

描述: Multiplex PCR 又称多重 PCR, 是指在同一 PCR 反应体系里加上两对以上引物, 同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应, 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。

本制品使用具有极强扩增性能的热启动 RAPA3G DNA 聚合酶和优化的多重 PCR 反应缓冲液, 使其可有效扩增 20 重以上的 PCR, 具有极高的灵敏度, 最大程度上减少了反应体系优化步骤。

特性

- RAPA3G DNA 聚合酶, 扩增性能强, 抗杂质能力极高
- 完全封闭的热启动特性, 50°C 以下 100% 无活性
- 优化的反应缓冲体系, 避免非特异性扩增
- 高灵敏度, 有效扩增 0.1ng 的人基因组 DNA (20 重)

组分

名称	80Tx25µl	800Tx25µl
2xRAPA3G Multiplex PCR Mix	1 ml	1 ml x10

储存: 长期储存置于 -20°C 以下, 可保存 2 年; 短期使用置于 4°C (3 个月) 保存。

使用方法

1. 按下表配制反应体系并混合均匀:

2xRAPA3G Multiplex PCR Mix	12.5 µl
10xPrimer mix	2.5 µl
*模板 DNA	0.1~100 ng
ddH ₂ O upto	25 µl

*模板 DNA: 人的基因组 100 ng, 质粒 100 pg, cDNA 1-5 µl。

2. PCR 扩增循环参数

循环数	温度	时间
预变性	95°C	5min
	95°C	20s
30-35Cycles	57~60°C	60s
	72°C	2kb/min
末延伸	72°C	10min

请注意: 该制品为热启动制品预变性步骤 5min 不可缩短, 否则 DNA 聚合酶无法恢复活性。

3. 电泳: 1kb 以内的扩增产物建议使用 3%~4% 琼脂糖凝胶, 电压使用 80V, 可以有效的分离各扩增片段。

4. 注意事项:

(1) 当模板 GC 含量 >70% 时, 请添加 5xQ-Solution (Cat. No.: A3002)。

(2) 推荐引物设计原则: 引物长度保持在 22 - 30 bp, 扩增产物长度在 2kb 以下, GC 含量 50% - 60%, 尽量减少各引物之间 TM 的差值。

(3) 检测单引物特异性: 多重 PCR 反应前, 应对设计的引物逐一扩增, 以确定是否有非特异性扩增和扩增效率。

(4) 引物推荐使用浓度: 推荐扩增片段 <300bp 每条引物的反应终浓度为 0.2-0.3 µM, 扩增片段 >300bp 每条引物的反应终浓度为 0.05-0.15 µM, 如某些目标片段产量偏低或偏高, 可适度调整其对应引物使用量以优化反应结果。

(5) 反应前需将引物制成 10xPrimer Mix:

引物储存液	用量	10x 浓度
引物 1 F (100µM)	1 µl	1 µM
引物 1 R (100µM)	1 µl	1 µM
引物 2 F (100µM)	0.5 µl	0.5 µM
引物 2 R (100µM)	0.5 µl	0.5 µM
.....		
引物 n F (100µM)	3 µl	3 µM
引物 n R (100µM)	3 µl	3 µM
ddH ₂ O Upto	100 µl	

常见问题及解答:

1. 扩增产物少或没有扩增。

(1) 降低退火温度 (每个梯度降低 1°C)。

(2) 增加模板量

(3) 增加 PCR 循环数。

(4) 增加退火时间为 90 sec, 必要时可延长退火时间至 3 min。

(5) 增加引物使用量。

2. 存在非特异性扩增。

(1) 减少循环数, 提高退火温度 (每个梯度降低 1°C)。

(2) 减少引物使用量。

(3) 重新设计引物。

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) 减少退火时间。