



Mutiplex PCR Kit

货号：M312A/B

保存温度：-20℃

● 产品包装

组分	M312A	M312B
Mutiplex PCR Polymerase	50 μL	200 μL
2× Mutiplex PCR Buffer	1.25 mL	1.25 mL× 4

● 产品概述

本产品允许在单个 PCR 反应中同时对多个基因座位进行 PCR 扩增,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 Mutiplex PCR 聚合酶，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× Mutiplex PCR Buffer，Mutiplex 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。

● 使用前注意事项

- 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 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。

● 操作方法

1) 反应体系准备。

Add RNase free ddH ₂ O	Up to 50μL
模板☆	X μL
10×Primer Mix☆☆	5 μL
2× Mutiplex PCR Buffer	25 μL
Mutiplex PCR Polymerase	1 μL

☆ 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。

☆☆ 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。

2) 在 PCR 仪上运行如下反应条件：

95°C	10 min	1 Cycle
95°C	30 sec	35 Cycles
60°C	90 sec	
72°C	1min/kb	
72°C	10min	1 Cycle

注意：

- ✓ 预变性时间为 10min，用于充分释放酶活。请勿降低温度或缩短时间！
- ✓ 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。
- ✓ 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。

- ✓ 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。
- ✓ 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。

● 常见问题及解决办法

- i. 扩增产物少或没有扩增。
 - 1) 确 PCR 程序预变性条件为95°C 10min,以充分释放 Multiplex PCR 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 μM。
 - 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) 使用高质量的模板；确认 DNA 模板纯度、浓度；增加模板使用量。
 - 7) 产物过长，重新设计引物。
 - 8) 延长循环内延伸时间、延长彻底延伸时间。
 - 9) 提高低产或缺失扩增子引物使用量。
- ii. 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。
- iii. 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。

技术咨询：

QQ/973107308 Tel/18927539098 Email/enzyvalley@163.com