

Phire®热启动 II DNA 聚合酶

产品货号: **F-122S, 50µl x 200rxns (200µl)**
F-122L, 50µl x 1000rxns (1.0ml)

自使用之日起, -20°C 保存, 有效期为 1 年。

1. 简介

Thermo Fisher Scientific Phire 热启动 II DNA 聚合酶是一种创新性的适用于各种常规和高通量 PCR 的 DNA 聚合酶。该酶包含了一个特殊的 DNA 结合结构域, 此结构域大大增强了聚合酶的持续合成能力, 从而可缩短延伸时间并提高产量。该酶亦能用于长片段扩增, 在 Thermo Fisher Scientific 质控实验中就成功扩增了长达 7.5kb 的基因组 DNA。在保真性上, Phire 热启动 II DNA 聚合酶是 *Taq* DNA 聚合酶的 2 倍。

该酶的热启动修饰基于 Affibody 失活法^{1, 2}。这种修饰使得该酶在环境温度下失活, 因而抑制了非特异性扩增。在聚合温度下, Affibody 分子被释放, 充分激活 DNA 聚合酶活性。

Phire 热启动 II DNA 聚合酶的扩增产物为平末端。它不具有水解实验所需要的 5'-3' 外切酶活性。

重要提示

- 变性温度为 98°C (详见 5.1, 5.2)。
- 退火规则与众多常规 DNA 聚合酶 (如 *Taq* DNA 聚合酶) 不同, 请仔细阅读 5.3。
- 每 20µl 反应体系使用 0.4µl 酶或者每 50µl 反应体系使用 1µl 酶。
- 每种 dNTP 的使用浓度为 200µM, 不要使用 dUTP (详见 4.3)。
- 延伸时间按 10-15s/kb 设置 (详见 5.4)。
- 注意: Phire 热启动 II DNA 聚合酶产生的是平末端的 DNA 产物。

2. 包装信息

F-122S	200rxns x 50 µl 产品包含: Phire热启动II DNA聚合酶 (200µl) 5x Phire缓冲液 (2 x 1.5 ml) DMSO (500 µl)
F-122L	1000rxns x 50 µl 产品包含: Phire热启动II DNA聚合酶 (1.0ml) 5x Phire缓冲液 (7 x 1.5 ml) DMSO (500 µl)

材料安全数据表见 www.finnzymes.com

3. Phire 热启动 II DNA 聚合酶使用指南

Phire 热启动 II DNA 聚合酶配备 5 x Phire 反应缓冲液。该缓冲液在终反应体系中含有 1.5mM MgCl₂。为了用户能进一步优化体系, 还单独提供了一管 DMSO。

3.1 PCR 的基本反应条件

使用前请充分混合, 以保证均质, 提高产物得率。使用 Phire 热启动 II DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 前期的加样过程无需在冰上完成。建立体系时, 首先根据要扩增的样品数量制备适当体积的 Master Mix。由于 DNA 聚合酶储存在含 50%甘油的储存缓冲液中, 故吸取时动作应尽量温和, 否则会造成吸取体积错误。

Table 1. 加样指南（按下表所列顺序依次添加组分）

组份	50 μ l 反应体系	20 μ l 反应体系	终浓度
H ₂ O	定容至 50 μ l	定容至 20 μ l	
5x Phire 反应缓冲液	10 μ l	4 μ l	1x
10 mM dNTPs	1 μ l	0.4 μ l	200 μ M each
引物 A（见 4.2）	x μ l	x μ l	0.5 μ M
引物 B（见 4.2）	x μ l	x μ l	0.5 μ M
DNA 模板（见 4.4）	x μ l	x μ l	
Phire 热启动 II DNA 聚合酶	1 μ l	0.4 μ l	

Table 2. 循环条件

循环步骤	两步法方案		三步法方案		循环数
	温度	时间	温度	时间	
起始变性	98°C	30s	98°C	30s	1
变性	98°C	5s	98°C	5 s	25-35
退火（详见 5.3）	-	-	X°C	5 s	
延伸	72°C	10-15 s/kb	72°C	10-15 s/kb	
最后延伸	72°C 4°C	1 min 保持	72°C 4°C	1 min 保持	1

4. 各反应组分说明

4.1 酶

该酶的最适用量是 20 μ l 反应体系中加 0.4 μ l 酶或者 50 μ l 反应系统中加 1.0 μ l 酶。当使用 Phire 热启动 II DNA 聚合酶扩增克隆片段时，我们推荐平末端克隆。如果需要 TA 克隆，可以使用 DyNAzyme™ II DNA 聚合酶（F-501）给平末端 PCR 产物加 A 尾。使用 Phire 热启动 II DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，所得 PCR 产物的后续 TA 克隆操作指南可在我们的相关网站上找到（www.finnzymes.com）。

4.2 引物

我们推荐使用引物的最终浓度是 0.5 μ M。如果需要，引物的最终浓度可以在 0.2-1.0 μ M 之间进行优化。

引物 T_m 值的计算结果会随着使用方法的不同而不同。请使用我们网站上（www.finnzymes.com）的 T_m 计算器和操作指南来计算引物的 T_m 值，并最终确定最适的退火温度。如果使用两步法 PCR 程序，引物的退火和延伸可以合并成一步，温度均设置在 72°C。并据此设计相应的引物也应做。

4.3 Mg²⁺和 dNTP

Phire 反应缓冲液中 Mg²⁺ 的浓度已经过严格优化，确保对大部分扩增反应均能达到高效。

使用 Phire 热启动 II DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，若想收获最佳的扩增结果，请配套使用高质量的 dNTPs（如：F-560）。聚合酶不能识别 dUTP 的衍生物和模板链中的 dITP，因此，这些类似物或者包含这些类似物的引物都不推荐使用。为了收获最佳实验结果，请使用浓度为 200 μ M 的 dNTP。

4.4 模板

对于简单 DNA 模板（如：质粒， λ DNA 或者 BAC DNA），模板用量标准是每 20 μ l 反应体系加 1pg-10ng 模板，或者每 50 μ l 反应体系加 2.5pg-25ng 模板。对于高度复杂的基因组 DNA，模板的用量应该是每 20 μ l 反应体系加 10-100ng 或者每 50 μ l 反应体系加 25-250ng 模板。如果 cDNA 合成反应混合物被直接用作后续 PCR 扩增模板，则模板所用体积不应超过最终 PCR 反应体积的 10%。

4.5 PCR 添加剂

对于富含 GC 的模板，推荐加入 3% 的 DMSO 作为 PCR 反应添加剂，它有助于促进富含 GC 的模板的变性。若想进一步优化，DMSO 的量可以 2% 的增量进行递增。在某些实验中，DMSO 也可使超螺旋质粒松散以助变性。此外，其他的 PCR 添加剂如甲酰胺、甘油和甜菜碱也可与 Phire 热启动 II DNA 聚合酶兼容。

如果使用高浓度的 DMSO，相应的退火温度应该降低，因为 DMSO 能影响引物的熔点。据报道，10% 的 DMSO 能降低退火温度 5.5-6°C³

5. 循环条件说明

由于 Phire 热启动 II DNA 聚合酶的独特性质，其最佳反应条件与其他的扩增方案有所不同。当使用 Phire 热启动 II DNA 聚合酶进行 PCR 反应时，请特别注意下面所列出的条件。下面的操作指南会确保酶发挥最佳效果。

5.1 初始变性

变性的温度通常设置在 98°C。由于 Phire 热启动 II DNA 聚合酶的高稳定性，即使高于 98°C 的温度亦可使用。对于大部分模板，我们建议初始变性设置为 98°C，30s。另有少数种类的模板可能需要更长的初始变性时间。初始变性时间的长度可根据需要延伸到 3 分钟。

由于其独特的热启动技术，Phire DNA 聚合酶无需单独的酶激活步骤。

5.2 变性

保证变性时间尽可能短。对于大多数模板，通常在 98°C 保持 5s 就足够了。注意：变性时间和温度可能会随着热循环仪的缓变率和温度控制模式而改变。

5.3 引物退火

设置引物退火温度的基本原则是：若引物所含碱基数大于 20nt，则退火程序设置为： $T_m+3^{\circ}\text{C}$ ，5s。该 T_m 值指两引物中较低的那一个 T_m 值；若引物所含碱基数小于或等于 20nt，则直接使用两引物中较低的那一个 T_m 值作为退火温度。如果有必要，可以使用温度梯度找到每一模板/引物对的最适的退火温度。退火梯度可以扩展到延伸温度（两步法 PCR）。对于高 T_m 值的引物对建议使用无退火步骤的两步法 PCR。可以使用我们相关网站 (www.finnzymes.com) 上的 T_m 计算器和操作指南确定特定引物的 T_m 值和最适的退火温度。

5.4 延伸

延伸应该在 72°C 的温度下进行。对于大多数模板，延伸时间通常按照 10s/kb 设定。然而，对于某

些难扩增的引物/模板对，若想获得更高的产物得率可以按 15s/kb 设定延伸时间。

6. 疑难解答指南

无扩增产物或者产物量很少。

- 优化退火温度。
- 重新实验，确保没有加样错误。
- 确保循环程序与我们推荐使用的程序一致。
- 使用新的高质量 dNTPs。
- 不要使用含 dUTP 或者 dITP 的 dNTPs 和引物。
- 试验不同浓度的模板量。
- 模板 DNA 可能被损坏。使用谨慎操作纯化的模板。
- 增加延伸时间。
- 增加循环数。
- 在反应体系中加入 2-8% 的 DMSO（可参考 4.5）。
- 变性温度可能太低。对大多数模板最佳的变性温度是 98°C 或者更高。
- 优化变性时间。
- 检测引物的纯度和浓度。
- 检查引物的设计。

产物非特异——呈现高分子量弥散条带。

- 确保所设定的延伸时间不是太长。
- 减少总循环数。
- 增加退火温度或者试用两步法 PCR（可参考 5.3）。
- 试验不同浓度的模板量。
- 优化变性温度（可参考 5.2）。
- 降低引物浓度。

产物非特异——呈现低分子量分散带。

- 增加退火温度（可参考 5.3）。
- 确保所设定的延伸时间不是太长。
- 试验不同浓度的模板量。
- 降低引物的浓度。
- 重新设计引物。

7. 产品各组分说明

7.1 Phire 热启动 II DNA 聚合酶 (F-122)

热稳定 Phire DNA 聚合酶是从携带有古生菌 DNA 聚合酶基因的大肠杆菌中分离和纯化出来的。Phire 热启动 II DNA 聚合酶具有 5'-3' 聚合酶活性和较弱的 3'-5' 外切酶活性。Affibody 配体是从表达 Affibody 蛋白的大肠杆菌中纯化出来的。Phire 热启动 II DNA 聚合酶无核酸内切酶和外切酶的污染。

储存缓冲液: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4, 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 稳定剂, 200 µg/ml BSA 和 50 % 甘油。

DNA 扩增实验: 扩增 500bp 和 7.5kb 的基因组 DNA 片断以检测 PCR 的工作性能。

核酸外切酶污染检测: 取 10U DNA 聚合酶加入 50 µl 含 1µg 超声破碎的 [³H]ssDNA (2x10⁵cpm/µg) 的实验缓冲液中, 于 72°C 孵育 4 小时, 检测显示所释放出来的辐射能小于 1%。

核酸内切酶污染检测: 取 10U DNA 聚合酶与 1µg λ DNA 在实验缓冲液中于 72°C 孵育 4 小时, 未观察到内切酶活性。

7.2 5 x Phire 反应缓冲液 (F-524)

5 x Phire 反应缓冲液中含有 7.5 mM MgCl₂, 反应时 MgCl₂ 的终浓度为 1.5mM。

8. 参考文献

1. Nord K. *et al.* (1997) *Nature Biotechnol.* 15: 772-777.
2. Wikman M. *et al.* (2004) *Protein Eng., Des. Sel.* 17: 455-462.
3. Chester N. & Marshak D.R. (1993) *Analytical Biochemistry.* 209: 284-290.

运输和贮存

Phire 热启动 II DNA 聚合酶于冰上运输。到达后即放入 -20°C 贮存。若贮存条件和处理方法得当, 该酶可在开封使用后于 -20°C 稳定保存一年。