

## 2× Multiplex PCR Master Mix

含染料	PT112-01	PT112-02
2xMultiplex PCR Master Mix	1 ml	5×1 ml
diH <sub>2</sub> O	1 ml	5×1 ml

不含染料	PT113-01	PT113-02
2xMultiplex PCR Master Mix	1 ml	5×1 ml
diH <sub>2</sub> O	1 ml	5×1 ml

### ● 储存条件

-20°C长期保存；反复冻融16次不影响使用效果；如果频繁使用，建议储存于4°C。

上海莱枫生物科技有限公司

www.lifefeng.com

电话：021-64810180 传真：021-54252754

技术支持：13817902990(上海)

### ● 产品简介

多重PCR(Multiplex PCR)是在同一PCR反应体系里加上二对以上引物，同时扩增出多个位点DNA片段的PCR反应。

2×Multiplex PCR Master Mix是基于Taq DNA Polymerase的两倍浓度的PCR预混合液。本产品针对多重PCR的特点，优化了Taq DNA Polymerase、dNTP、Mg<sup>2+</sup>和其他盐离子的配比，同时添加了PCR增强剂和蛋白稳定剂协同提高了PCR效率和灵敏度。

产品使用方便，只需要取0.5倍PCR体系体积的2×Taq PCR Master Mix，加入引物和模板，以diH<sub>2</sub>O补足体积即可，大大减少了加样误差。产品分为含染料(目录号：PT112)和不含染料(目录号：PT113)两种，含染料的产品反应结束后可以直接电泳。

### ● 指示染料说明

目录号：PT112含红色和黄色两种电泳指示染料。两者不会抑制PCR，也不会抑制酶切和连接等下游酶反应，不会影响EB显色，其电泳相对迁移距离见表1：

表1：琼脂糖凝胶浓度与染料相对迁移距离

凝胶浓度	红色染料	黄色染料
0.8%	2000bp	~80 bp
1.0%	1500bp	~40 bp
1.5%	1000bp	~20 bp
2.0%	500bp	<10 bp
2.5%	350bp	<10 bp
3.0%	200bp	<10 bp

### ● 质量控制

经检测无外源核酸酶活性，PCR方法检测无宿主DNA和表达载体DNA残留。

### ● 模板DNA的纯度和用量

△模板DNA的纯度

很多残留的核酸提取试剂会影响PCR反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度EDTA等。这些杂质可通过乙醇或异丙醇沉淀后用66-70%乙醇洗涤两次去除，大部分商品化的核酸纯化试剂盒可有效去除这些杂质。

高纯度、高浓度的DNA作为PCR模板是最理想的。高浓度DNA可通过稀释减少干扰PCR的成分。

△模板DNA用量

极微量的样品可以作为PCR模板，但为保证反应的灵敏性，25μl体系使用10<sup>4</sup>拷贝的靶序列作为模板；可参考表2计算需加入PCR体系的模板量。

表2：1 μg 各种来源的DNA对应的拷贝数

1 μg DNA	copies
1 kb线性双链DNA	9.18 × 10 <sup>11</sup>
3 kb质粒DNA	2.9 × 10 <sup>10</sup>
Lambda (λ) DNA	1.9 × 10 <sup>10</sup>
E. coli基因组DNA	2.0 × 10 <sup>8</sup>
人类基因组DNA	3.0 × 10 <sup>5</sup>

例如：纯化的人类基因组DNA浓度为1 μg/μl，某基因在人类基因组中丰度为10，其单位体积拷贝数为：

$$3.0 \times 10^5 \text{ copy}/\mu\text{g} \times 1 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 = 3.0 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}$$

$$1 \times 10^4 \text{ copy}/(3.0 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}) = 1/300 \mu\text{l}$$

即：1/300 μl浓度为1 μg/μl的人类基因组DNA中含10<sup>4</sup>拷贝该基因，稀释300倍后加1 μl至25 μl PCR体系。

为保证反应的特异性，DNA终浓度应小于10 ng/μl。

如果加入过多的模板DNA，会增加引物的非特异性结合位点，因而减少能与特异性位点结合的引物的量，反而会降低某些位点的PCR效率。

### ● 引物与退火温度

建议使用oligo软件分析引物自身和引物之间的二级结构，排除3'末端有稳定二级结构的引物。按照软件中的nearest neighbor method计算引物的Td值作为退火温度的参考，并且选用Td值相近的引物，一般情况下使用低于Td值1-4度作为退火温度。

添加引物的量和退火温度需要进行多次实验摸索。初次进行多重PCR时，先尝试各种引物按等摩尔数(比如终浓度各0.2 μM)添加；根据预实验调整各引物的比例和退火温度。增加某对引物的量能提高相应位点的PCR效率；提高退火温度不利于引物与模板的结合，但是如果引物的二级结构稳定，提高退火温度(低于Td值)有利于打开引物的二级结构，从而增加能与模板结合的有效引物的量，从而提高PCR效率。

### ● PCR参数设置

以下参数中使用的温度适合本公司生产的2xMultiplex PCR Master Mix，不一定适合其他公司的产品。

△预变性

双链DNA模板(比如基因组DNA)使用94°C，3 min；单链DNA模板(比如cDNA和病毒DNA)使用94°C，1 min。

温度过高或者时间过长会损失Taq DNA Polymerase活性并且破坏模板DNA(断裂和脱嘌呤)。

△变性

94°C，30秒。

△退火

退火温度请参考●引物与退火温度。

退火时间30秒。

△延伸

72°C，1 min。

如果最佳退火温度高于60°C，可以合并退火和延伸步骤，使用最佳退火温度，并且时间为1 min。

一般情况下为了提高多重PCR的敏感性，各位点的产物小于500 bp，延伸时间使用1 min；如果预期PCR产物大于500 bp，可以按照2 min/1000 bp计算延伸时间。

△循环数

一般使用25~35个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。使用过多的循环数可能会因为大量引物被消耗而出现涂抹带。

### ● 使用方法

1. PCR成分准备

将2×Multiplex PCR Master Mix、模板DNA和引物室温解冻，置于冰上。PCR成分解冻后需混合均匀。

2. PCR反应液配制(以50 μl PCR体系为例)

在冰上将以下各成分加入PCR反应管：

模板DNA	*
Primers ………	&
2×Taq PCR Master Mix	25 μl
diH <sub>2</sub> O	补充至50 μl

\* 请参考●模板DNA的纯度和用量。

& 请参考●引物与退火温度。

注意：尽可能使用合适精确度的加样器，并且避免加

样体积小于1 μl(可按适当比例稀释后加样)。

3. 手指轻弹PCR反应管充分混匀，简短离心。

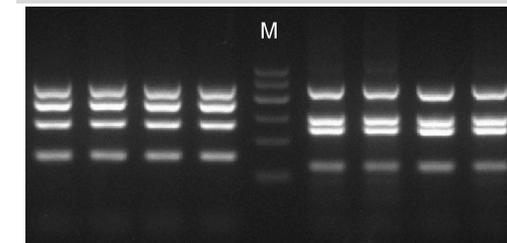
4. PCR反应循环设置举例

94°C	3 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
55°C※	30 sec	
72°C	1 min §	
72°C	5 min	
4°C	soak	

※以实际最佳退火温度为准。

§以2 min/1000 bp计算。

### ● 实验示例



使用2xMultiplex PCR Master Mix，以人类基因组DNA为模板，用两套引物分别扩增4个位点。

M: Marker l(600, 500, 400, 300, 200, 100bp)  
2.5% agarose。