

TaKaRa Code: DRR060A

Multiplex PCR Assay Kit (100 次量)

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保 存	1
●操作注意	1
●Multiplex PCR 用 Primer 的设计方法	1
●操作方法	2
●实验例	3
●最适反应参数设定	4
●Troubleshooting	4

● 制品说明

Multiplex PCR 是在同一个 PCR 反应体系中,使用多对引物,对多个基因同时进行扩增的方法。Multiplex PCR 具有节约试剂及器材的经济性,以及同时检出多个基因所带来的迅速性等优点,特别适用于贵重样品的检测。进行 Multiplex PCR 反应时,为了使各个目的片段在同一个 PCR 反应体系中都能得到很好的扩增,必须对所使用的引物及反应条件进行各种条件摸索,这个繁杂的研讨过程是不可缺少的。

使用本制品不需要进行繁杂的 PCR 反应条件的研讨过程,只需进行简单的条件摸索就可以进行 Multiplex PCR 反应。制品中含有能减少 PCR 反应初期引物错配的 Hot Start 酶以及能提高反应特异性的特有的辅助蛋白,并配制成了最合适的反应 Mixture。

本制品不仅能进行 Multiplex PCR 反应,而且在 Extra band 及 Smear 大量出现时,以及引物特异性差的 Single PCR 反应时也可使用,能减少 Extra band 及 Smear 的量,提高目的片段的扩增特异性。

● 制品内容 (50 μ l 反应 \times 100 次)

Multiplex PCR Mix 1	25 μ l
Multiplex PCR Mix 2*	1.25 ml \times 2 支

* Mg²⁺的终浓度是 2 mM, 内含 Buffer、dNTP Mixture 等。

● 保 存: -20℃。

● 操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项,使用前请一定认真阅读。

- (1) 进行PCR反应液的配制时,配制成Master Mix (Multiplex PCR Mix 1、Multiplex PCR Mix 2、灭菌水等混合液)后使用比较方便。制品配制成Master Mix的形式后,可以减少试剂分注、搅拌次数,并能保证正确的试剂分注,有效降低实验结果间的误差。
- (2) Multiplex PCR Mix 1、Multiplex PCR Mix 2 在混匀时要缓慢进行,避免产生气泡。不要Vortex混匀。在移液操作前,要将试剂轻轻离心至Microtube底部。Multiplex PCR Mix 1 因为含有50%的甘油,粘度很高,在取液时一定要缓慢操作。
- (3) Multiplex PCR Mix 1、Multiplex PCR Mix 2使用前于-20℃保存,使用后也要立即置于-20℃保存。
- (4) 反应液的配制、分装请一定使用新的(无污染的)枪头、Microtube等,尽量避免污染。
- (5) 本说明书中的PCR反应条件是使用TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice时的条件。在使用其它基因扩增仪器时,最适PCR条件可能会发生变化。

● Multiplex PCR 用 Primer 的设计方法

- (1) 尽量减小各引物间的Tm值差。
- (2) 目的片段在1,000 bp以下。
- (3) Primer的长度保持在20~25 mer, GC含量在50~60%,避免局部区域GC或AT Rich。
- (4) 要预先逐一各个基因进行反应,确认非特异性扩增的有无及其反应性能。

●操作方法

A. Multiplex PCR

① 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量
Multiplex PCR Mix 2	25 μ l
Primer Mix*	适量
Multiplex PCR Mix 1	0.25 μ l
DNA 模板	适量
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	Up to 50 μ l

* 通常各引物使用的终浓度为 0.2 μ M。不同的反应有时改变使用量会对结果有一定改善。

② 按照以下条件进行反应。

94°C	60 sec	} 30~40 Cycles
94°C	30 sec	
57 ~ 60°C	90 sec	
72°C	90 sec*	
72°C	10 min	

* 此条件为扩增片段在 1 kbp 以下的反应条件。超过 1 kbp 时，按照 1 kbp/2 min 的标准进行设定。

③ 反应结束后，取 PCR 反应液（5~10 μ l）进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。如果此 PCR 产物需要用于后续实验，请于-20°C 冷冻保存。1 kbp 以内的 Multiplex PCR 扩增产物，使用 4% Agarose gel 进行电泳，可很好地分离各个扩增片段。

B. 要提高PCR反应特异性（使用一对引物时）

① 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量
Multiplex PCR Mix 2	25 μ l
Primer 1 (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer 2 (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Multiplex PCR Mix 1	0.25 μ l
DNA 模板	适量
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	Up to 50 μ l

② 按照以下条件进行反应。

94°C	30 sec	} 30 ~ 40 Cycles
94°C	30 sec	
55~60°C	10~15 sec*1	
72°C	X sec*2	
Or		
94°C	30 sec	} 30 ~ 40 Cycles
65°C	X sec*2	

*1: 缩短退火时间。

*2: 扩增 1 kbp 以下片段时设定为 1 min。超过 1 kbp 的片段扩增时，按照 1 kbp/2 min 的标准进行设定。

③ 反应结束后，取部分反应液进行琼脂糖凝胶电泳等分析。

●实验例

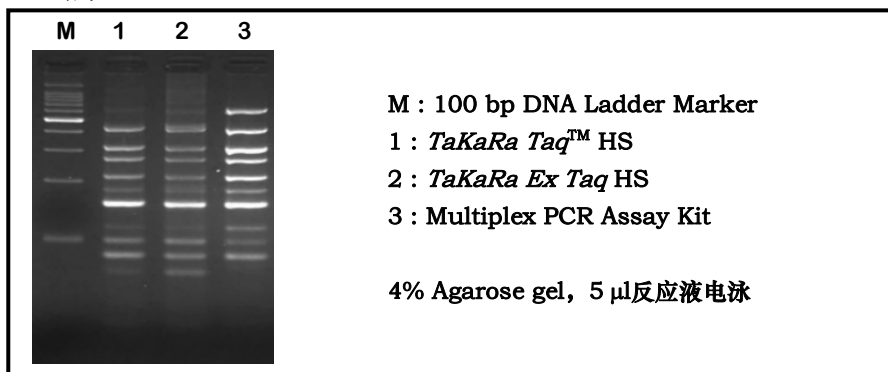
(1) Multiplex PCR反应例

以人基因组DNA为模板，使用10对引物（扩增片段大小分别为：84 bp、100 bp、116 bp、153 bp、183 bp、237 bp、273 bp、319 bp、432 bp、650 bp）进行Multiplex PCR扩增。在50 μl反应体系中，添加50 ng人基因组DNA，各引物的终浓度为0.2 μM。

<反应条件>

94°C	60 sec	} 30 Cycles
94°C	30 sec	
57°C	90 sec	
72°C	90 sec	
72°C	10 min	

<结果>



(2) 减少非特异性反应的实验例（使用一对引物时）

使用反应特异性低的引物（扩增片段为250 bp），在3 Step及2 Step的反应条件下进行扩增。

50 μl反应体系中，添加了50 ng人基因组DNA，各引物终浓度为0.1 μM。

<反应条件>

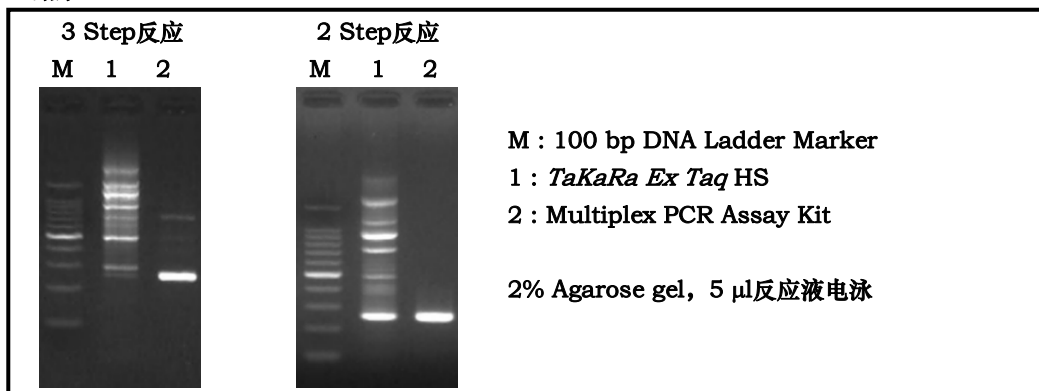
3 Step PCR 的反应条件

94°C	30 sec	} 35 Cycles
94°C	30 sec	
55°C	10 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	

2 Step PCR的反应条件

94°C	30 sec	} 35 Cycles
94°C	30 sec	
65°C	60 sec	
72°C	5 min	

<结果>



●最适反应参数设定

<Multiplex PCR反应>

- (1) 退火温度间隔1℃，梯度研讨最适反应温度。
- (2) 退火时间设定为90秒。
- (3) 1,000 bp以内的Multiplex PCR反应，延伸时间设定为90秒。更长片段的扩增按照1 kbp/2 min的标准进行设定。

<提高PCR反应特异性> (使用一对引物时)

- (1) 退火温度间隔1℃，梯度研讨最适反应温度。
- (2) 3 Step PCR反应时，退火时间尽可能缩短 (退火时间长，易产生非特异性扩增)。

●Troubleshooting

1. 扩增产物少或没有扩增。

- (1) 降低退火温度 (间隔1℃，梯度研讨最适反应温度)。
- (2) 增加模板量。
- (3) 增加PCR反应循环圈数。
- (4) 增加引物使用量。
- (5) 确认DNA模板的纯度 (必要时重新进行纯化)。

2. 有非特异性片段产生。

- (1) 提高退火温度 (间隔1℃，梯度研讨最适反应温度)。
- (2) 减少模板量。
- (3) 减少循环圈数。
- (4) 减少引物使用量。
- (5) 以cDNA作为模板时，确认是否有假基因扩增 (需重新设计引物)。
- (6) 在PCR循环反应结束后，增加一步72℃，10 min的反应。

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂