

2 × Phanta[®] Master Mix

P511-01/02/03



Vazyme Biotech Co., Ltd

Web: www.vazyme.com

Tel: 400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

Service: service@vazyme.com



ISO 9001: 2015



www.vazyme.com

Vazyme biotech co., Ltd.

使用说明书

Version 10.2

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/单位定义	02
05/质量控制	02
06/实验流程	03
06-1/普通PCR操作流程	03
06-2/高GC含量模板PCR操作流程	03
07/应用实例	04
07-1/值得信赖的高保真度	04
07-2/广泛的适用性	04
08/注意事项	05
09/常见问题与解决方案	06

01/产品概述

Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase是一种基于Pfu DNA Polymerase改造而成的新一代超保真DNA聚合酶，具有极高的扩增效率和广泛的模板适应性，几乎适用于所有PCR反应。经过对Pfu DNA Polymerase的基因工程改造，Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase的行进性得到了大幅度提升，即使是非常复杂的模板，也能准确快速地完成反应。其错配率是普通Taq酶的1/52，是Pfu酶的1/6，并且扩增速度可以达到15 - 30 sec/kb。高保真性以及卓越的扩增效率使得Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase成为高保真PCR反应的优选酶。本产品包含Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase、dNTP以及优化的缓冲体系，只需加入引物和模板即可进行扩增，减少了移液操作，提高了检测通量和结果的重现性。扩增体系中加入的保护剂使得2 × Master Mix经过反复冻融后仍可以保持稳定的活性。扩增产物为平端，适用于ClonExpress[®]和拓朴克隆试剂盒(C112/C113/C115/C601)。

02/产品组分

组分	P511-01	P511-02	P511-03
2 × Phanta Master Mix	1 ml	5 × 1 ml	15 × 1 ml

03/保存条件

-30 ~ -15°C保存；运输条件：≤0°C。

▲ 避免反复冻融。

04/单位定义

用活化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，74°C 30 min内，摄入10 nmol的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为1个活性单位(U)。

05/质量控制

核酸内切酶残留检测：25 μl本品和0.3 μg Supercoiled pBR322 DNA在37°C下孵育4 h，经琼脂糖凝胶电泳检测，DNA的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留DNA检测：25 μl本品中残留的核酸经*E. coli* gDNA特异性引物进行SYBR Green qPCR检测，*E. coli*基因组残留低于10拷贝。

功能检测1：50 μl PCR体系中加入25 μl本品，以100 ng人基因组DNA为模板，扩增30个循环后取1/10的PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见单一的7.5 kb条带。

功能检测2：50 μl PCR体系中加入25 μl本品，以10 ng λDNA为模板，扩增30个循环后取1/10的PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见单一的15 kb条带。

06/实验流程

06-1/普通PCR操作流程

反应体系

所有操作请在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回-20℃保存。

ddH ₂ O	to 50 μl
2 × Phanta Master Mix	25 μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
模板DNA*	x μl

* 不同模板最佳反应浓度有所不同，下表为50 μl体系推荐模板使用量：

	<1 kb	1 - 10 kb	>10 kb
基因组DNA	50 - 250 ng	100 - 300 ng	150 - 400 ng
质粒或病毒DNA	10 pg - 20 ng	10 pg - 20 ng	1 - 30 ng
cDNA	1 - 5 μl*	1 - 5 μl	1 - 5 μl

* 若模板为cDNA，模板加入量不超过PCR反应总体积的1/10。

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	95℃	30 sec - 3 min	} 25 - 35
变性 ^b	95℃	5 - 10 sec	
退火 ^c	60℃	10 - 30 sec	
延伸	72℃	15 - 30 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 - 10 min	

- 推荐大多数模板的预变性温度为95℃。若扩增子超过10 kb，预变性温度可降至92℃，时间不超过2 min。
- 对于大多数模板，95℃变性时间设为5 - 10 sec即可。若扩增子超过10 kb，变性温度可降至92℃，并延长变性时间至15 sec。
- 一般来说，退火温度设置为引物T_m值±3℃范围之内即可。如果需要，可以建立一个温度梯度寻找引物模板结合的最适温度。退火时间过长可能导致扩增产物呈弥散状。因此，推荐退火时间设置为10 sec即可。对于一些困难模板，退火时间可在10 - 30 sec之间调整。

06-2/高GC含量模板PCR操作流程

反应体系

ddH ₂ O	to 50 μl
2 × Phanta Master Mix	25 μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
模板DNA	x μl

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	98℃	3 min	} 25 - 35
变性 ^b	98℃	10 sec	
退火 ^c	45 ~ 72℃	10 - 30 sec	
延伸	72℃	15 - 30 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 - 10 min	

a. 对于高GC含量模板，预变性温度可提升至98℃，预变性时间为2 - 4 min。

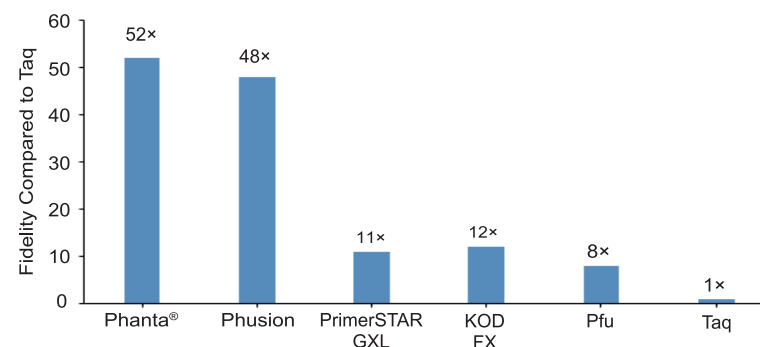
b. 对于高GC含量模板，变性温度可提升至98℃，变性时间为10 sec。

c. 对于困难模板，退火温度和退火时间可根据实际情况进行调整。

07/应用实例

07-1/值得信赖的高保真度

使用Lacl法测定(Cline et al., Nucleic Acids Research, 24:3546-3551(1996)), Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase保真性是普通Taq DNA Polymerase的52倍，是野生型Pfu DNA Polymerase的6倍。



07-2/广泛的适用性

以人基因组、小鼠基因组、小麦基因组、水稻基因组和λDNA为模板，使用2 × Phanta® Master Mix以30 sec/kb的延伸速度分别扩增200 bp、600 bp、800 bp、1 kb、1.2 kb、2.0 kb的目标片段。所有片段均可以实现特异性高产量扩增。所有扩增引物T_m值均为60℃左右(使用Primer Premier 5计算)。反应体系及扩增程序如下：

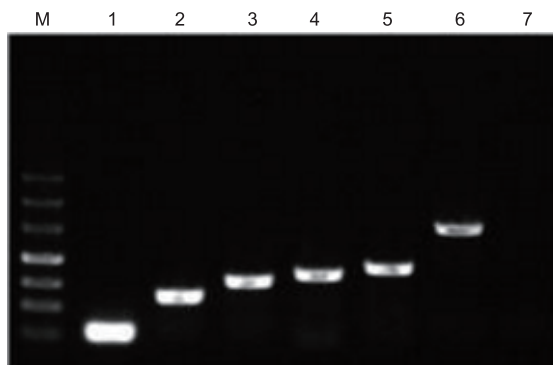
反应体系

ddH ₂ O	to 50 μl
2 × Phanta Master Mix	25 μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
模板DNA	x μl

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	
变性	95°C	10 sec	} 35
退火	60°C	15 sec	
延伸	72°C	30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	10 min	

扩增产物电泳检测结果



M: DL5000 DNA Marker
 1: 人基因组, 200 bp
 2: 小鼠基因组, 600 bp
 3: 小麦基因组, 800 bp
 4: 水稻基因组, 1 kb
 5: λDNA, 1.2 kb
 6: 人基因组, 2 kb
 7: 空白

08/注意事项

1. 请使用高质量的模板。
2. 请勿使用dUTP和带有尿嘧啶的引物和模板。
3. 2 × Phanta® Master Mix中含有的Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase具有较强的校对活性。因此，如扩增产物需要进行TA克隆，加A之前必须进行DNA纯化。
4. 引物设计
 - 引物3'端最后一个碱基最好为G或者C；
 - 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配；
 - 引物3'端应避免出现发夹结构；
 - 正向引物和反向引物的Tm值相差不超过1°C为佳，Tm值调整至55~65°C为佳(引物Tm值推荐使用Primer Premier 5进行计算)；
 - 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物Tm值计算；
 - 引物的GC含量控制在40% - 60%之间；
 - 引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀，避免使用GC或者AT含量高的区域；
 - 引物内部或者两条引物之间避免有5个碱基以上的互补序列，两条引物的3'端避免有3个碱基以上的互补序列；
 - 引物设计完毕请使用NCBI BLAST功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

09/常见问题与解决方案

◇ 无产物或产物量少

引物	优化引物设计
退火温度	设置退火温度梯度，找到合适的退火温度
引物浓度	适当提高引物浓度
延伸时间	适当增加延伸时间至30 sec/kb - 1 min/kb
循环数	增加循环数至35 - 40个循环
模板纯度	使用高纯度模板
模板使用量	使用量可参照反应体系推荐量并适量增加

◇ 有杂带或弥散条带

引物	优化引物设计
退火温度	尝试提高退火温度并设置退火温度梯度
引物浓度	降低引物浓度至终浓度为0.2 μM
延伸时间	有大于目标条带的杂带时可适当减少延伸时间
循环数	减少循环数至25 - 30个循环
反应程序	使用两步法或Touchdown PCR程序
模板纯度	使用高纯度模板
模板使用量	使用量参照反应体系推荐量调整或适当减少