

Phanta[®] Uc Super-Fidelity DNA Polymerase for Library Amplification

P507

Version 20.1



产品概述

Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase是一种基于Pfu DNA Polymerase改造而成的新一代高保真DNA聚合酶，具有极高的扩增效率和广泛的模板适应性。和Pfu DNA Polymerase相比，Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase的进程性得到大幅度提升，即使是非常复杂的模板，也能快速准确地完成PCR反应。其错配率是Taq DNA Polymerase的1/52，是Pfu DNA Polymerase的1/6，且完全克服了常规高保真酶无法以dUTP为原料、无法使用含有dUTP的扩增引物以及无法使用含有dUTP的DNA作为扩增模板等诸多缺点。配以精心优化的文库扩增专用反应缓冲，Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase for Library Amplification可以实现高通量测序文库的低偏好性、高效、高稳定性扩增。扩增产物为平端，适用于ClonExpress和拓扑克隆试剂盒 (Vazyme #C112/C113/C115/C601)。

产品组分

组 分	P507-01 (100 U)	P507-02 (500 U)
Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	100 μl	500 μl
5 × Uc Buffer for Library Amplification	1 ml	5 ml
10 mM each dNTP	100 μl	500 μl

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

▲避免反复冻融。

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)。

质量控制

Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)

SDS-PAGE纯度：纯度>95%。

核酸内切酶残留：10 U本酶和0.3 μg pBR322 DNA在37°C下孵育4 h，经琼脂糖凝胶电泳，质粒的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留DNA检测：10 U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：50 μl反应体系中加入1 μl本品、10 ng人基因组DNA以及0.5 μM扩增引物扩增1 kb片段。35个循环后经琼脂糖凝胶电泳检测，可见单一的1 kb扩增产物条带。

5 × Uc Buffer for Library Amplification

16 h 孵育检测：50 μl反应体系中包含25 μl本品和1 μg λ-*Hind* III DNA，37°C下孵育16 h。经琼脂糖凝胶电泳检测，条带无降解；50 μl反应体系中包含25 μl本品和1 μg T3 DNA，37°C下孵育16 h。经琼脂糖凝胶电泳检测，条带无降解。

实验流程

Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase与常规高保真酶的使用方法略有不同。在使用前，请务必仔细阅读使用说明。

反应体系

所有操作应于冰上进行，5 × Uc Buffer for Library Amplification解冻后请充分摇匀。各组分使用完成后及时放回-20°C保存。反应体系配制前请先预热PCR仪。待各组分添加完毕后，使用移液器轻轻吹打混匀并短暂离心收集反应液至PCR管底。之后应立即将PCR管置于预热PCR仪中开始反应。

ddH ₂ O	to 50 µl
5 × Uc Buffer for Library Amplification	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	x µl
Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase	1 µl

* 试剂盒中提供的dNTP中不含dUTP，如特殊情况下需要使用含dUTP的dNTP，可自行替换；推荐dUTP使用终浓度400 µM。

反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
热盖	105°C	On	
预变性	95°C	3 min	
变性	95°C	15 sec	} 9 - 15 ^b
退火	x°C ^a	15 sec	
延伸 ^c	72°C	1 - 3 min	
彻底延伸	72°C	5 min	

a. 推荐退火温度为引物T_m值。为了提高扩增特异性，应尽可能使用高的退火温度。可建立一个退火温度梯度去寻找模板引物最适退火温度。

b. 循环数可根据实际需要自行调整，一般文库扩增使用9 - 15个循环即可。

c. 延伸时间可根据实际需要自行调整。

1. 以dNTP为聚合原料

根据单一片段扩增测试，Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase最适延伸时间为30 sec/kb。延伸时间少于30 sec/kb可能会导致扩增产量下降；太长又会导致非特异性扩增增加。

2. 以包含dUTP的dNTP为聚合原料

根据单一片段扩增测试，Phanta Uc Super-Fidelity DNA Polymerase最适延伸时间为60 sec/kb。延伸时间少于60 sec/kb可能会导致扩增产量下降；太长又会导致非特异性扩增增加。

文库扩增与单一片段扩增略有不同，对于200 - 1,000 bp的文库而言，推荐延伸1 - 3 min即可。

注意事项

1. 请使用高质量的模板。

2. 1 × Uc Buffer for Library Amplification中包含2 mM Mg²⁺，绝大多数情况下无需调整。

3. 推荐延伸温度为72°C。文库长度1 kb以内，使用1 - 3 min延伸时间即可。如使用dUTP作为聚合原料，延伸时间应适当延长，因dUTP的聚合效率显著低于dTTP。

4. 普通PCR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T_m值相差不超过1°C为佳，T_m值调整至55 ~ 65°C为佳(引物T_m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T_m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；

避开引物内部或者两条引物之间有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。

*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。