

2 × KOD PCR MasterMix 产品说明书

产品信息：

品名	货号	规格
2 × KOD PCR MasterMix	JXP9010	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	<1kb target DNA	1-2kb target DNA	3-4kb target DNA	5-6kb 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	T _a 20 sec	T _a 20 sec	T _a 20 sec	T _a 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				
T _a = T _m - 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	<2kb target DNA
Step 1	94°C 2 min
Step 2	94°C 20-30 sec
Step 3	T _a 15-20 sec
Step 4	72°C 20-60 sec
Step 5	72°C 5 min
Repeat step 2-4 for 30-35cycles	
T _a = T _m - 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

官方网址: www.genesion.com.cn

公司邮箱: GenXion@vip.qq.com

订货热线: 4006-169-114、020-84224925

