

Imagene®

2×KOD PCR MasterMix (with Dye)

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CODONX

RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

2 × KOD PCR MasterMix (with Dye)

包装量:

目录编号	包装单位
PR113-01	1 ml

Components	PR113-01
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 μ 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2 \times 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 20 sec
Step 3	Ta 20 sec	Ta 20 sec	Ta 20 sec	Ta 20 sec
Step 4	72°C 20 sec	72°C 30 sec	72°C 40 sec	72°C 40 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 μ 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	

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℃以上进行变性。 提高模板量

密码子生物科技有限公司
http://www.codon.com.cn

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com

