

2 × Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)

P520

Version 23.1



产品概述

2 × Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)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 (Dye Plus)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, 适用于ClonExpress (Vazyme #C112/C113/C115)和拓扑克隆试剂盒(Vazyme #C601)。

产品组分

组 分	P520-01	P520-02	P520-03
2 × Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)	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 (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

*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	28 - 35 cycles
变性	98℃	10 sec	
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。