



## Flash PCR Master Mix For Long Fragment

目录号：CW3397S (1 mL)

CW3397M (5 mL)

保存条件：-20±5°C保存。

### 产品内容

Component	CW3397S 1mL	CW3397M 5 mL
2×Flash PCR Master Mix For Long Fragment	1 mL	5×1 mL
ddH <sub>2</sub> O	1 mL	5×1 mL

### 产品简介

Flash PCR Master Mix For Long Fragment包含Super DNA Polymerase、dNTP、独特的延伸因子以及高性能的优化缓冲体系，只需加入引物和模板即可进行PCR实验，减少了复杂的加样过程。Super DNA Polymerase兼具5'→3'DNA聚合酶活性和3'→5'外切酶活性，其保真性约为Taq DNA聚合酶的80倍，扩增产物为平末端。该酶是经过多重封闭的高保真酶，在55 °C及以下有效封闭聚合酶活性，并在98 °C孵育30 s后快速恢复聚合酶活性，适用于100 bp-40 kb目的片段扩增，尤其适合扩增≥10kb的片段，扩增速度高达10s /kb，大幅节省PCR反应时间。

本产品具有延伸速度快、高保真性、扩增效率高、抑制性强等特点，可适配分子克隆，一代、二代、三代测序实验等相关下游应用。

## 使用说明

以下举例为常规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

所有操作请在冰上进行，组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回-20℃保存。

组分	25μL反应体系	终浓度
2×Flash PCR Master Mix For Long Fragment	12.5 μL	1×
Forward Primer, 10 μM	0.5-1 μL	0.2-0.4 μM
Reverse Primer, 10 μM	0.5-1 μL	0.2-0.4 μM
Template DNA	适量	< 200 ng
ddH <sub>2</sub> O	up to 25 μL	/

### PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98℃	30s-3 min <sup>1)</sup>	} 30-35个循环 <sup>4)</sup>
变性	98℃	10 s	
退火	根据引物T <sub>m</sub> 定 <sup>2)</sup>	10 s	
延伸	72℃	1-10 s/kb <sup>3)</sup>	
终延伸	72℃	5 min	

注意：

- 1) 预变性：质粒DNA、λDNA、简单基因组DNA等模板的预变性时间可设置为30 s-1 min，对于粗样品、高GC、人基因组等复杂的模板，预变性时间可延长至3min。
- 2) 退火：2×Flash PCR Master Mix For Long Fragment中含有较高离子浓度，反应退火温度可设置高于理论引物T<sub>m</sub>值2-3℃，如无法得到理想的扩增效率时，可梯度改变退火温度，进行优化；发生非特异性反应时，适当提高退火温度。
- 3) 延伸：根据其目的片段长度设置延伸时间，≥10 kb 设置延伸时间10 s/kb，如片段超长且扩增条带弱可适当增加延伸时间，扩增片段 < 10 kb 设置延伸时间1-5 s/kb。
- 4) 循环数：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，循环次数太多，错配机率会增加，所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。

## 常见问题与解决方案

1. 无扩增产物或扩增产物浓度低
  - 1) 可适当提高引物浓度;
  - 2) 设置梯度退火, 找到合适退火温度;
  - 3) 适当增加延伸时间或增加PCR循环数;
  - 4) 调整模板使用量或使用高纯度模板。
2. 非特异较多或条带弥散
  - 1) 尝试提高退火温度;
  - 2) 适当降低引物浓度;
  - 3) 减少循环数;
  - 4) 调整模板使用量或使用高纯度模板;
  - 5) 优化引物设计。