



2×Flash PCR MasterMix(Dye)

目录号： CW3009M (5 ml)
CW3009H (40 ml)

保存条件： -20℃

产品内容

Component	CW3009M 5 ml	CW3009H 40 ml
2×Flash PCR MasterMix (Dye)	5×1 ml	40×1 ml
ddH ₂ O	5×1 ml	40×1 ml

产品简介

本品是由一款新型高效的快速DNA Polymerase、 Mg^{2+} 、dNTPs以及PCR稳定剂和增强剂组成的预混体系，浓度为2×。本产品为康为世纪独创的新型快速DNA聚合酶，具有极高的扩增速度与稳定性，延伸速度可达5 s/kb，最短十五分钟完成PCR，长片段（大于3 kb）或者复杂模板可以采用10-30 s/kb的延伸速度或者较多循环数。独创的MasterMix配方使整个反应体系非常稳定，同时复杂模板也能得到有效扩增，超过98%的PCR扩增能一次成功。使用时只需要加入DNA模板和引物，补足水即可反应，可最大限度地减少人为误差、降低污染和节约时间。

本产品已加入染料（蓝色），反应结束后可直接进行电泳检测。扩增得到的PCR产物3'端附有一个“A”碱基，因此可直接用于T/A克隆，并适用于康为无缝克隆试剂盒（CW3034）、T4连接试剂盒（CW0805）和感受态产品（CW0812）。

本产品主要适用于超快PCR、复杂模板、复杂二级结构、对高保真性有要求的基因克隆等实验和大规模基因检测。

质量控制

经检验无外源核酸酶活性；PCR方法检测无宿主残余DNA；能有效地扩增多种基因组中的单拷贝基因。

使用方法

以下举例为以人基因组DNA为模板，扩增1 kb的片段的PCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

PCR反应体系

试剂	50 μ l体系	25 μ l体系	20 μ l体系	终浓度
2 \times Flash PCR MasterMix (Dye)	25 μ l	12.5 μ l	10 μ l	1 \times
Forward Primer, 10 μ M	2 μ l	1 μ l	0.8 μ l	0.4 μ M
Reverse Primer, 10 μ M	2 μ l	1 μ l	0.8 μ l	0.4 μ M
Template DNA	<0.5 μ g	<0.25 μ g	<0.2 μ g	<0.5 μ g/50 μ l
ddH ₂ O	up to 50 μ l	up to 25 μ l	up to 20 μ l	

注意：引物浓度请以终浓度0.1-1.0 μ M作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。

PCR反应条件

步骤	温度	时间	
预变性	98 $^{\circ}$ C	30 s ¹⁾	
变性	94 $^{\circ}$ C	10 s	} 30-35 个循环数
退火	55-65 $^{\circ}$ C	15 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	5 -15 s/kb	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	1 min	

注意：

1) **注意：**对于简单模板，预变性时间可控制在30 s-1 min,对于复杂模板如菌液等，预变性时间可增加至2 min。

优化参数设定

1. 模板DNA量设定：

模板过量可能导致非特异性扩增或smear。50 μ l PCR反应体系中模板DNA推荐使用量如下：

- 人基因组DNA 5 ng-500 ng
- 大肠杆菌基因组DNA 50 pg-100 ng
- 质粒DNA 10 pg-1 ng

2. 引物浓度设定:

引物浓度可设为0.1 μM -1.0 μM 之间。引物浓度过低时可能导致扩增产物少。引物浓度过高会抑制特异性扩增，可能导致非特异性扩增。

3. 退火温度设定:

一般实验中退火温度比扩增引物的熔解温度 T_m 低 5°C ，无法得到理想的扩增效率时可适当降低退火温度；发生非特异性反应时可适当提高退火温度。对于复杂模板，需要调节退火温度实现高效扩增。

4. 延伸时间设定:

延伸时间应根据所扩增片段大小设定。以下为推荐的延伸时间:

质粒等简单模板: 5-15 s/kb;

常规基因组、cDNA模板: 10-15 s/kb;

复杂模板、粗提模板: 20-30 s/kb;

(延伸时间不宜过短应至少在5 s/kb以上，也不宜超过30 s/kb)。

5. 循环数设定:

可根据扩增产物的下游应用设定循环数。如果循环次数太少，扩增量不足；如果循环次数太多，错配机会增加，非特异性背景严重。所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途