

## KOD DNA Polymerase 使用说明书

产品编号: FSL2631

规格: 500U (5U/μL)

保存: -20 度保存, 有效期 2 年。

### 产品说明:

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。

### 产品内容:

| Components                   | FSL2631-500U |
|------------------------------|--------------|
| KOD DNA Polymerase (5U/μL)   | 100μL        |
| 10×KOD DNA Polymerase Buffer | 1mL          |
| 说明书                          | 1 份          |

### 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。

反应体系：（50 $\mu$ l）

| Components                | Volume                        | Final Concentration |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Template                  | Variable                      | <0.5 $\mu$ g        |
| Forward Primer 10 $\mu$ M | 1 $\mu$ l                     | 0.2 $\mu$ M         |
| Reverse Primer 10 $\mu$ M | 1 $\mu$ l                     | 0.2 $\mu$ M         |
| 10 $\times$ KOD Buffer    | 5 $\mu$ l                     | 1 $\times$          |
| DNTP Mixture( 10mM each)  | 1 $\mu$ l                     | 0.2 mM              |
| KOD DNA Polymerase        | 0.25-0.5 $\mu$ l( 1.25-2.5 U) | -                   |
| dH <sub>2</sub> O         | Up to 50 $\mu$ l              |                     |

用无菌 PCR 级别的水补至终体积 50  $\mu$ l。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

### 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，1-2 $\mu$ l 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                    |                  |