 分钟
Repeat step 2-4 for 30-35 个循环	
Ta= Tm - 5°C	

### 相关资料

### 活性定义

1 U 指 75°C条件下，30 分钟内使 10 nmoles 的 dNTPs 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

### 问题解决

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6 kb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	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。

		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。	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℃以上进行变性。 提高模板量
<b>关联产品</b>	Pfu DNA 聚合酶		