

Phanta[®] HS Super-Fidelity DNA Polymerase

P502-d1/d2/d3



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 9.1

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	04
07/应用实例	04
07-1/值得信赖的高保真度	04
07-2/更高的扩增效率和特异性	05
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。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反应的首选酶。

Phanta[®] HS Super-Fidelity DNA Polymerase是在Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase的基础上添加了在常温下能够抑制5'→3'聚合酶活性和3'→5'外切酶活性的单克隆抗体，可进行高特异性的热启动PCR。Phanta[®] HS Super-Fidelity DNA Polymerase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(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 × Loading buffer	1.25 ml		

03/保存条件

-30 ~ -15°C保存。可于-20 ~ 0°C运输。

▲ 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：10 U的本酶和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：10 U的本酶中残留的核酸经*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1 U本酶, 以100 ng人基因组DNA为模板, 扩增30个循环后将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的条带。

功能检测2: 50 µl PCR体系中加入1 U本酶, 以10 ng λDNA为模板, 扩增30个循环后将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摇匀, 用完后请及时放回-20°C保存。

ddH ₂ O	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, Mg²⁺最佳浓度为1.5 - 2 mM。体系中已含有终浓度为2 mM Mg²⁺, 如有需要, 可用试剂盒中提供的25 mM MgSO₄, 以0.2 - 0.5 mM为间隔向上摸索Mg²⁺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°C	30 sec - 3 min	} 25 - 35
变性 ^b	95°C	5 - 10 sec	
退火 ^c	60°C	10 - 30 sec	
延伸	72°C	15 - 30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 - 10 min	

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

b. 对于大多数模板在95°C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°C, 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°C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

ddH ₂ O	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°C	3 min	} 25 - 35
变性 ^b	98°C	10 sec	
退火 ^c	45 ~ 72°C	10 - 30 sec	
延伸	72°C	15 - 30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 - 10 min	

a. 对于高GC含量模板, 预变性温度需提升至98°C, 变性时间为2 - 4 min。

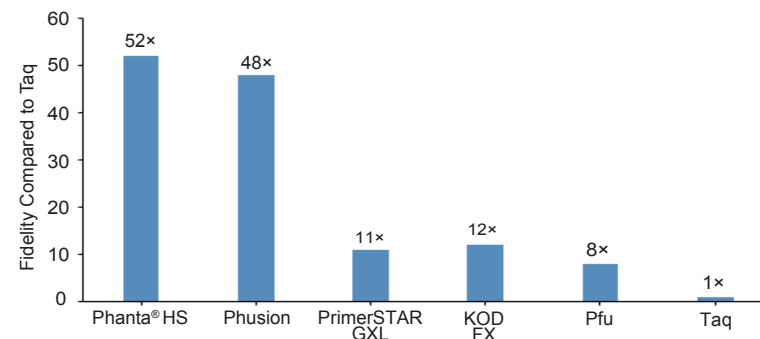
b. 对于高GC含量模板, 变性温度需提升至98°C, 变性时间为10 sec。

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/产品性能与应用实例

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 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。



07-2/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°C (使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制及扩增程序如下：

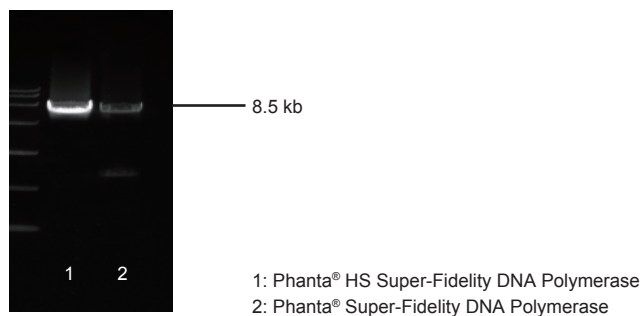
反应体系

ddH ₂ O	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/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°C	1 min	} 35
变性	95°C	10 sec	
退火	60°C	15 sec	
延伸	72°C	15 sec/kb	
彻底延伸	72°C	10 min	

扩增产物电泳检测结果



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或模板。
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
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	使用量参照反应体系推荐量调整或适当减少
酶使用量	适当减少高保真酶的使用量