

2×Flash Hot Start MasterMix (Dye)

目录号: F665646 (5 ml)

F665646 (25 ml)

F665646 (40 ml)

保存条件: -20℃

产品内容

Component	5 ml	25 ml	40 ml
2×Flash Hot Start MasterMix (Dye)	5×1 ml	5×5 ml	40×1 ml
ddH ₂ 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、Mg²⁺、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。

上海阿拉丁生化科技股份有限公司

电话: 400-620-6333

1. PCR 反应体系

试剂	50 μ l 反应体系	终浓度
2×Flash Hot Start MasterMix (Dye)	25 μ l	1×
Forward Primer, 10 μ M	2 μ l	0.4 μ M
Reverse Primer, 10 μ M	2 μ l	0.4 μ M
Template DNA	<0.5 μ g μ g	<0.5 μ g/50 μ l
ddH ₂ O	up to 50 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。

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	25-35 个循环
延伸	72℃	5-15 sec/kb	25-35 个循环

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 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 μ M-1.0 μ 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，错配几率会增加，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。