

**2 × Phanta[®] Max
Master Mix (Dye Plus)**

P525



使用说明书

Version 21.1

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/长片段扩增指南	04
07-3/粗品扩增指南	04
08/实验案例	05
08-1/广泛的模板兼容性	05
08-2/稳定的粗品扩增能力	06
08-3/完美的高GC适用性	07
08-4/优异的扩增成功率和产量	07
08-5/值得信赖的高保真度	08
09/常见问题与解决方案	09

*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 Max Super-Fidelity DNA Polymerase是Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase的升级版。与上一代产品相比，Phanta Max中添加了独特的延伸因子、特异性促进因子以及平台期抑制因子，使其在长片段扩增能力、扩增特异性以及扩增产量方面得到了大幅度提升。使用λDNA、质粒等简单模板，Phanta Max可以有效扩增长达40 kb的片段；使用基因组DNA等复杂模板，Phanta Max可以扩增长达20 kb的片段；使用cDNA模板，Phanta Max可以有效扩增长达10 kb的片段。其错配率是普通Taq酶的1/53，是Pfu酶的1/6。此外，Phanta Max对PCR抑制剂具有良好的抵抗能力，可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接PCR。Phanta Max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PCR。本产品包含Phanta Max 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。体系中加入的保护剂使得2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性；体系中包含电泳指示剂，可在PCR反应完成后直接点样进行电泳。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	P525-01	P525-02	P525-03
2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus)	1 ml	5 × 1 ml	15 × 1 ml

03/保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

▲避免反复冻融。

04/适用范围

本产品适用于以基因组DNA、cDNA、Plasmid DNA以及粗品为模板的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°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)。

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. Phanta Max 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。

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混匀，用完之后请及时放回-20°C保存。

组分	体积
ddH ₂ O	up to 50 µl
2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus)	25 µl
上游引物 (10 µM)	2 µl
下游引物 (10 µM)	2 µl
模板DNA [*]	x µl

▲ 当扩增片段GC含量>60%且优化条件也无法正常扩增时，推荐使用PCR Enhancer (Vazyme #P021) 来优化PCR反应。

* 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：

模板种类	模板起始量
基因组DNA	50 - 400 ng
质粒或病毒DNA	10 pg - 30 ng
cDNA	1 - 5 µl (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°C	30 sec/3 min	} 25 - 35 cycles
变性	95°C	15 sec	
退火 ^b	56 ~ 72°C	15 sec	
延伸 ^c	72°C	30 - 60 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	

- 推荐大多数模板的预变性温度为95°C，时间为：质粒或病毒DNA 30 sec，基因组或cDNA 3 min。
- 请根据引物Tm值设置退火温度。如引物Tm值≥72°C，可删除退火步骤，直接进行后续的延伸步骤（两步法PCR）。如果需要，可以建立一个温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度。此外，退火温度直接决定扩增特异性。如发现扩增特异性差，可适当提高退火温度。
- 适当延长延伸时间有助于扩增产量的提高。

07-2/长片段扩增指南

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase具有卓越的长片段扩增能力、扩增特异性以及扩增产量，在扩增长片段时，若推荐程序不能有效扩增，可尝试下表所示Touch Down两步法PCR：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	} 5 cycles
变性	95°C	15 sec	
延伸	74°C	60 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	} 5 cycles
延伸	72°C	60 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	} 5 cycles
延伸	70°C	60 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	} 25 cycles
延伸	68°C	60 sec/kb	
彻底延伸	68°C	5 min	

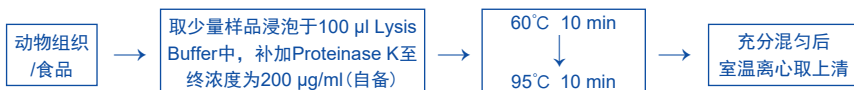
▲请使用高质量的模板，若产量较低可适当提高模板投入量；推荐使用长引物。

07-3/粗品扩增指南

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase对许多PCR抑制剂具有良好的抵抗能力，可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接PCR。下表为已成功扩增的粗品列表：

样品类型	扩增方式	推荐操作方式 (50 μ 体系)
全血	直接扩增	吸取1 - 5 μ l作为扩增模板
滤纸干血清	直接扩增	剪裁1 - 2 mm ² 滤纸作为扩增模板
培养细胞	直接扩增	取少量细胞作为扩增模板
酵母	直接扩增	挑取单克隆或1 μ l菌液作为扩增模板
细菌	直接扩增	挑取单克隆或1 μ l菌液作为扩增模板
霉菌	直接扩增	挑取少量作为扩增模板
精液	直接扩增	挑取少量作为扩增模板
浮游生物	直接扩增	挑取少量作为扩增模板
植物组织	直接扩增	剪裁1 - 2 mm ² 组织作为扩增模板
小鼠尾巴	裂解后吸取裂解液扩增	吸取1 - 5 μ l裂解液作为扩增模板
食品	裂解后吸取裂解液扩增	吸取1 - 5 μ l裂解液作为扩增模板

▲ 样品裂解液制备过程:



Lysis Buffer: 20 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.0.

如实验需要, 可依据上述配方自行配制。

08/实验案例

08-1/广泛的模板兼容性

针对四种不同类型的DNA模板, 采用P525和Vazyme #P515分别进行PCR扩增, 其中 λ DNA扩增长度为18 kb (模板投入量为10 ng), 人基因组DNA扩增长度为10 kb (模板投入量为100 ng), HeLa cDNA扩增长度为10 kb (模板采用1 μ l经过Vazyme #R212进行逆转录反应的cDNA, 其中逆转录的RNA投入量为1 μ g), 质粒扩增长度为8 kb (模板投入量为5 ng)。所有扩增引物T_m值均为60°C左右 (使用Primer Premier 5计算), 反应体系配制以及程序如下所示:

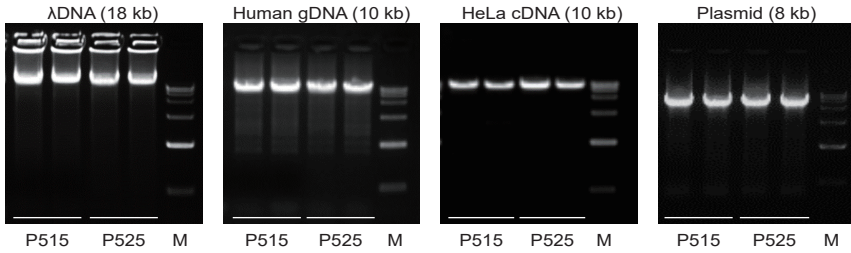
反应体系

组分	体积
ddH ₂ O	up to 50 μ l
2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus)	25 μ l
DNA模板	1 μ l
上游引物 (10 μ M)	2 μ l
下游引物 (10 μ M)	2 μ l

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	} 35 cycles
变性	95°C	15 sec	
退火	60°C	15 sec	
延伸	72°C	30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	

扩增产物电泳结果



M: DL 15,000 DNA Marker

08-2/稳定的粗品扩增能力

分别以血液、小麦(叶)、鼠尾以及菌液为DNA模板，使用P525和Vazyme #P515进行PCR扩增；其中，小麦(叶)和鼠尾按照07-3进行粗品裂解液制备，然后取1 μl作为PCR反应的模板，血液(EDTA采血管采集的人类全血)和菌液直接取2 μl当模板。所有扩增引物T_m值均为60°C左右(使用Primer Premier 5计算)，反应体系配制以及程序如下所示：

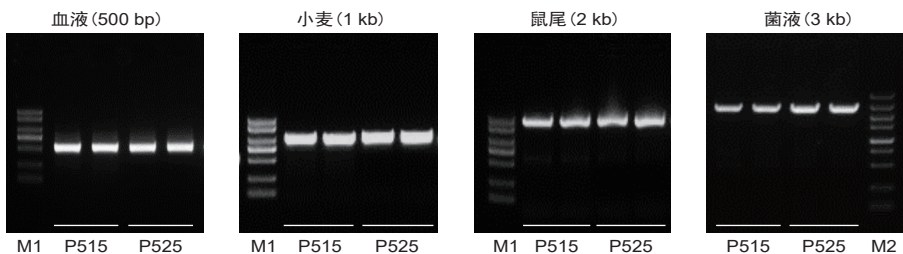
反应体系

组分	体积
ddH ₂ O	up to 50 μl
2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus)	25 μl
模板	x μl
上游引物 (10 μM)	2 μl
下游引物 (10 μM)	2 μl

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	} 35 cycles
变性	95°C	15 sec	
退火	60°C	15 sec	
延伸	72°C	30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	

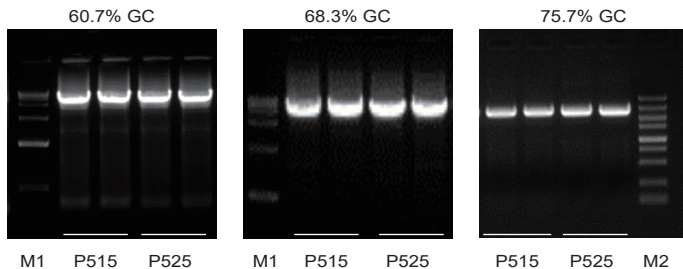
扩增产物电泳检测结果



M1: DL 2,000 Plus DNA Marker M2: DL 5,000 DNA Marker

08-3/完美的高GC适用性

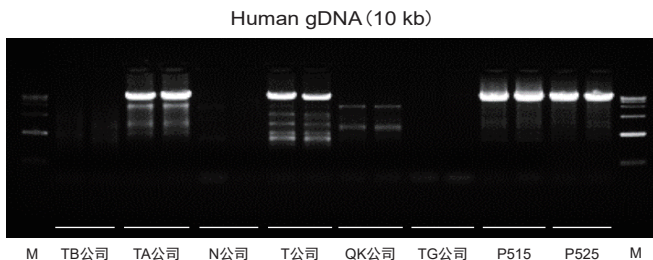
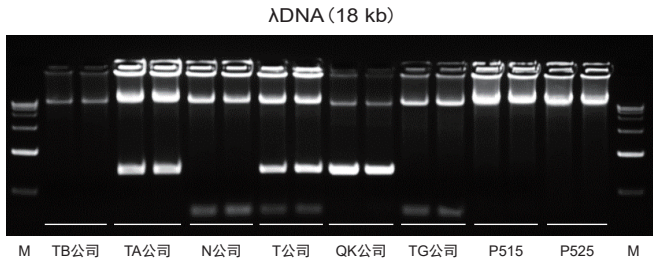
2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 能够高效扩增常规聚合酶无法正常扩增的高GC片段。以200 ng人基因组DNA为模板，采用P525和Vazyme #P515分别扩增GC含量为60.7% (8 kb)、68.3% (7 kb) 和75.7% (3 kb) 的DNA片段，依据检测结果可知，P525与Vazyme #P515均具有良好的扩增性能。所有扩增引物Tm值均为60°C左右(使用Primer Premier 5计算)，反应体系配制以及程序均按照07-1进行：



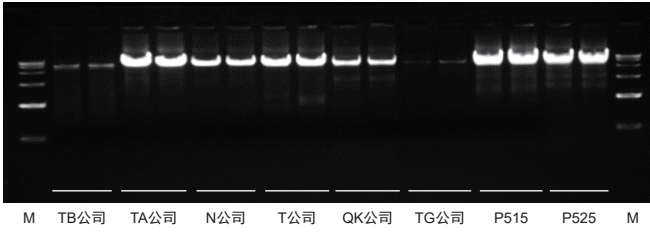
M1: DL 15,000 DNA Marker M2: DL 5,000 DNA Marker

08-4/优异的扩增成功率和产量

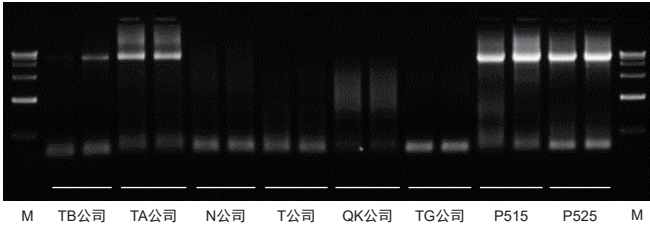
分别采用P525和Vazyme #P515以及市售高保真酶(TB公司、TA公司、N公司、T公司、QK公司、TG公司)进行不同模板的PCR扩增；其中，DNA模板投入量，反应体系配制以及程序均按照07-1进行。依据检测结果可知，P525与Vazyme #P515扩增性能优异，扩增子产量高、特异性好。



Plasmid (8 kb)



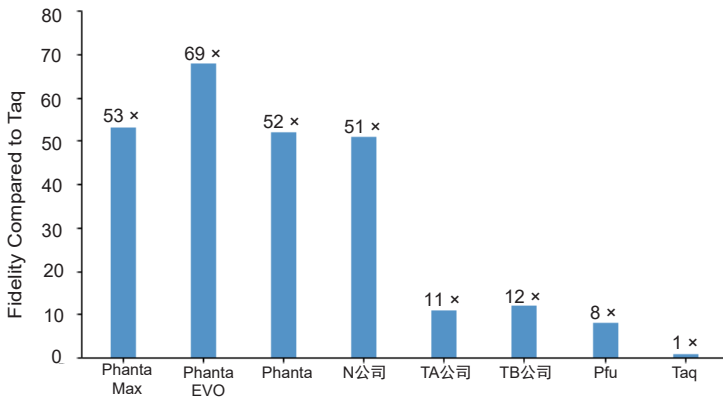
HeLa cDNA (7 kb)



M: DL 15,000 DNA Marker

08-5/值得信赖的高保真度

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase具有超高的扩增保真性，其保真度是Taq DNA Polymerase的53倍，Pfu DNA Polymerase的6倍，显著优于同类产品。下图为LacI分析方法测定 (Cline et al., *Nucleic Acids Research*, 24: 3546-3551 (1996)) 的不同聚合酶的扩增保真度比较。



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 μ M
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当减少



Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: 400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

Service: service@vazyme.com

