

2 × Phanta Flash Master Mix

P510

Version 23.1



产品概述

2 × Phanta Flash Master Mix采用了新一代Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase，通过对Phanta DNA Polymerase进行定向进化，使其保持高保真性(错配率是普通Taq酶的1/81)、高产量和快速延伸的特点，从而实现4 - 5 sec/kb的快速扩增。通过极致的缓冲优化，本产品扩增特异性进一步提高，并且对粗品、含尿嘧啶模板和高GC体系(引物或模板)均具有优异的扩增性能。本产品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，使其可以进行高特异性的热启动PCR。2 × Phanta Flash Master Mix中包含Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase、dNTP以及优化的缓冲体系，只需加入模板和引物即可进行扩增，减少移液次数，提高检测通量和结果的稳定性。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 | P510-01 | P510-02 | P510-03 |
|-----------------------------|---------|----------|-----------|
| 2 × Phanta Flash Master Mix | 1 ml | 5 × 1 ml | 15 × 1 ml |

保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

适用范围

本产品适用于以基因组DNA、cDNA、质粒、含尿嘧啶的DNA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。

- 针对扩增长度不超过10 kb的目的片段，建议延伸时间设定为4 - 5 sec/kb；当目的片段长度超过10 kb时，建议延伸时间设定为10 sec/kb。
- 为了提高扩增成功率和产量，请使用高质量的模板。
- Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase具有较强的校对活性，因此，扩增产物如果需要进行TA克隆，加A之前建议进行DNA纯化。
- 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。

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 Flash Master Mix | 25 µl |
| 上游引物(10 µM) | 2 µl |
| 下游引物(10 µM) | 2 µl |
| 模板DNA* | x µl |

*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 | 10 - 500 ng |
| 质粒或病毒DNA | 5 pg - 20 ng |
| cDNA | 1 - 5 µl(不超过PCR反应总体积的1/10) |

反应程序

标准反应程序

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|-----------------|----------------|--------------|------------------|
| 预变性 | 98℃ | 30 sec | |
| 变性 | 98℃ | 10 sec | } 28 - 35 cycles |
| 退火 ^a | T _m | 5 sec | |
| 延伸 ^b | 72℃ | 4 - 5 sec/kb | |
| 彻底延伸 | 72℃ | 1 min | |

快速反应程序^c

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|-----------------|----------------|--------------|------------------|
| 变性 | 98℃ | 10 sec | } 28 - 35 cycles |
| 退火 ^a | T _m | 5 sec | |
| 延伸 ^b | 72℃ | 4 - 5 sec/kb | |

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，推荐通过建立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. 延伸时间请根据目的片段长度参考以下方法进行设定：

| 目的片段长度 | 建议延伸时间 |
|--------|--------------|
| ≤10 kb | 4 - 5 sec/kb |
| >10 kb | 10 sec/kb |

c. 通过实验验证，本产品采用标准反应程序与快速反应程序进行PCR扩增，性能无显著差异，可以根据操作习惯自行选择。

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10 - 15 sec/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。