Phanta® HS Super-Fidelity DNA Polymerase

P502

Vazyme

使用说明书

Version 22.1

目 录 Contents

01/产品概述 ····· 02
02/产品组分 ····· 02
03/保存条件 ····· 02
04/适用范围 ····· 02
05/单位定义 ····· 02
06/注意事项 ····· 03
07/实验流程 ····· 03
　07-1/普通PCR操作流程 ····· 03
　07-2/高GC含量模板PCR操作流程 ····· 04
08/实验案例 ····· 05
　08-1/值得信赖的高保真度 ····· 05
　08-2/更高的扩增效率和特异性 ····· 05
09/常见问题与解决方案 ····· 06

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/产品概述

Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase是Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase的升级版本，Phanta HS中添加了独特的延伸因子，并对反应体系进行了深度优化，使其扩增稳定性及保真度得到进一步提升。Phanta HS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。其扩增错配率是普通Taq DNA Polymerase的1/52，是Pfu DNA Polymerase的1/6。Phanta HS中添加了在常温下能够抑制其5'→3'聚合酶活性和3'→5'外切酶活性的两种单克隆抗体，可进行高特异性的热启动(Hot Start)PCR。该酶具有5'→3'聚合酶活性和3'→5'外切酶活性，扩增产物为平端，适用于ClonExpress和拓扑克隆试剂盒(Vazyme #C112/C113/C115/C601)。

02/产品组分

组 分	P502-d1 (100 U)	P502-d2 (500 U)	P502-d3 (1,000 U)
5 × SF Buffer (with 10 mM $MgSO_4$)	1.25 ml		
25 mM $MgSO_4$	1 ml		
dNTP Mix (10 mM each)	100 μl		
Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase	100 μl	5 × P502-d1	10 × P502-d1
5 × PCR Enhancer	500 μl		
DMSO	100 μl		
10 × DNA Loading buffer	1.25 ml		

03/保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

▲ 避免反复冻融。

04/适用范围

本品适用于以基因组DNA、cDNA、Plasmid DNA为模板的PCR反应。

05/单位定义

用活化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，74℃ 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)。

06/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. 如实验需要，可适当提高Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase的使用量，但50 μl体系内酶量建议不要超过2 U。
4. Phanta HS 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。
5. 为了防止Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase的校对活性降解引物，请将聚合酶最后加入反应体系中。
6. 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℃为佳，Tm值调整至55 ~ 65℃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。

07/实验流程

07-1/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摇匀，用完后请及时放回-20℃保存。

组 分	体积
ddH_2O	to 50 μl
5 × SF Buffer (with 10 mM $MgSO_4$)	10 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
模板DNA[a]	x μl
Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl
25 mM $MgSO_4$[b]	optional

a. 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，模板加入量为不超过PCR反应总体积的1/10。

b. 对于大多数反应，Mg^{2+}最佳终浓度为1.5 - 2 mM。体系中已含有终浓度为2 mM Mg^{2+}，如有需要，可用试剂盒中提供的25 mM $MgSO_4$，以0.2 - 0.5 mM为间隔向上摸索Mg^{2+}最佳使用浓度。

反应程序

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

a. 推荐大多数模板的预变性温度为95℃。若扩增子超过10 kb，预变性温度需降至92℃，时间不超过2 min。

b. 对于大多数模板在95℃变性时间设为5 - 10 sec即可。若扩增子超过10 kb，变性温度需降至92℃，并延长变性时间至15 sec。

c. 一般来说，退火温度设置为引物Tm值±3℃范围之内即可。如果需要可以建立一个温度梯度反应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在胶上呈弥散状。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。

07-2/高GC含量模板PCR操作流程

反应体系

组 分	体积
ddH_2O	to 50 μl
5 × SF Buffer (with 10 mM $MgSO_4$)	10 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
模板DNA	x μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl
DMSO[a]	optional
5 × PCR Enhancer[b]	optional

a. DMSO的量可以1%的浓度递增，调整范围为0% - 8%。

b. 推荐仅当扩增子GC含量>60%时使用，可能会降低保真度。

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性[a]	98℃	3 min	
变性[b]	98℃	10 sec	25 - 35 cycles
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，预变性温度需提升至98℃，变性时间为2 - 4 min。

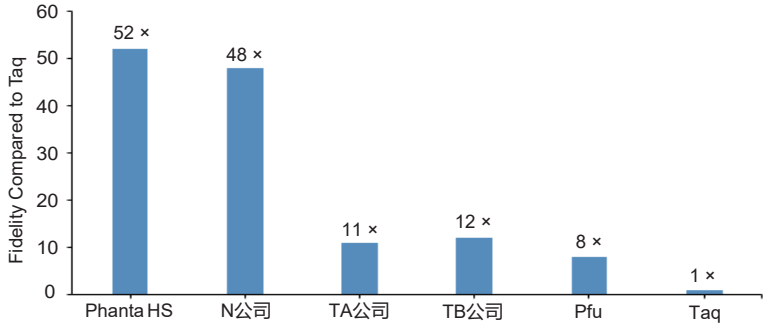
b. 对于高GC含量模板，变性温度需提升至98℃，变性时间为10 sec。

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。

08/实验案例

08-1/值得信赖的高保真度

使用LacI法测定(Cline, J. et al. Nucleic Acids Research. 24:3546-3551(1996))， Phanta HS 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。



08-2/更高的扩增效率和特异性

分别使用Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase和Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase以人基因组为模板，扩增长度为8.5 kb的目标片段。由结果图可见，Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase具有更高的扩增效率和特异性。扩增引物Tm值为60℃(使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制及扩增程序如下：

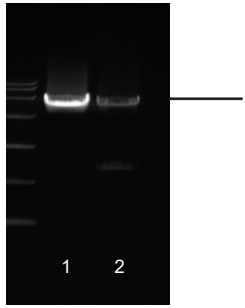
反应体系

组 分	体积
ddH_2O	to 50 μl
5 × SF Buffer (with 10 mM $MgSO_4$)	10 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl
模板DNA	1 μl

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	1 min	
变性	95℃	10 sec	35 cycles
退火	60℃	15 sec	
延伸	72℃	15 sec/kb	
彻底延伸	72℃	10 min	

扩增产物电泳检测结果



1: Phanta HS Super-Fidelity DNA Polymerase
2: Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase

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
酶使用量	适当调整高保真酶的使用量

◇ 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
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Touch down PCR程序
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减少
酶使用量	适当减少高保真酶的使用量

Vazyme Biotech Co., Ltd.
Web: www.vazyme.com
Tel: +86-400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com

www.vazyme.com