

公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！

商品属性：

产品名称	规格	货号
2×RAPA3G Multiplex PCR Mix	1ml	P-PR1272
2×RAPA3G Multiplex PCR Mix	10ml	P-PR1272

描述： Multiplex PCR 又称多重 PCR，是在同一 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）

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：

2×RAPA3G Multiplex PCR Mix 12.5 μl

10×Primer Mix 2.5 μl

*模板 DNA 0.1~100 ng

ddH₂O up to 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

30-35Cycles

95°C 20s

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 5×Q-Solution
- (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 0.2-0.3μM，扩增片段>300bp 每条引物的反应终浓度为 0.05-0.15μM，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 10×Primer Mix：

引物储存液 用量 10x 浓度

引物 1 F (100 μ M) 1 μ l 1 μ M

引物 1 R (100 μ M) 1 μ l 1 μ M

引物 2 F (100 μ M) 0.5 μ l 0.5 μ M

引物 2 R (100 μ M) 0.5 μ l 0.5 μ M

.....

引物 n F (100 μ M) 3 μ l 3 μ M

引物 n R (100 μ M) 3 μ l 3 μ M

ddH₂O Upto 100 μ l

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。