

Phanta[®] EVO

Super-Fidelity DNA Polymerase



Vazyme Biotech Co., Ltd

网站/Web: www.vazyme.com

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: sales@vazyme.com

技术支持/Support: support@vazyme.com

技术服务/Service: service@vazyme.com



www.vazyme.com

Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书

Version 6.1

目录 Catalog

产品简介

产品组成

储存条件

单位定义

质量控制

特别提醒

引物设计注意事项

应用实例

1/产品简介

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，可用于几乎所有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(processivity)得到了大幅度提升，即使是非常复杂的模板，也能准确快速的完成扩增反应。

Phanta EVO Super-Fidelity DNA Polymerase是Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase的升级版本。与上一代产品相比，Phanta EVO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、保真度以及对长片段的扩增能力得到了进一步提升。使用λDNA、质粒等简单模板，Phanta EVO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 EVO也可以有效扩增长达20 kb的片段。其扩增错配率是普通Taq聚合酶的1/100，是Pfu聚合酶的1/12；且扩增速度可以达到15秒/kb。此外，Phanta® EVO对PCR抑制剂有良好的抵抗能力，可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接PCR。严谨的保真性能以及卓越的扩增效率使得Phanta EVO成为高保真PCR的首选用酶。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快速克隆试剂盒(C112/C113)。

5 × EVO Buffer 对于简单或复杂模板、短片段或长片段PCR扩增都具有良好的适应性。其中已经包含10 mM Mg²⁺，可以使用随酶提供的MgCl₂或PCR Enhancer对反应体系进行优化。

2/产品组成

组 分	P503-d1 100 U 100 rxn(50 μl/rxn)	P503-d2 500 U 500 rxn(50 μl/rxn)	P503-d3 1,000 U 1,000 rxn(50 μl/rxn)
Phanta EVO Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	100 μl		
5 × EVO Buffer (with 10 mM MgCl ₂)	1.25 ml		
25 mM MgCl ₂	1 ml	P503-d1 × 5	P503-d1 × 10
dNTP Mix (10 mM each)	100 μl		
5 × PCR Enhancer	500 μl		
10 × Loading buffer	1.25 ml		

3/储存条件

-20°C储存。

4/单位定义

用活化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，74°C 30分钟内，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）。

5/质量控制

核酸外切酶残留检测：10 U的本酶和0.6 μg λ-Hind III在74°C下孵育1小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：10 U的本酶和0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA在74°C下孵育1小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌DNA残留检测：50 μl体系中，加入2 U本酶，以ddH₂O为模板，扩增E. coli 16 s rDNA基因。35个循环后进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，无扩增条带。

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α-1-antitrypsin gene。30个循环后将1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的8.2 kb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15 kb片段。30个循环后将1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的15 kb条带。

6/特别提醒

Phanta EVO Super-Fidelity DNA Polymerase与常规高保真聚合酶的使用方法略有不同，使用前请务必仔细阅读使用说明！

1. 应尽可能使用高的退火温度，推荐设定为引物T_m值+3°C；
2. 酶的使用量请勿超过2 U/50 μl，尤其当扩增子长度大于5 kb时；
3. 延伸时间请勿超过60 sec/kb；
4. 随酶附赠PCR Enhancer，必要时可用于反应体系优化，以获得更好的扩增效果。

7/引物设计注意事项

1. 引物3'端最后一个碱基选择C或G；
2. 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配；
3. 引物3'端尽量避免出现发夹结构；
4. 引物T_m值控制在55°C-65°C之间。推荐使用软件Primer Premier 5进行T_m值计算；
5. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物T_m值计算；
6. 引物GC含量尽量控制在40%-60%之间；
7. 正向引物和反向引物T_m值以及GC含量尽可能一致。

8/应用实例

1. 反应体系配制:

所有操作请于冰上进行，各组分解冻后请充分摇匀。为了防止Phanta EVO 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。各组使用完毕后及时放回-20°C。5 × EVO Buffer (with 10 mM MgCl₂) 请勿长时间敞口放置。

ddH ₂ O	to 50 μl
5 × EVO Buffer (with 10 mM MgCl ₂)	10 μl
25 mM MgCl ₂ ^a	可选
dNTP Mix (10 mM each) ^b	1 μl
5 × PCR Enhancer ^c	可选
模板DNA ^d	x μl
引物1 (10 μM)	2 μl
引物2 (10 μM)	2 μl
Phanta EVO Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl) ^e	1 μl

a. 对于大多数PCR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⁺，可用25 mM MgCl₂，以0.2-0.5 mM为间隔向上摸索Mg²⁺最佳使用浓度。

b. 请勿使用dUTP和带有尿嘧啶的引物或模板。

c. 推荐当扩增子GC含量>60%或引物T_m值超过72°C时添加，使用终浓度为1 ×，即50 μl反应体系内添加10 μl。(可能会轻微降低保真度)

d. 不同模板最佳反应浓度有所不同，50 μl反应体系推荐模板使用量可参见下表：

模板种类/扩增长度	< 1 kb	1 kb ~ 10 kb	>10 kb
基因组DNA	50 ng ~ 250 ng	100 ng ~ 300 ng	150 ng ~ 400 ng
质粒或病毒DNA	10 pg ~ 20 ng	10 pg ~ 20 ng	1 ng ~ 30 ng
cDNA	1-5 μl (不超过PCR反应总体积的1/10)		

e. 推荐酶的终浓度为1 U/50 μl反应。然而，根据扩增子的长度和复杂程度不同，可将Phanta EVO Super-Fidelity DNA Polymerase在0.5~2 U/50 μl反应之间进行优化。但请勿超过2 U/50 μl，尤其当扩增子长度大于5 kb时。

* Phanta EVO 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。

2. 推荐PCR反应条件设置:

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	95°C	30 sec/3 min	1
变性	95°C	15 sec	} 25~35
退火 ^b	56°C~72°C	15 sec	
延伸 ^c	72°C	15/30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	7 min	1

- a. 推荐预变性温度为95°C，时间为：质粒或病毒DNA 30 sec，基因组或cDNA 3 min。
- b. 应尽可能使用高退火温度，推荐设置为引物Tm值+3°C(≤72°C)。如Tm值+3°C≥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反应去寻找引物模板结合的最适温度。
- c. 延伸时间取决于扩增片段的长度和模板的复杂性。使用质粒等复杂程度较低的DNA做模板时使用15 sec/kb的延伸时间；使用基因组，cDNA等复杂程度较高的DNA做模板时，延伸时间应为30 sec/kb。对于超过5 kb的扩增子而言，延长延伸时间可以提高扩增产量，但太长的延伸时间会导致非特异性扩增增加，延伸时间请勿超过60 sec/kb。

3. 长片段PCR指南(当默认条件无法正常扩增时推荐尝试):

- *使用高质量的模板；
- *尝试添加PCR Enhancer；
- *使用长引物，合并退火延伸步骤，进行下表所示Touch Down两步法PCR：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	15 sec	} 5
延伸	74°C	30 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	} 5
延伸	72°C	30 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	} 5
延伸	70°C	30 sec/kb	
变性	95°C	15 sec	} 25
延伸	68°C	30 sec/kb	
彻底延伸	68°C	5 min	1

4. 高GC片段PCR指南(当默认条件无法正常扩增时推荐尝试):

- *使用高质量的模板；
- *延长预变性时间至5 min；
- *尝试添加PCR Enhancer。

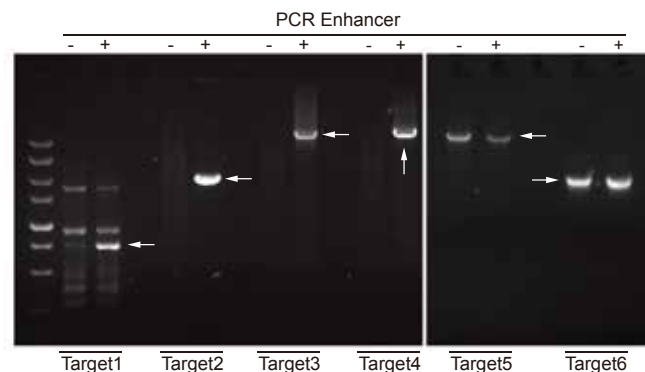
5. 反应优化实例(初次扩增目标片段时可参照下述方法优化反应体系):

对于大多数PCR反应，使用默认条件即可实现目标片段的高效扩增。然而，对于一些难于扩增的片段(扩增子GC含量太高、引物Tm值太高等等)而言，有时需要对反应体系进行一定的调整才能获得理想的扩增结果。推荐当初次使用某对引物扩增目标片段时，使用随酶提供5 × PCR Enhancer对反应体系进行简单优化。多数目标片段通过这一优化即可建立良好的扩增体系。

模板类型	产物长度	产物GC含量	引物Tm值(正/反)	退火温度设置	延伸时间设置
Target1: 人基因组	0.8 kb	75%	61.2°C/62.0°C	65.0°C	30 sec/kb
Target2: 人基因组	3.2 kb	73%	61.6°C/61.0°C	65.0°C	30 sec/kb
Target3: 质粒DNA	7.2 kb	52%	82.5°C/84.3°C	72.0°C	15 sec/kb
Target4: 质粒DNA	7.8 kb	55%	80.8°C/79.4°C	72.0°C	15 sec/kb
Target5: 人基因组	6.8 kb	43%	60.3°C/60.6°C	65.0°C	30 sec/kb
Target6: 人基因组	3.0 kb	47%	60.2°C/60.9°C	65.0°C	30 sec/kb

通过简单的序列分析可知：Target1和Target2的GC含量偏高，Target3和Target4的引物Tm值偏高，Target5和Target6的GC含量和引物Tm值均属正常范围。在初次扩增时每个片段同时进行±PCR Enhancer两组反应。如添加后扩增特异性或产量有明显提高时，在后续扩增时选择添加即可。

扩增产物电泳结果:



可见，对于扩增子高GC(Target1和Target2)或者引物Tm值较高(Target3和Target4)的PCR反应而言，PCR Enhancer的加入具有显著的扩增促进作用，后续扩增时应选择添加PCR Enhancer。但对于Target5和Target6两个扩增子而言，PCR Enhancer的加入没有促进扩增产量或特异性的提升(Target6)或反而导致扩增产量下降(Target5)，后续扩增时不添加即可。