Phanta® Uc Super-Fidelity DNA Polymerase for Library Amplification

P507-01/02 Version 4.1

Vazyme™

Vazyme biotech co., ltd.

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的行进性得到的大幅度提升，即使是非常复杂的模板也能快速准确的完成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为原料进行聚合反应、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弊病。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，可直接用于平端克隆。

产品组成

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 × 1 ml	
10 mM each dNTP	100 μl	500 μl	

储存及有效期

所有组分-20°C贮存,有效期一年。

适用范围

使用含dUTP的引物进行高保真文库扩增
使用含dUTP的模板进行高保真文库扩增
使用含dUTP的dNTP进行高保真文库扩增

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：50 μl反应中加入10 μl本酶和1 μg φX174 RF I DNA，37°C孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测RF II转化比率＜10%。
磷酸酶活性检测：在磷酸酶活性检测缓冲液中加入10 μl本酶和2.5 mM对硝基苯磷酸，37°C下孵育4小时。经光谱测定法检测，405 nm处无对硝基苯阴离子特征吸收峰。
扩增性能检测：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。30个循环后经琼脂糖凝胶电泳检测，有特异性1 kb扩增产物可见。

5 × Uc Buffer for Library Amplification
16小时孵育检测：50 μl反应体系中包含25 μl本品和1 μg HindIII-λDNA，37°C下孵育16小时。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小时。经琼脂糖凝胶电泳检测，条带无降解。
磷酸酶活性检测：在磷酸酶活性检测缓冲液中加入1 × 本品和2.5 mM对硝基苯磷酸，37°C下孵育4小时。经光谱测定法检测，405 nm处无对硝基苯阴离子特征吸收峰。

使用方法

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。

A．推荐反应体系

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。

灭菌蒸馏水	To 50 μl	
模板	x μl	
5 × Uc Buffer for Library Amplification	10 μl	
10 mM each dNTP*	1 μl	
正向引物(10 μM)	2 μl	
反向引物(10 μM)	2 μl	
Phanta® Uc Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	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。

B．推荐反应程序

步骤	温度	时间	循环数
热盖	105°C	On	
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	15 sec	
退火	x°C*1	15 sec	9-15*2
延伸	72°C	1-3 min*3	
完全延伸	72°C	5 min	1
Hold	4°C		

*1.推荐退火温度为引物Tm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。

*2.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。

*3.延伸时间可根据实际需要自行调整。

a.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。

b.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200-1000 bp的文库而言，推荐延伸1-3 min即可。

反应体系各参数简要说明

1. 模板

使用纯化过的高质量DNA模板可以显著提高扩增效率和成功率。

2. Mg^{2+}

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

3. dNTPs

推荐dNTPs使用终浓度为200 μM。如需使用dUTP作为聚合原料，推荐其终浓度为400 μM。

4. 变性

推荐变性条件广泛适用于各种模板类型，绝大多数情况下无需调整。

5. 退火

一般而言，使用引物Tm值作为退火温度即可。可以建立一个退火温度梯度寻找引物最适退火温度。

6. 延伸

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。

7. 循环数

通常情况下9-15个循环足以产生足量扩增产物。

8. 扩增产物

扩增产物为平端。