

# KOD DNA Polymerase



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](http://www.aidlab.cn) 邮箱：[info@aidlab.cn](mailto:info@aidlab.cn)

## 使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC5601	250 U
PC5602	500 U

Components	PC5601	PC5602
KOD DNA Polymerase	250 U	500 U
10 × KOD Buffer	1 ml	1 ml
SuperPure dNTP mix (10 mM Each)	0.1 ml	0.2 ml

产品储存：-20°C 保存

**制品说明：**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，可用于基因克隆、表达及突变分析等分子生物学实验。

**注意：**高保真 KOD 对于 dNTP 纯度要求很高，因此建议用本酶配套的超纯 dNTP mix。

**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)

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
10× KOD Buffer	5 μl	1×
DNTP Mixture( 10mM each)	1 μl	0.2 mM
KOD DNA Polymerase	0.25-0.5 μl( 1.25-2.5 U)	-
dH <sub>2</sub> 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 KOD DNA Polymerase。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