

KOD Dash DNA Polymerase

Code No: GK1102-250U Storage: -20°C

产品组成	规格
KOD Dash DNA Polymerase	0.1 ml250U (2.5U/μl)
dNTPs	0.1 ml (10 mM)
MgCl ₂	1ml (20mM)
10×PCR buffer 1	1ml
10×PCR buffer 2	1ml

概述:

该酶通过将具有 3'—5'核酸外切酶活性的 KOD DNA Polymerase, 与通过基因工程手段使 3'—5'核酸外切酶活性失活的改良型 KOD 按照最适比例混合而成, 从而在 KOD 的提高了反应效率和延伸性等 PCR 性能。

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:

- 用于通常的 PCR 反应
- 直接发菌落 PCR 反应和病毒/细菌的快速检测
- 具有特异性结构的模板的 PCR 反应

特点:

- 伸长性: lambda DNA 可扩增 15kb
- 快捷的 DNA 合成速度, 扩增延伸速度为 1Kb/30 秒(约为 Taq 的 2 倍)!
- 优良的耐热性, 对处理 GC-rich 模板等具有特异性高级结构的的目的片段非常有利。同时可加入终浓度 2-5%的 DMSO, 有利于改善扩增效果
- 保真性是 Taq 酶的 3.4 倍左右

基本反应条件

成分	量	循环 (1)	循环 (2)	循环 (3)
KOD Dash DNA Polymerase	2.5 U	98°C 1min	98°C 1min	98°C 1min
10×PCR buffer 1	5 μl	98°C 15s	98°C 15s	98°C 15s
模板	1-50 ng (质粒)	Tm 5s	Tm 30s	68°C 40s/kb
	10-1000ng (基因组)	74°C 30s/1kb	74°C 30s/kb	
引物 (10uM)	1 μl	25-35cycles	25-35cycles	25-35cycles
dNTPs	0.2 mM			
Total	50 μl			

- 所配 buffer 中已含有 12mM Mg²⁺。
- 一般情况下使用 buffer1, 片段大于 4kb 或者扩增拖带时建议使用 buffer2。
- 当扩增片段大于 8kb 时 dNTPs 使用终浓度为 0.4mM。
- 如果在循环 (1) 条件无法扩增, 可使用循环 (2) 条件, 如果发现有拖尾效应时, 可使用循环 (3) 条件, 一般经过这些改变反应结果会有所改善。

10×PCR buffer1:

1.2M Tris-HCl (pH8.0) 100mM KCl 60mM (NH₄)₂SO₄ 12mM MgCl₂ 1% TritonX-100 100μg/ml BSA

10×PCR buffer2:

1.2M Tris-HCl (pH8.8) 100mM KCl 60mM (NH₄)₂SO₄ 12mM MgCl₂ 1% TritonX-100 100μg/ml
BSA 50% Glycerol

Storage buffer:

50mM Tris-HCl (pH8.0) 0.1mM EDTA 50mM KCl 1mM DTT 0.1%Tween-20 0.1% NP-40
50% Glycerol

几点建议:**➤ PCR 产物的克隆:**

该酶的 PCR 产物可以通过平滑末端克隆法进行克隆。此时若载体已进行了脱磷酸化处理,则可对 PCR 产物进行磷酸化处理,或者采用带 5'磷酸基的引物。

➤ PCR 条件的设定:

扩增延伸速度为 1Kb/30 秒,延伸时间过长,有时会有拖尾效应。如出现拖尾效应,可缩短延伸时间或者减少酶量。

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。

➤ 引物的设计:

建议将引物设计得比使用 Taq 酶时的要相对长一些为佳。使用 T_m 值高的引物时,可以进行循环 (3) 的建议 PCR 反应。另外采用 3'端有错配碱基的引物时,该酶有时会得到纠正。

➤ 程序设定:

延伸速度: 30s/kb 延伸温度: 74℃

长片段扩增程序建议用循环 (3), 延伸速度: 1min/kb