

高特异性多重 PCR 试剂盒

目录号：AK0101

使用前请仔细阅读说明书

Multiplex PCR kit (High specificity)/高特异性多重 PCR 试剂盒

产品说明

本产品是针对多重 PCR，专门研发的抗体法热启动 Multiplex PCR 试剂盒。试剂盒所用 Taq 酶为新一代热启动 Taq DNA 聚合酶，大大提高了模板-引物 DNA 的结合力，从而使扩增特异性和扩增产量得到显著提升。多重 PCR 缓冲体系经专门优化，可兼容宽泛的产物 GC 含量、引物 Tm 值，同时亦可兼容全血、血卡等样本直扩，无需额外优化，即可在 60℃通用退火温度下完成大多数多重 PCR 检测。

本试剂盒的热启动 Taq 聚合酶搭配专门优化的 PCR Buffer，极大地提高了 PCR 的扩增效率，使同一个 PCR 反应体系中所有的引物都能得到高效延伸，无需额外优化；同时 PCR 扩增偏好性很低，对不同类型的引物和模板扩增效率一致性高，在获得极高产量的同时保持良好的多重片段扩增均一性和特异性，可以有效减少由引物错配引起的非特异性扩增。

产品组成

组 分	AK0101A (200 次/20μl)	AK0101B (1000 次/20μl)
2×Multiplex Buffer (High specificity)	2 × 1 ml	10.0 ml
Multiplex Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	80 μl	400 μl

保存

-30 至-20℃保存，-20 度至 4℃运输

产品特点

高均一性：所有的引物都能得到高效延伸；对不同类型的引物和模板扩增效率一致；

高特异性：有效减少由引物错配引起的非特异性扩增；

高产量：在各种体系中，扩增产物产量很高；

良好兼容性：兼容不同 GC 含量（25%-75%）扩增片段，兼容不同 Tm 值的引物。

适用范围

多重 PCR 扩增；MLPA（multiplex ligation probe amplification）扩增；病原体的多重 PCR 检测和分型；分子杂交检测等。

注意事项

1. 引物设计对于多重 PCR 扩增的成功与否至关重要。首先，引物设计需要满足常规的引物设计规则，避免出现非特异性扩增和无法扩增。同时，应逐一 PCR 验证设计好的引物对，选择效果较好的引物对用于多重 PCR 扩增。推荐使用 PAGE 纯化的高质量引物。
2. 用于多重 PCR 扩增，推荐目标片段不超过 3,000 bp。
3. 推荐每条引物终浓度为 0.2 μM。由于不同批次合成的引物产量有差异，在新合成的引物使用前，应先通过 PCR 对其真实浓度进行校准。如某些目标片段扩增产量偏低，可适度提高对应引物用量，以提高该片段扩增产量。
4. 扩增产量低时，可适当提高引物浓度；发生非特异性扩增时，可适当降低引物浓度。

推荐引物设计原则：

- 1) 引物长度 20- 30 bp，GC 含量 40% - 60%，退火温度 68℃以上。
- 2) 引物 A、G、C、T 整体分布尽量均匀，避免使用 GC 或者 TA 含量高的区域，尤其是 3' 端必须避开 GC 含量不均匀的区域。
- 3) 引物设计时请尽量避开 T/C 或者 A/G 的连续结构。
- 4) 引物 3'端最后 5 个碱基不能包含 2 个以上的 G 或者 C。

应用举例/实验流程

1. 反应体系

制备 5 × Primer Mix: 预先混合所有扩增引物，使每条引物终浓度为 1 μM。

在 PCR 管中配制如下混合液：

2 × Multiplex Buffer ^a	10.0 μl
Multiplex DNA Polymerase (5 U/μl) ^b	0.4 μl
5 × Primer Mix ^c	5 μl
Template DNA ^d	x μl
ddH ₂ O	Up to 20 μl

a. 包含 dNTP Mix、Mg²⁺等。

b. 一般来说，酶量越高，扩增能力越强，特异性越差。

c. 推荐每条引物反应终浓度为 0.2 μM，可在 0.05 - 0.4 μM 之间调整。

d. 25 μl 反应体系中推荐模板量：人的基因组 50 ng，质粒 500 pg，cDNA 1 - 2.5 μl

2. 按下列条件进行 PCR 反应

标准程序：

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

a. 多数情况下，使用默认退火温度 60 度即可。如扩增效果不佳，可通过设置退火温度梯度，来摸索最适退火温度。

b. 预变性时间可根据不同模板类型进行调整。纯化的核酸样本，预变性时间为 30 sec；全血、血卡等样本直扩时，可适当将预变性时间延长至 5 min。

c. 扩增低拷贝数模板、长片段或者扩增片段多于 10 重时，可适当延长退火时间至 3 min 以提高扩增效率。

d. 延伸时间以最长片段为准。然而，延伸时间太长会增加非特异性扩增，需要优化确定最佳延伸时间，以确保扩增特异性。

e. 微量样本扩增时，可通过增加循环数来提高扩增产量。然而，循环数太多会导致非特异性扩增增多，需要优化确定最佳循环数，以确保扩增特异性。

快速程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	15 sec	25-30
退火	60°C ^a	30 sec ^a	
延伸	72°C	30 sec/kb	
末轮延伸	72°C	5 min	1

a. 快速程序会降低扩增产量，初次扩增建议采用标准程序。

常见问题与答案

Q1: 扩增产物少或扩增失败

A1:

1. 增加 PCR 循环数，但循环数不易过高，以不超过 35 轮为好。
2. 降低退火温度(间隔 1 ~ 3°C)，或进行退火温度梯度优化。确认退火时间为 90 sec，必要时可延长退火时间至 3 min。
3. 延长循环扩增阶段的延伸时间；延长末轮延伸时间。
4. 使用高质量的模板。确认 DNA 模板纯度、浓度；增加模板使用量。
5. 提高低产或缺失扩增子引物使用量，或对其进行 PCR 条件优化。
6. 若有些产物过长，则重新设计引物，降低扩增片段长度。
7. 逐一检查扩增效率低或扩增失败的单对特定引物的扩增性能和特异性。
8. 使用高质量的引物，例如 PAGE 纯化的引物。检查引物是否降解，确认引物终浓度为 0.2 μ M。
9. 血液、血卡、拭子等样本的直扩验时，确认 PCR 程序预变性条件为 95°C/5 min，以充分释放模板。

Q2: 存在非特异性扩增

A2:

1. 减少循环数(每次减少 3 个循环)。
2. 提高退火温度或进行退火温度梯度优化。
3. 减少非特性扩增产物所对应条带的引物使用量。
4. 以 80%，60%，50%酶量进行 PCR，降低优化酶量。
5. 重新设计引物，并通过 PCR 验证新设计引物对的扩增性能和特异性，提高引物特异性。

Q3: 电泳时条带模糊

A3:

1. 2 倍梯度减少起始模板量。
2. 优化循环数(每次减少 3 个循环)。
3. 延长末轮延伸步骤的时间至 15 - 30 min。
4. 降低电泳电压，更换新的电泳缓冲液。

警告: 本产品仅限科研使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。