

Version 1

Cat No. AG12308

多重 PCR 试剂盒

Multiplex PCR Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本制品是用于多重 PCR 反应的试剂盒，能在一个 PCR 反应体系中，对多个基因同时进行检测，适用于 2 kb 以下 DNA 片段的多重 PCR 扩增。Multiplex DNA Polymerase 缺乏野生型 Taq 的 5' →3' 核酸外切酶活性，具有高度灵敏，高扩增效率，高特异性等特点。此外，本制品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA Polymerase 活性的单克隆抗体，可以进行 Hot Start PCR，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

➤ 产品组成

组分名称	AG12308 (50 rxns / 50 μl)
Multiplex DNA Polymerase (1U / μl)	50 μl
2X Multiplex PCR Buffer (Mg ²⁺ and dNTP plus)	1.25 ml

➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或-20°C冰袋运输

➤ 活性定义

在 74 °C、30 分钟内，以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板 / 引物，将 10 nmol 脱氧核苷酸摄入到酸不溶物质所需的酶活性定义为 1 个活性单位 (U)。

➤ 产品优势

1. 本制品具有高灵敏度，高扩增效率、高特异性等特点。
2. 适用范围广，能扩增不同模板类型的多重 PCR，以 Human gDNA 为模板可扩增至少 20 重的 DNA 片段，以 λ DNA 为模板可扩增至少 9 重的 DNA 片段。
3. 特异性好，本产品中添加了能够抑制 Multiplex DNA 聚合酶活性的单克隆抗体，可以进行热启动反应。在进行 PCR 反应前，抗体与酶结合抑制 Taq 聚合酶的活性，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

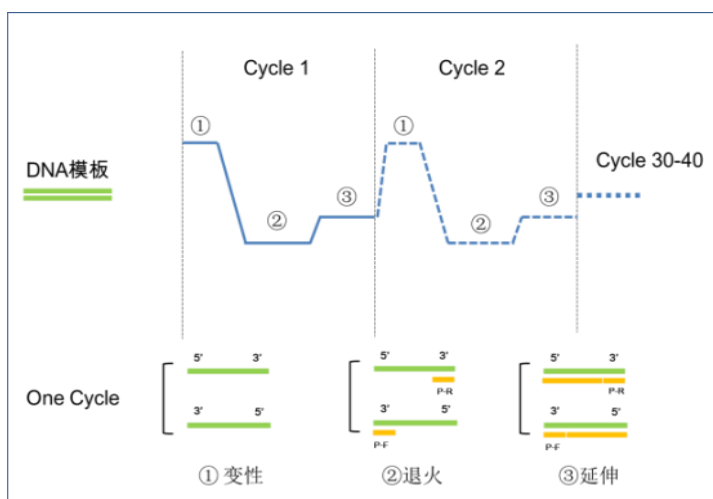
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



➤ 使用注意事项

1. 产品中 Multiplex DNA Polymerase 甘油浓度较高，使用前短暂离心，将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻轻吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。
2. 试剂盒中的各组分均需要在 -20°C 保存，使用前于冰上溶解，轻柔混匀后再进行使用。
3. 反应体系需要在冰上配制，配制完后放进 PCR 仪中进行反应。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。

2. 仪器：

PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

1. 配制 PCR 反应液：在冰上配制反应液。

反应体系 (50 μl)

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
Multiplex DNA Polymerase (1U/μl)	1U ^{*1}	1 μl
2X Multiplex PCR Buffer (Mg ²⁺ and dNTP plus)	1 X	25 μl
Primer F (100 μM) ^{*2}	0.2 μM	0.1 μl
Primer R (100 μM) ^{*2}	0.2 μM	0.1 μl
Template ^{*3}	100 ng	-
RNase free water	-	Up to 50 μl

*1: 通常酶的加入量为 1 U, 如扩增结果不理想可尝试提升酶量, 酶量可在 1 U ~ 2 U 之间进行调整。

*2: 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好的结果, 可根据具体实验情况在 0.1~ 0.5 μM 范围内调整引物浓度。

*3: 一般加入 100 ng 模板可获得较好的结果; 若扩不出条带, 可考虑增加模板, 在 ≤500 ng 范围内调整。若出现非特异性扩增, 可考虑降低模板量, 提高特异性。

2. 反应程序 (以三步法 PCR 扩增为例^{*8})

将加好样的 Tube 放置于 PCR 仪中, 然后按照下表条件进行 PCR 反应:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2 min ^{*4}	1
变性	95°C	30 sec	} 30-35 ^{*7}
退火	60°C ^{*5}	30 sec	
延伸	68°C	1 min / kb ^{*6}	
最终延伸	68°C	10 min	1

*4: 预变性条件 95°C 2 min 可获得比较好的结果, 对于特别复杂的模板, 如扩增结果不理想, 预变性时间可在 2~5 min 范围内调整。

*5: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值, 通常可按照 T_m ± 5°C 设定。

*6: 延伸速度一般根据扩增最长的目的片段, 按照 1 min / kb 设置。

*7: 推荐使用 30 个循环, 若 30 个循环扩增效果不好, 可尝试增加 PCR 反应循环数至 35 个循环。

*8: 当引物 T_m 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好, 可尝试两步法 PCR 扩增 (两步法 PCR 反应程序可参考附录)。

3. 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物可进行琼脂糖凝胶电泳检测。

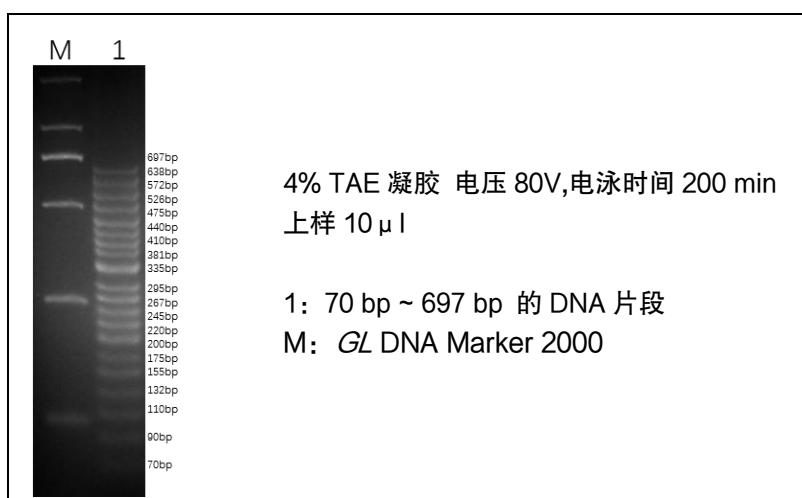
➤ 实验例

- 以 Human gDNA 为模板，采用本试剂盒进行 20 重 PCR 扩增（70 bp ~ 697 bp），能成功扩增出多达 20 个目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	} 30
60°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	10 min	1

电泳结果如下图所示：

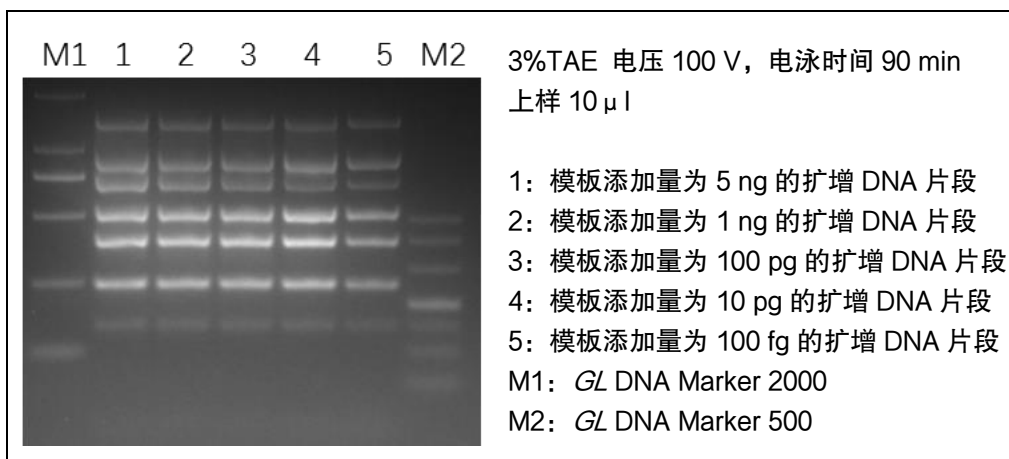


- 以 λ DNA 为模板，添加不同的模板量（5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、100 fg），采用本试剂盒扩增 7 重 DNA 片段（150 bp，250 bp，400 bp，535 bp，750 bp，948 bp，1500 bp），模板量低至 100 fg 时，能扩增出目的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	} 30
60°C	30 sec	
68°C	1 min 30 sec	
68°C	10 min	1

电泳结果如下图所示：

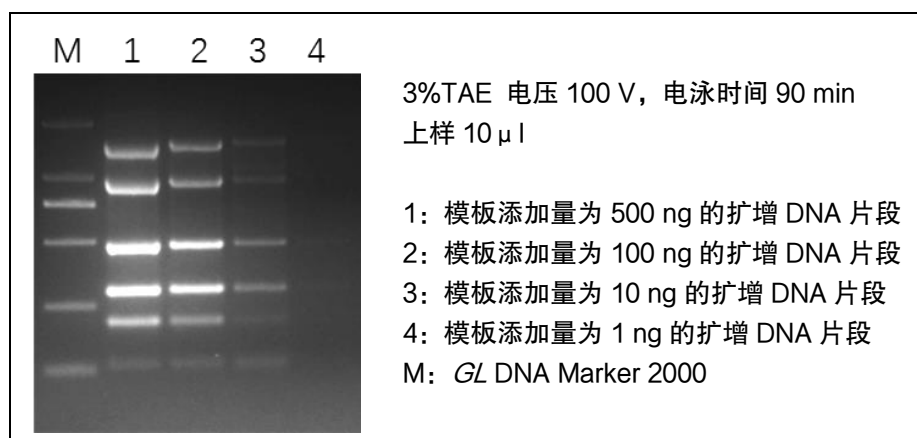


3. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量（500 ng、100 ng、10 ng、1 ng），采用本试剂盒扩增 6 重(100 bp, 207 bp, 300 bp, 500 bp, 1005 bp, 1535 bp)DNA 片段，模板量低至 10 ng 时，能扩增出目的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	} 30
60°C	30 sec	
68°C	1 min 30sec	
68°C	10 min	1

电泳结果如下图所示：

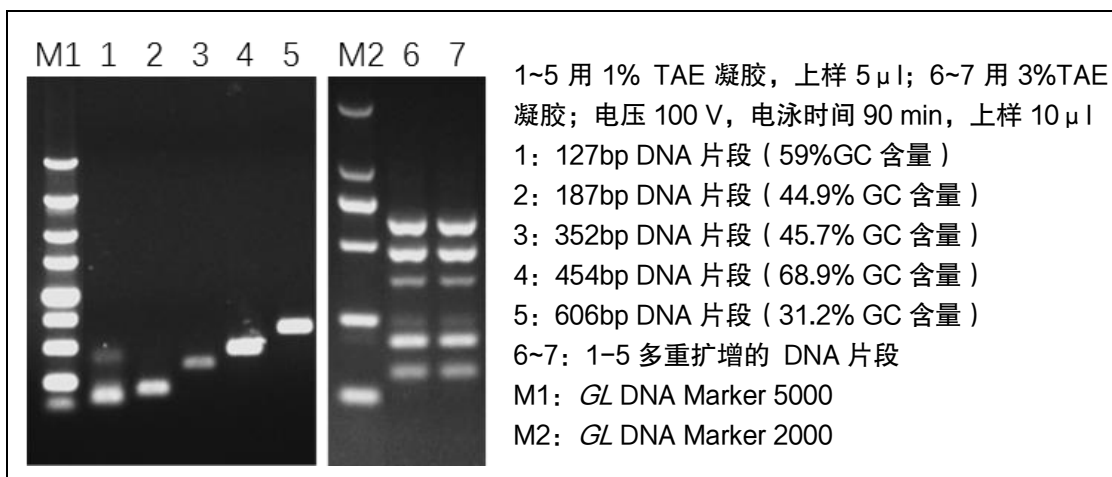


4. 以 Mouse gDNA 为模板，采用本试剂盒，扩增不同 GC 含量的 DNA 片段，均能扩增出目的 DNA 片段。单重与多重所用的程序及模板量均相同。

反应程序:

温度	时间	循环数
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	} 30
60°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	10 min	1

电泳结果如下图所示:

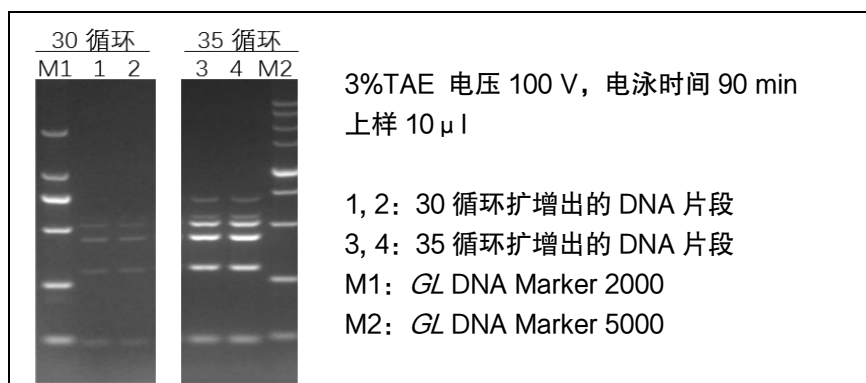


5. 以水稻 gDNA 为模板, 采用本试剂盒不同循环数扩增进行 6 重(94 bp-712 bp)扩增, 35 循环能扩增出目的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	} 30-35
60°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	10 min	1

电泳结果如下图所示:



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性严重影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率，降低外源污染。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。建议更换模板，重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 合适的引物浓度为 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{M}$ 。重数较多时，建议引物用量不超过 $0.3 \mu\text{M}$ 。
- ❖ 引物浓度降低：可能会导致反应效率降低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度升高：导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 可预先逐一对各个目的基因进行扩增，确认引物可用性。
- ❖ 引物设计的原则：
 - ① 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 - 60 % 之间。
 - ② 建议正反向引物 T_m 值在 $50-70^\circ\text{C}$ (尽量控制在 60°C 左右)，两引物 T_m 值相差不超过 5°C ，尽量减小各引物之间的 T_m 值差。
 - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
 - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
 - ⑤ 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列。

3. 合适的退火条件

- ❖ 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值，通常可按照 $T_m \pm 5^\circ\text{C}$ 设定。
- ❖ 退火温度升高，可能会造成引物与模板结合困难，降低扩增效率，但同时可能提高扩增特异性。若出现扩增条带弥散，可尝试提高退火温度。
- ❖ 若引物 T_m 值较高，使用 68°C 退火/延伸步骤的两步法程序可能更好的结果。

4. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始拷贝数。如果模板的初始拷贝数少于 10 个，则需要大约 40 个循环。对于初始拷贝数较高的模板，一般推荐 25-35 个循环。

- ❖ 扩增循环数增加，一定程度上可增加扩增产量，但可能会导致扩增特异性降低，出现弥散条带。

5. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域最好分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

➤ 附录：两步法 PCR 反应程序

(两步法 PCR 反应程序)

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2 min	1
变性	95°C	30 sec	} 30-35
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	68°C	10 min	1