

Multiplex PCR Kit

PM101-01/02/03

Version 5.1



Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

多重PCR是一种允许在单个PCR反应中同时对多个基因座位进行扩增的PCR技术，已被广泛应用于科学研究和疾病诊断等多个领域，特别适用于微量样本的多位点检测。试剂盒基于多重PCR专用热启动聚合酶Multiplex DNA Polymerase，提供最高的扩增特异性和灵敏度。配以针对多重PCR深度优化的2 × Multiplex Buffer，Multiplex PCR Kit能够在默认条件下完成绝大多数多重PCR检测，且适应性广泛，最大程度上减少了反应体系优化步骤。

产品组成

组 分	PM101-01 (50 rxn/50 µl/rxn)	PM101-02 (200 rxn/50 µl/rxn)	PM101-03 (1,000 rxn/50 µl/rxn)
Multiplex DNA Polymerase	50 µl	200 µl	
2 × Multiplex Buffer	1.25 ml	4 × 1.25 ml	PM101-02 × 5
5 × Multiplex GC Enhancer	700 µl	4 × 700 µl	

储存条件

所有组分-20°C保存，有效期一年。

注意事项

1. 推荐引物设计原则：引物长度21 - 30 bp，GC含量40% - 60%，退火温度68°C以上。
(推荐使用Vazyme CE Design V1.03软件或Primer Premier 5计算引物退火温度)
2. 推荐目标片段不超过1500 bp。
3. 预先单独检测每对引物的扩增情况，尽可能挑选扩增特异性好的引物对进行组合。
4. 推荐每条引物反应终浓度为0.1 µM。如某些目标片段产量偏低，可适度提高其对应引物使用量以提高扩增产量。

推荐反应体系

制备10 × Primer Mix：预先混合所有扩增引物，使每条引物终浓度为1 µM。

在灭菌PCR管中配置如下反应体系，各组分解冻后轻混匀，使用后放回-20°C保存。

Nuclease-free water	up to 50 µl
模板 ^a	x µl
10 × Primer Mix ^b	5 µl
2 × Multiplex Buffer	25 µl
5 × Multiplex GC Enhancer (可选) ^c	5 - 10 µl
Multiplex DNA Polymerase	1 µl

a. 50 µl反应中推荐模板量：人的基因组100 ng，质粒100 pg，cDNA 1 - 5 µl。

b. 推荐引物反应终浓度为每条引物0.1 µM，可在0.05 - 0.4 µM之间调整。

c. 可显著提高复杂模板，尤其是高GC扩增子的扩增效率。一般情况下无需添加，当反应无法正常进行时推荐尝试。可能会降低保真度，慎用！

推荐反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min ^b	1
变性	95°C	30 sec	} 35°
退火	60°C ^a	90 sec ^c	
延伸	72°C	60 sec/kb ^d	
彻底延伸	72°C	10 min	1

- a. 多数情况下，使用默认退火温度即可。如扩增效果不佳，可通过退火温度梯度实验来摸索最适退火温度。
- b. 预变性时间为5 min，用于充分释放酶活。请勿降低温度或缩短时间！
- c. 扩增低拷贝模板、长片段或者扩增片段较多，可延长退火时间至3 min以提高扩增效率。
- d. 延伸时间以最长片段为准。适度延长延伸时间有助于提高扩增产量且有利于困难模板扩增。然而，延伸时间太长会导致非特异性扩增增多，可通过缩短延伸时间来提高扩增特异性。
- e. 微量样本扩增时，可通过增加循环数提高扩增产物量。然而，循环数太多会导致非特异性扩增增多，可通过减少扩增循环数来提高扩增特异性。

应用实例

以人基因组为模板，使用Multiplex PCR Kit扩增引物组FVIII-19，片段大小分别为70 bp、97 bp、112 bp、128 bp、167 bp、178 bp、212 bp、243 bp、267 bp、288 bp、306 bp、350 bp、383 bp、419 bp、531 bp、635 bp、710 bp、843 bp、916 bp。所有扩增引物T_m值都位于68°C左右(Primer Premier 5计算)。反应体系及扩增程序如下：

Nuclease-free water	18 μ l
1 - 500 ng/ μ l人基因组DNA	1 μ l
10 \times Primer Mix	5 μ l
2 \times Multiplex Buffer	25 μ l
Multiplex DNA Polymerase	1 μ l

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	30 sec	35
退火	60°C	90 sec	
延伸	72°C	60 sec	
彻底延伸	72°C	10 min	1

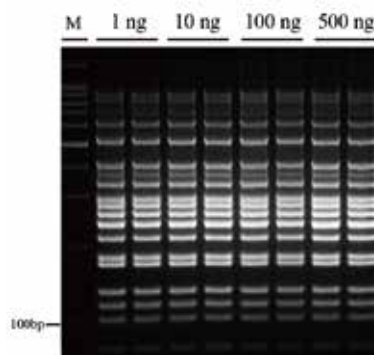


图1. 扩增产物电泳检测结果

常见问题及解答

1. 扩增产物少或没有扩增。

- (1) 确认PCR程序预变性条件为95°C/5 min，以充分释放Multiplex DNA Polymerase活性。
- (2) 使用高质量的引物，检查引物是否降解，确认引物浓度为0.1 μ M。
- (3) 增加PCR循环数。
- (4) 降低退火温度(间隔1-3°C)，必要时进行退火温度梯度尝试。确认退火时间为90 sec，必要时可延长退火时间至3 min。
- (5) 检查单对引物的扩增性能和特异性。
- (6) 扩增子高GC或含有复杂二级结构时，推荐尝试Multiplex GC Enhancer，添加终浓度为0.5 - 1.0 \times 。
- (7) 使用高质量的模板；确认DNA模板纯度、浓度；增加模板使用量。
- (8) 产物过长，重新设计引物。
- (9) 延长循环内延伸时间、延长彻底延伸时间。
- (10) 提高低产或缺失扩增子引物使用量。

2. 存在非特异性扩增。

- (1) 减少循环数。
- (2) 提高退火温度。
- (3) 减少引物使用量。
- (4) 重新设计引物。
- (5) 扩增子高GC或含有复杂二级结构时，推荐尝试Multiplex GC Enhancer，添加终浓度为0.5 - 1.0 \times 。

3. 电泳时条带模糊。

- (1) 减少循环数(每次减少3个循环)。
- (2) 减少起始模板量。
- (3) 延长彻底延伸步骤时间至15 - 30 min。
- (4) 降低电泳电压，更换新的电泳缓冲液。