

KOF High-Fidelity DNA Polymerase

目录号: E003

01/ 产品描述

KOF 超保真 DNA 聚合酶是一种经过基因工程改造的高保真 DNA 聚合酶,具有极强的 3' → 5' 核酸外切酶活性(Proof-reading 活性),当聚合反应发生碱基错配时,聚合酶的校正活性可将错配的碱基切除。与普通 Pfu 酶相比,保真性更高,约为普通 Taq 酶的 80 倍。其扩增性能也比普通 Pfu 酶高,成功克服了普通 Pfu 酶扩增效率低的缺陷。

02/ 产品用途

用于要求保真度高的 PCR 反应,包括克隆 PCR、DNA 片段拼接、引入突变、全基因合成、DNA 片段的补平等。

03/ 活性定义

在 74℃ 条件下,30 分钟内催化 10nmol dNTPs 的掺入反应成为酸不溶性物质所需的酶量为一个单位。

04/ 质量控制

经多次柱纯化,SDS-PAGE 检测纯度大于 95%,qPCR 方法检测无大肠杆菌 DNA 残留,无核酸内、外切酶污染。

05/ 保存温度

-20℃。

06/ 产品包装

产品组成	E003-01A	E003-01B	E003-02A	E003-02B
KOF DNA Polymerase (1U/μl)	250μl	250μl × 5	250μl	250μl × 5
10×KOF Buffer with Mg ²⁺	1ml × 2	(1ml × 2) × 5	1ml × 2	(1ml × 2) × 5
dNTPs (10mM each)	250μl	250μl × 5	-	-

07/ 使用建议

KOF 超保真 DNA 聚合酶产生的 PCR 产物为平末端,无 3' 端"A"突出,除使用 NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂盒(Cat No: NR005)外,其它 PCR 产物的克隆方案有:

- 1) PCR 扩增前引物进行 5' 加磷修饰或将 PCR 产物磷酸化处理后再直接克隆于平末端的载体中;
- 2) 将扩增产物 3' 末端加 A 后再与 T 载体连接;
- 3) 引物中引入 15bp 与载体同源序列,利用 NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂盒(Cat No: NR005)直接连接到目的载体;
- 4) 由于 KOF 超保真 DNA 聚合酶的校正活性可引起引物从 3' 端被部分降解。因此在设计引物时应适当增加引物长度,理想引物长度为 20-30bp。另外为了减少由 3' → 5' 外切酶活性引起的引物降解,尽量在冰上配制反应体系,并最后加入 KOF 超保真 DNA 聚合酶。

08/ 注意事项

- 1) 2mM Mg²⁺可满足绝大多数 PCR 扩增,对于某些 PCR,为了保证较好的扩增,可调节为 2-4mM。
- 2) 体系中加入推荐的酶量,可以满足大多数 PCR 扩增,对于某些 PCR,为了得到较好的扩增,可适当增加酶量。

09/ 操作说明

1) 常用反应体系（50μl）：

10×KOF Buffer with Mg ²⁺ *	5μl
上游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
下游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
dNTPs (10mM each)	1μl
模板	1-50ng（质粒） 10ng-1μg（基因组）
KOF DNA Polymerase (1U/μl)	1μl (1U)
ddH ₂ O	至 50μl

*Mg²⁺终浓度为 2mM

2) 常用 PCR 反应程序：

当扩增片段<3K：

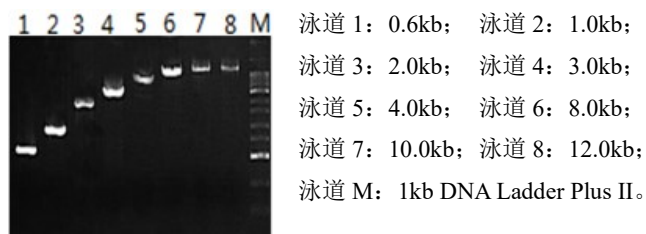
反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	94°C	10min	1
变性	94°C	20s	30
退火	50-60°C	20s	
延伸	72°C	1kb/60s	
终延伸	72°C	5min	1
保温	4°C	保温	1

当扩增片段≥3K（推荐引物长度≥30bp）：

反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	94°C	5min	1
变性	94°C	5s	30
退火/延伸	68°C	1kb/60s	
终延伸	72°C	5min	1
保温	4°C	保温	1

10/ 应用实例

图例一）50μl 扩增体系中，以 5ng λDNA 为模板，对 0.6kb~12kb 片段的扩增结果。



11/ 相关产品

目录号	产品名称	目录号	产品名称
E035	2×Fast Pfu Master Mix	E031	Fast Pfu DNA Polymerase
E006	2×Pfu Master Mix	E002	Pfu DNA Polymerase