Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase

P505-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 9.2

www.vazyme.com

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 ····· 03
06/实验流程 ····· 03
06-1/普通PCR操作流程 ····· 03
06-2/长片段扩增指南 ····· 04
06-3/粗品扩增指南 ····· 04
07/应用实例 ····· 05
07-1/适用于各种长度片段的扩增 ····· 05
07-2/稳定的粗品扩增能力 ····· 05
07-3/优异的高GC扩增能力 ····· 08
07-4/值得信赖的高保真度 ····· 09
08/注意事项 ····· 09
09/常见问题与解决方案 ····· 10

01/产品概述

Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase是Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase的升级版本。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解抑制因子，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λ DNA、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。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	P505-d1 (100 U)	P505-d2 (500 U)	P505-d3 (1,000 U)
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	100 µl	5 × P505-d1	10 × P505-d1
2 × Phanta Max Buffer	2 × 1.25 ml		
dNTP Mix (10 mM each)	100 µl		
10 × Loading buffer	1.25 ml		

03/保存条件

- 30 ~ - 15℃保存。运输条件：≤0℃。

▲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℃ 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)。

Vazyme
www.vazyme.com

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℃下孵育4 h，DNA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* 16s rDNA特异性的TaqMan qPCR检测，*E.coli*基因组残留低于10拷贝。

功能检测：50 μl PCR体系中加入1 U本酶，分别以10 ng λDNA、50 ng质粒DNA、100 ng人基因组DNA和1 μl HeLa细胞cDNA为模板，扩增不同长度和GC含量的5个片段，延伸时间设置为30 sec/kb。35个循环后将1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的相应条带。

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混匀，用完之后请及时放回-20℃保存。

ddH_2O	up to 50 μl
2 × Phanta Max Buffer[a]	25 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 Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl
模板DNA[b]	x μl

a. 2 × Phanta Max Buffer中已含有Mg^{2+}，终浓度为2 mM。

b. 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℃	30 sec/3 min	
变性	95℃	15 sec	25 - 35
退火[b]	56 ~ 72℃	15 sec	
延伸[c]	72℃	30 - 60 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	

a. 推荐大多数模板的预变性温度为95℃，时间为：质粒或病毒DNA 30 sec，基因组或cDNA 3 min。

b. 请根据引物Tm值设置退火温度。如引物Tm值≥72℃，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。

c. 适当延长延伸时间有助于扩增产量的提高。

06-2/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℃	3 min	
变性	92℃	15 sec	5
延伸	74℃	60 sec/kb	
变性	95℃	15 sec	5
延伸	72℃	60 sec/kb	
变性	95℃	15 sec	5
延伸	70℃	60 sec/kb	
变性	95℃	15 sec	25
延伸	68℃	60 sec/kb	
彻底延伸	68℃	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。

06-3/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 μl体系)
全血	直接扩增	吸取1 - 5 μl作为扩增模板
滤纸干血清	直接扩增	剪取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 μl菌液作为扩增模板
细菌	直接扩增	挑取单克隆或1 μl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	剪取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 μl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 μl裂解液作为扩增模板

▲样品裂解液制备过程：

动物组织/食品 → 取少量样品浸泡于100 μl Lysis Buffer中，补加Proteinase K至终浓度为200 μg/ml(自备) → 60℃ 10 min ↓ 95℃ 10 min → 充分混匀后室温离心取上清

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。

Vazyme
www.vazyme.com

07/应用实例

07-1/适用于各种长度片段的扩增

以人基因组DNA为模板，使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase分别扩增0.6 kb、1.0 kb、2.6 kb、3.0 kb、4.0 kb、5.1 kb、6.2 kb、7.1 kb、8.5 kb、10.6 kb、17.8 kb、20.3 kb、21.4 kb目标片段。所有扩增引物Tm值均为60℃左右(使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制以及反应程序如下：

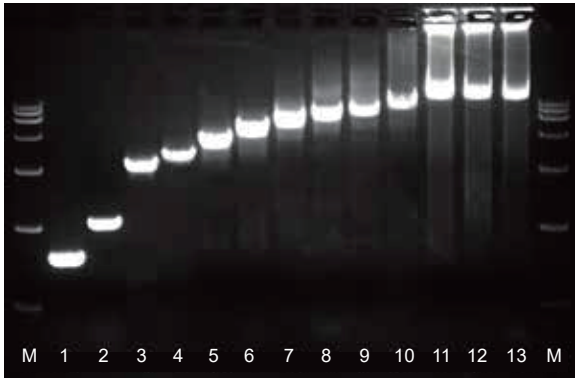
反应体系

ddH_2O	up to 50 μl
2 × Phanta Max Buffer	25 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
100 ng/μl人基因组DNA	2 μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl

反应程序

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

扩增产物电泳结果



M: DL15,000 DNA Marker
1: 0.6 kb
2: 1.0 kb
3: 2.6 kb
4: 3.0 kb
5: 4.0 kb
6: 5.1 kb
7: 6.2 kb
8: 7.1 kb
9: 8.5 kb
10: 10.6 kb
11: 17.8 kb
12: 20.3 kb
13: 21.4 kb

07-2/稳定的粗品扩增能力

1. 以EDTA采血管采集的人类全血(来源于Vazyme实验室)为模板，分别使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、A公司高效率高保真酶、B公司高效率高保真酶扩增1,295 bp的目标片段；另外使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase扩增更长的目的片段，如3,276 bp和8,513 bp。所有扩增引物Tm值均为60℃左右(使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制以及反应程序如下：

反应体系

ddH_2O	up to 50 μl
2 × Phanta Max Buffer	25 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
全血*	x μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl

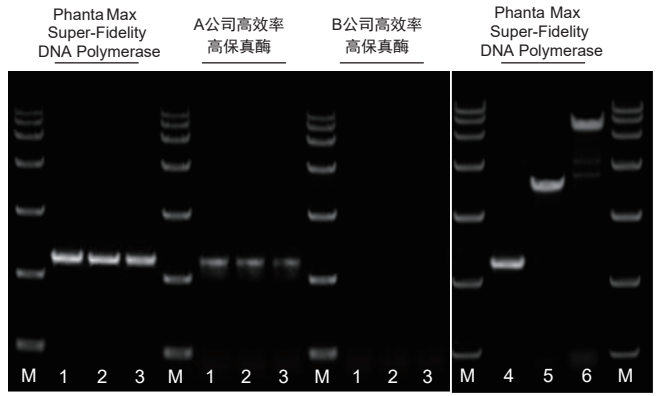
* 全血添加量分别为1 μl、2 μl、4 μl。

反应体系

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	3 min	
变性	95℃	15 sec	35
退火*	60℃/63℃/70℃	15 sec	
延伸	72℃	30 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	

* 扩增1.3 kb、3.6 kb、8.5 kb目标片段时退火温度分别是60℃、63℃、70℃。

扩增产物电泳检测结果



M: DL15,000 DNA Marker
1: 1.3 kb (1 μl血液)
2: 1.3 kb (2 μl血液)
3: 1.3 kb (4 μl血液)
4: 1.3 kb (2 μl血液)
5: 3.6 kb (2 μl血液)
6: 8.5 kb (2 μl血液)
* 使用A、B公司高保真酶扩增时使用各自说明书推荐的条件。

2. 以番茄叶、稻叶、精米(来源于Vazyme实验室)为模板，以稻叶纯化基因组DNA (来源于Vazyme实验室)为阳性对照，分别使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、A公司高效率高保真酶、B公司高效率高保真酶扩增1.3 kb目标片段。所有扩增引物Tm值均为60℃左右(使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制以及反应程序如下：

反应程序

ddH_2O	up to 50 μl
2 × Phanta Max Buffer	25 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
植物组织*	x μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl

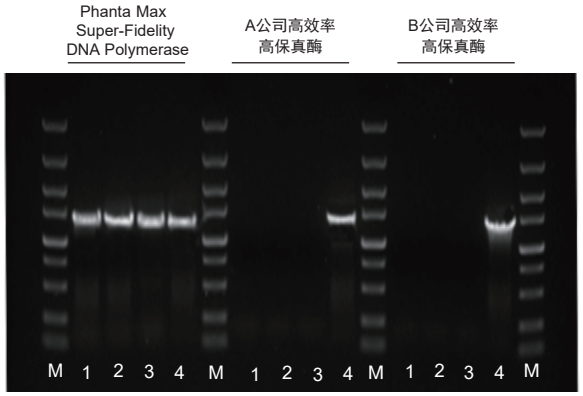
* 推荐使用植物组织直径为0.3 - 3 mm。

Vazyme
www.vazyme.com

反应程序

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

扩增产物电泳检测结果



M：DL 5,000 DNA Marker
1：番茄叶
2：稻叶
3：精米
4：稻叶纯化基因组DNA
* 使用A、B公司高保真酶扩增时使用各自说明书推荐的条件。

3. 以小鼠尾巴(来源于Vazyme实验室)裂解液为模板，分别使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、A公司高效率高保真酶、B公司高效率高保真酶扩增2.5 kb目标片段。所有扩增引物Tm值均为60℃左右(使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制以及反应程序如下：

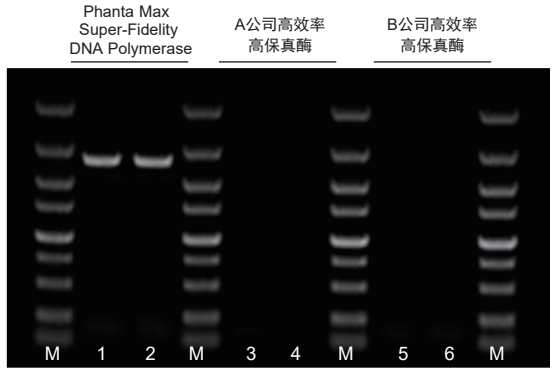
反应体系

ddH_2O	up to 50 μl
2 × Phanta Max Buffer	25 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
小鼠尾巴裂解液	2 μl
上游引物(10 μM)	2 μl
下游引物(10 μM)	2 μl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μl

反应程序

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

扩增产物电泳检测结果



M：DL 5,000 DNA Marker
1 - 6：目标片段均为2.5 kb

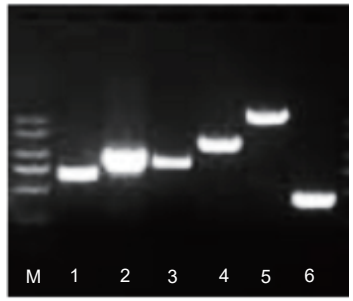
07-3/优异的高GC扩增能力

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase能够高效扩增常规聚合酶无法正常扩增的高GC片段。以人基因组为模板扩增654 bp、900 bp、800 bp、1,200 bp、1,400 bp、426 bp目标片段，各扩增子GC含量均高于68%。依据检测结果可知，在默认条件下均可以高效扩增。所有扩增引物Tm值均为60℃左右(使用Primer Premier 5计算)。反应体系配制参照06-1。反应程序如下表：

反应体系

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	3 min	
变性	95℃	15 sec	35
延伸	72℃	45 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	

扩增产物电泳检测结果

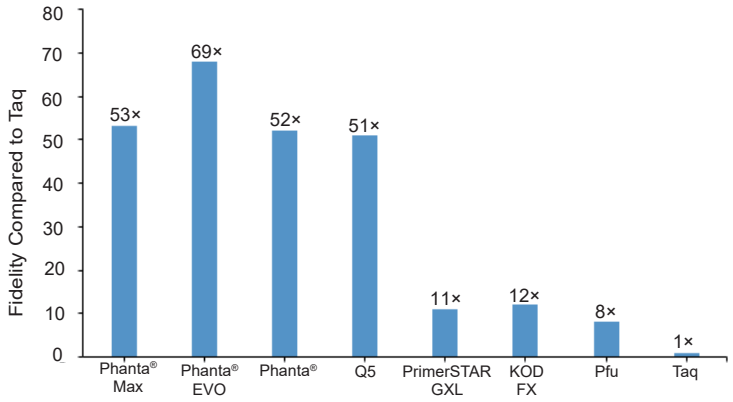


M：DL 2,000 DNA Marker
1：654 bp，68.1% GC Content
2：900 bp，69.4% GC Content
3：800 bp，71.3% GC Content
4：1,200 bp，73.5% GC Content
5：1,400 bp，74.7% GC Content
6：426 bp，76.8% GC Content

Vazyme
www.vazyme.com

07-4/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。



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和模板。
3. 如实验需要，可适当提高Phanta Max 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 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。
5. 为了防止Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase的校对活性降解引物，在配置反应体系时请最后加入聚合酶。
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。

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 μM
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