



## 2×Flash Hot Start MasterMix (Dye)

**目录号：** CW3007M (5 ml)  
CW3007L (25 ml)  
CW3007H (40 ml)

**保存条件：** -20℃

### 产品内容

| Component                         | CW3007M<br>5 ml | CW3007L<br>25 ml | CW3007H<br>40 ml |
|-----------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 2×Flash Hot Start MasterMix (Dye) | 5×1 ml          | 5×5 ml           | 40×1 ml          |
| ddH <sub>2</sub> O                | 5×1 ml          | 5×5 ml           | 40×1 ml          |

## 产品简介

本品是由一种新型高效的DNA聚合酶、PCR Buffer、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs以及PCR稳定剂和增强剂组成的预混体系，浓度为2×。内含新型高效热启动酶，能够在低温条件下有效抑制引物的非特异性退火及引物二聚体引起的非特异性扩增。本品具有极高的扩增速度与稳定性，延伸速度可达5-15 sec/kb，适用于快速PCR反应，独创的MasterMix配方使整个反应体系非常稳定，超过98%的PCR扩增能一次成功，同时复杂模板也能得到有效扩增，并可最大限度地减少人为误差和污染。本产品已加入染料（蓝色），反应结束后可直接进行电泳检测。扩增得到的大部分PCR产物3'端附有一个“A”碱基，因此可直接用于T/A克隆。主要适用于快速PCR反应和对高保真性有要求的基因克隆等实验。

## 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。

### 1. PCR反应体系

| 试剂                                | 50 µl反应体系   | 终浓度           |
|-----------------------------------|-------------|---------------|
| 2×Flash Hot Start MasterMix (Dye) | 25 µl       | 1×            |
| Forward Primer, 10 µM             | 2 µl        | 0.4 µM        |
| Reverse Primer, 10 µM             | 2 µl        | 0.4 µM        |
| Template DNA                      | <0.5 µg     | <0.5 µg/50 µl |
| ddH <sub>2</sub> O                | up to 50 µl |               |

注意：引物浓度请以终浓度0.1-1.0 µM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。

## 2. PCR反应条件

| 步骤 | 温度     | 时间          |             |
|----|--------|-------------|-------------|
| 变性 | 98℃    | 10 sec      | } 25-35 个循环 |
| 退火 | 55-65℃ | 5 sec       |             |
| 延伸 | 72℃    | 5-15 sec/kb |             |

注意：如扩增样本为菌液需增加“预变性95℃ 5min”步骤。

### 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  $\mu$ 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 $\mu$ M-1.0  $\mu$ M 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℃，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，错配机率会增加，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