

2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus)

P525



Version 23.1

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ADNA、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1/128。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；本产品含有电泳指示剂，可在PCR反应完成后直接点样进行电泳。本产品扩增产物为平末端，可适用于ClonExpress (Vazyme #C112/C113/C115)和拓扑克隆试剂盒(Vazyme #C601)。

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

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

适用范围

本产品适用于以基因组DNA、cDNA、质粒以及粗品为模板的PCR反应。

注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

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：
 - a. 引物3'端最后一个碱基最好为G或者C；
 - b. 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配；
 - c. 引物3'端应避免出现发夹结构；
 - d. 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)；
 - e. 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；
 - f. 引物的GC含量控制在40% - 60%之间；
 - g. 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；
 - h. 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；
 - i. 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。

实验流程

反应体系

所有操作请在冰上进行，PCR相关组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回-20℃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	模板使用量
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	95℃	3 min	
变性	95℃	15 sec	} 25 - 35 cycles
退火 ^a	56 ~ 72℃	15 sec	
延伸 ^b	72℃	30 - 60 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	

a. 请根据引物T_m值设置退火温度。如引物T_m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。

b. 适当延长延伸时间有助于扩增产量的提高。

常见问题与解决方案

◇ 无产物或产物量少

- ① 引物：优化引物设计。
- ② 退火温度：设置退火温度梯度，找到合适的退火温度。
- ③ 引物浓度：适当提高引物浓度。
- ④ 延伸时间：适当增加延伸时间至30 sec/kb - 1 min/kb。
- ⑤ 循环数：增加循环数至36 - 40个循环。
- ⑥ 模板纯度：使用高纯度模板。
- ⑦ 模板使用量：使用量参照反应体系推荐量调整并适当增加。

◇ 有杂带或弥散条带

- ① 引物：优化引物设计。
- ② 退火温度：尝试提高退火温度并设置退火温度梯度。
- ③ 引物浓度：适当降低引物浓度。
- ④ 循环数：减少循环数至25 - 30个循环。
- ⑤ 反应程序：使用两步法或Touch down PCR程序。
- ⑥ 模板纯度：使用高纯度模板。
- ⑦ 模板使用量：使用量参照反应体系推荐量调整并适当减少。