

2 × KOD PCR MasterMix



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 邮箱：info@aidlab.cn

使用说明书

包装量：

| 目录编号 | 包装单位 |
|--------|------|
| PC5701 | 1 ml |

| Components | PC5701 |
|-----------------------|--------|
| 2 × KOD PCR MasterMix | 1 ml |

产品储存：-20°C 保存

制品说明： 本产品包含 KOD DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液，浓度为 2×。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可最大限度的减少人为误差。本产品使用方便快捷，能避免 PCR 操作过程中的污染，使用时只需取适量 2×KOD PCR MasterMix 溶液，加入模板和引物，并加入去离子水补足体积，使 MasterMix 溶液浓度为 1×即可进行反应。使用前请保证充分溶解并混匀，操作需在冰上进行。KOD 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(复杂基因组 DNA 扩增建议不超过 2kb)，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，如反应体系不同，可按此比例增加或减少用量)

| 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 |
| 2× KOD PCR MasterMix | 25 μl | 1× |
| dH ₂ 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2× KOD PCR MasterMix（使用前请保证充分溶解并混匀）。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, 1-2µl 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 |