天净沙系列

CAT#:220979

低温运输，-20℃保存

2×KOD PCR 预混液

2×KOD PCR MasterMix

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是用改良的 KOD DNA 聚合酶、dNTP 和反应缓冲液配制的即用型预混液。本产品具有下列特点:

1. 即开即用，非常方便。
2. 产品含有经过优化的缓冲液组分、改良 KOD DNA 聚合酶、dNTPs、氯化镁等所有实时定量 PCR 所需要的成分。
3. 产品为 2×预配液，操作步骤已经最大限度地简化，能减少污染，降低实验误差。
4. 所用的改良 KOD DNA 聚合酶保真性比 Pfu DNA 聚合酶高 5 倍，比 Taq DNA 聚合酶高 50 倍。
5. 特别适合于高保真地扩增 6 kb 以内的 PCR 产物。
6. 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。
7. 本产品足够 100 次 20 μL 体系的电泳法 PCR 扩增。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用塑料袋包装

成份	编号	规格	包装
2×KOD PCR 预混液	220979	1 mL	1.5mL 本色管
使用手册	220979sc	1 份	-

运输及保存

低温运输，-20℃保存、有效期一年。

自备试剂

DNA 模板、引物、超纯水

使用方法

注：以下操作步骤均在冰上进行，防止KOD DNA聚合酶降解引物和模板。

1. 如果有 N 个样品（最好含一个样本制备阳性对照和一个样本制备阴性对照）并且做定量分析，最好设置 N+7 个反应，多出的 7 个中，6 个用于 6 点标准曲线，一个是扩增阴性对照（NC)。在 N+7 个 PCR 管中，加入下列成分。如果是做定性分析，则 6 个做标准曲线的样品缩减成一个扩增阳性对照（PC)，用户自己需要根据下表进行适当修改（把 6 个标曲反应改成 1 个阳性对照反应)。

成分	N 个样品管	6个标准曲线管	NC 管
2×KOD PCR 预混液	各 10 μL	各 10 μL	10 μL
自备引物 1（10 μM)	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备引物 2（10 μM)	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备模板 DNA			

基因组 DNA	80 ng	不加	不加
或质粒 DNA	20 ng	不加	不加
或 cDNA	300 ng	不加	不加
或粗提液	2 μL	不加	不加
自备阳性对照模板（6 各梯度）	不加	各 1 μL	不加
阴性对照模板（一般用水）	不加	不加	1 μL
自备 50×自备 ROX I 或 ROX II 染料（见附）	各 0.4 μL	各 0.4 μL	0.4 μL
补超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

2. 放入荧光 PCR 仪中进行扩增，下表的扩增参数仅供参考。

循环步骤	参数	备注
预变性	94°C 2 分钟	
PCR（30-35 次循环）	94°C 20 秒	
	Ta 20 秒	Ta=Tm-5℃
	72℃ 10-20 秒/kb	（采集 SYBR 通道的荧光信号）
终延伸	72℃ 5 分钟	
溶解曲线分析	按 qPCR 仪器手册执行	

3. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟扩增阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟扩增阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
4. 如果两种阴性对照（样本制备阴性对照和扩增阴性对照）的溶解曲线所得 Tm 值跟扩增阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
5. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
6. 对定量检测，以 6 个标准曲线样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。
7. 对定性检测，则得到有效 Ct 值的样本为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

附：

下列信息仅供参考，具体以 qPCR 仪器的使用手册为准。

	1．不需要 ROX 的机型：Agilent MX3000 和 MX4000、iCycler IQ、LightCycler 480、 Smart Cycler System、Thermal Cycler Dice Real Time System 等型号的荧光 PCR 仪器不需要加 ROX 染料，但加入的话也不会影响整个 PCR 分析。 2．需要使用 ROX I 的机型：ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。 8. 3. 需要使用 ROX II 的机型：ABI Prism7500、7500 Fast、MJ Opticon、MJ Chromo4、 Corbett RotorGene 3000。
关联产品	KOD DNA 聚合酶

20250918ztl