

2×Multiplex PCR Mix 说明书

产品组成

Cat. No.	7010001	7010005
2×Multiplex PCR Mix	1 ml	1 ml×5
25 mM MgCl ₂	0.5 ml	1.25 ml×2
ddH ₂ O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20℃保存有效期为两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

2×Multiplex PCR Mix 是一种优化的两倍浓度的多重 PCR 预混合液，包含 dNTPs、MgCl₂、multiplex PCR Buffer、HS Taq DNA Polymerase 和一些能提高扩增效率及减少引物二聚体形成的 PCR 添加剂，可以满足多组 PCR 引物在同一体系中进行良好的扩增，用户只需要添加模板、引物和水，即可配成 PCR 反应体系。

HS Taq DNA Polymerase 是性能表现优异的耐热 DNA 聚合酶，该酶利用抗体修饰实现热启动，必须 94℃ 加热 5 分钟才能充分释放酶活，保证了高特异性。该酶在低温或常温下无聚合酶活性，可在常温进行 PCR 体系配制。高纯度的 dNTPs 可以进一步保证扩增的特异性。如果模板特殊，还可以通过调节 Mg²⁺ 的浓度改善扩增效果。

PCR 体系成分

- 模板 DNA 的纯度：**很多残留的核酸提取试剂会影响 PCR 反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如 SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板（比如煮沸法获取的模板）用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10（比如 50 μl 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 μl）。如果模板 DNA 纯度太差，可使用 Simgen DNA 纯化试剂盒（Cat. No.2101050）对模板 DNA 进行纯化及浓缩，纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
- 模板 DNA 用量：**极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板，但为保证反应的稳定性，50 μl 体系建议使用 10⁴ 拷贝的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量：

人基因组DNA：	50 ng~500 ng/50 μl PCR反应体系
大肠杆菌基因组DNA：	10 ng~100 ng/50 μl PCR反应体系
λDNA：	0.5 ng~5 ng/50 μl PCR反应体系
质粒DNA：	0.1 ng~10 ng/50 μl PCR反应体系

 如需用扩增产物作为模板再扩增，应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用。
- 多重引物设计：**引物设计时要尽量将各组引物的退火温度设计的较为接近。如果要在同一段 DNA 序列设计多组引物，必须避免扩增片段有重叠的序列，同时尽量增加各个扩增片段之间的间隔。在进行多重 PCR 反应之前，需要对每一对引物进行单独扩增，验证引物的特异性、扩增效率、最佳的退火温度和时间。建议对每一对引物进行梯度 PCR，从而选取一个对所有引物都较友好的退火温度和时间。
- 引物浓度：**根据每对引物的扩增效率来调整每对引物在多重 PCR 反应体系中的用量。在一次多重 PCR 反应中，每种引物终浓度通常为 50 nM~200 nM。当一些引物扩增效率低于其它引物时，提高引物浓度将有助于其扩增。比如在一次实验中一个扩增子的得率低于其它扩增子，提高该扩增子的引物浓度将有助于增加其得率。

PCR 参数设置

- 预变性：**一般预变性为 94℃，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Taq 酶的活性。
- 退火：**退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能产生引物二聚体或非特异性扩增。在多重 PCR 中，退火时间的长短对扩增结果也有很大影响，时间过短可能降低产量，时间过长可能产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议直接选用 55℃/45 sec 作为退火温度和时间，或者根据各对引物的梯度 PCR 结果选取一个折中的退火温度和时间。
- 延伸：**延伸温度通常为 72℃，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 1 kb/min 计算所需延伸时间，时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后继续延伸 5~10 min，以获得完整的双链产物。
- 循环数：**一般使用 25~35 个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。过多的循环数可能会增加非特异性扩增，减少特异性产物。

操作步骤：

1. 将 2×Multiplex PCR Mix、25 mM MgCl₂、ddH₂O、模板 DNA 解冻，置于冰上。
2. 将引物冻干粉配成 100 μM 溶液，根据下列方法配制 10×Primer Mix(每种引物含有 2 μM，也可根据每个引物的扩增效率增减浓度)

引物1 Forward Primer (100 μM)	10 μl
引物1 Reverse Primer (100 μM)	10 μl
引物2 Forward Primer (100 μM)	10 μl
引物2 Reverse Primer (100 μM)	10 μl
.	.
.	.
引物n Forward Primer (100 μM)	10 μl
引物n Reverse Primer (100 μM)	10 μl
ddH ₂ O	补至 500 μl
Total	500 μl

3. 将解冻后各个组分上下翻转混合均匀，按下列组成配制 PCR 反应液：

2×Multiplex PCR Mix	25 μl
10×Primer Mix	5 μl
模板	n μl
ddH ₂ O	(20-n) μl
Total	50 μl*

* 注意：上述例子为 50 μl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。

4. 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，简短离心。
5. PCR 反应循环设置举例

94°C 5 min
 94°C 30 sec
 ※55°C 45 sec } 30 Cycles
 § 72°C 1 min
 72°C 5 min

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以 1 kb/min 计算，多重 PCR 扩增以最长片段所需的时间为准。

6. 结果检测：取 5-10 μl 扩增产物直接进行琼脂糖凝胶电泳检测。

琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系：

琼脂糖浓度	最佳线形 DNA 分辨范围
0.5%	1,000~30,000
0.7%	800~12,000
1.0%	500~10,000
1.2%	400~7,000
1.5%	200~3,000
2.0%	50~2,000

常见问题分析

常见问题	可能的原因	意见&建议
PCR 产物偏少或者没有	退火温度过高	以 2~4°C 为变量，降低退火温度。
	退火时间太短	增加退火时间。
	模板 DNA 不足或质量差	按照说明书添加相应的模板 DNA，或更换高质量的模板 DNA。
	Mg ²⁺ 浓度不是最优	调节 Mg ²⁺ 浓度。
	引物浓度不是最优	以 50 nM 为变量，将引物减少或增加，在 50~200 nM 的范围内优化每种引物的浓度。
	循环数偏少	增加循环数。
扩增出现非特异性产物	引物设计不完善	检测引物特异性。
	退火温度过低	提高退火温度，进行梯度 PCR，找到最优的退火温度。
	退火时间太久	减少退火时间。
	循环数太多	减少循环数。
	模板 DNA 过量或模板降解	按照说明书添加相应的模板 DNA，或更换高质量的模板 DNA。
	引物降解或浓度太高	检查引物质量或减少引物用量。
部分引物无扩增产物或扩增效率低	引物扩增效率低或浓度偏少	提高相应引物用量。
	引物设计不完善，T _M 值相差较大或扩增目的片段间 GC 含量相差较大	重新设计引物并进行扩增检测。