

Code No. RR062A

研究用

Takara

Multiplex PCR Assay Kit Ver.2

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 使用注意	1
● Multiplex PCR 用 Primer 的设计方法	1
● 操作方法	1
● 实验例	3
● 参数优化	4
● Troubleshooting	5
● 关联产品	5

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，特别适用于珍贵样品的检测。

本制品是由能快速进行 Priming 的酶与能很好提高引物退火特异性的反应液配套组成的 Multiplex PCR 用试剂盒。同以往 Multiplex PCR Enzyme 相比，可在短时间内特异性地进行无偏差的 PCR 扩增。另外，调整酶量和反应时间也可对大约 200 对引物进行 Multiplex PCR。使用本制品不仅能进行 Multiplex PCR，而且在 Extra band 及 Smear 大量出现时，以及难以获得目的扩增片段的 Single PCR 反应时也可使用，能减少 Extra band 及 Smear 的量，可在短时间内特异性扩增目的片段。

● 制品内容 (50 μ l 反应 \times 100 次)

2 \times Multiplex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus) *	1.25 ml \times 2
Multiplex PCR Enzyme Mix	25 μ l

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

● 保 存： -20 $^{\circ}$ C

● 使用注意

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 (2 \times Multiplex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus)、Multiplex PCR Enzyme Mix、灭菌水等混合液)，即配制成数份 (~10 份) 使用量比较方便。制品配制成 Master mix 的形式后，可以减少试剂分注、混匀次数，并能保证准确的试剂分注，有效降低实验结果间的误差。
- (2) 2 \times Multiplex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus)、Multiplex PCR Enzyme Mix 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 Enzyme Mix 因为含有 50% 的甘油，粘度很高，在取液时一定要缓慢操作。
- (3) 2 \times Multiplex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus)、Multiplex PCR Enzyme Mix 使用前于 -20 $^{\circ}$ C 保存，使用后也要立即置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。
- (4) 反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头，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，适宜 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 2,000 bp 以下。
- (3) Primer 的长度保持在 22~30 mer，GC 含量在 50~60%，避免局部区域 GC 或 AT Rich。
- (4) 要预先逐一对各个目的基因进行反应，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 在 0.2 ml tube 中按下列组份配制 PCR 反应液。

试剂	使用量
2 \times Multiplex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	25 μ l
Primer Mix* ¹	适量
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.25 μ l
DNA 模板	适量
dH ₂ O (灭菌水)	up to 50 μ l

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

引物的 T_m 值设定在 55°C 以上

(T_m 值按照下面的公式进行计算)

$$T_m \text{ 值} = 4 \times (\text{G、C 数}) + 2 \times (\text{A、T 数}) + 35 - 2 \times (\text{总碱基数})$$

注) 利用 Nearest Neighbor 法计算 T_m 值时，引物的 T_m 值设置在 60°C 以上。

② 放入 Thermal Cycler 后，按照以下条件进行反应。

【引物数在 10 对以下、扩增片段为 ~2 kb 的反应条件】

94°C	60 sec.	} 25~40 Cycles
94°C	30 sec.	
57~60°C	30~60 sec.	
72°C	30~60 sec.	
72°C	10 min.	

【引物数超过 10 对时的反应条件】

94°C	60 sec.	} 15~30 Cycles
94°C	30 sec.	
60°C	1~10 min.*2	
72°C	10 min.	

*2 延伸时间根据引物数和反应性能不同而不同。使用的引物数为 200 对时，以 4 min 为标准进行设定。

③ 反应结束后，取部分 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。1 kb 以内的 Multiplex PCR 扩增产物，使用 3%~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 在 0.2 ml tube 中按下列组份配制 PCR 反应液。

试剂	使用量
2× Multiplex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	25 μl
Primer 1 (20 pmol/μl)	0.5 μl
Primer 2 (20 pmol/μl)	0.5 μl
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.25 μl
DNA 模板	适量
dH ₂ O (灭菌水)	up to 50 μl

② 放入 Thermal Cycler 后，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.*	
72°C	30 sec./kb	} 30~40 Cycles
Or		
94°C	30 sec.	} 30~40 Cycles
65°C	30 sec./kb	

*: 缩短退火时间。

③ 反应结束后，取部分 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。

● 实验例

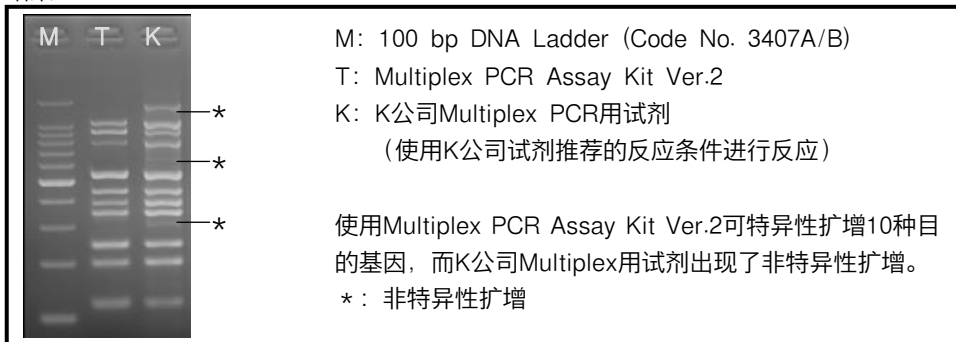
(1) Multiplex PCR 反应例-1

以人基因组 DNA 为模板，使用 10 对引物（扩增片段大小分别为：122 bp、201 bp、247 bp、353 bp、395 bp、449 bp、548 bp、801 bp、955 bp、1,068 bp）进行 Multiplex PCR 扩增。在 50 μ l 反应体系中，添加 50 ng 人基因组 DNA，各引物的终浓度为 0.2 μ M。

<反应条件>

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

<结果>



(2) Multiplex PCR 反应例-2

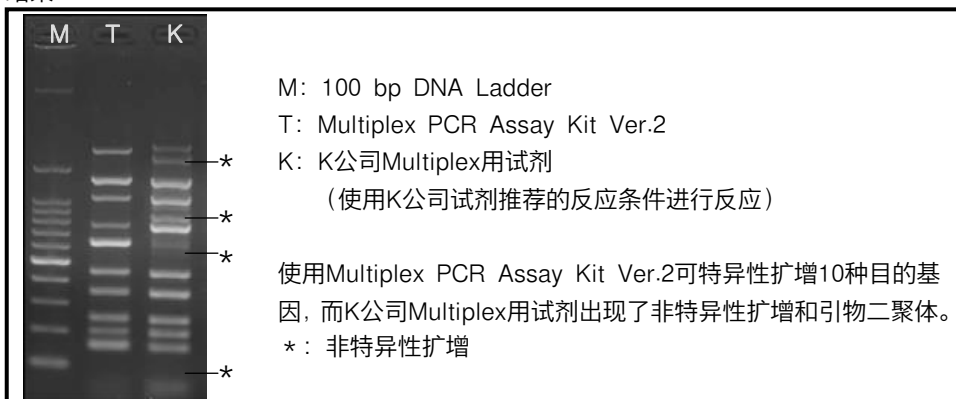
以 GC Rich 的人基因组 DNA 为模板，使用 10 对引物（扩增片段大小：155 bp*、201 bp、247 bp、353 bp、449 bp、604 bp*、780 bp、1,068 bp、1,321 bp、1,967 bp*）进行 Multiplex PCR 扩增。在 50 μ l 反应体系中，添加 50 ng 人基因组 DNA，各引物的终浓度为 0.2 μ M。

*：GC 含量 65% 以上的目的基因

<反应条件>

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

<结果>



(3) Multiplex PCR反应例-3

利用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies Code No. 4475346) (207 primer pairs) 以20 ng人基因组DNA为模板, 使用Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 进行Multiplex PCR扩增。

此时, Multiplex PCR Enzyme Mix的使用量为通常为1.5倍 (0.15 μ l/20 μ l reaction)。

使用L公司推荐的反应条件进行PCR反应

<反应条件>

94°C 60 sec.

94°C 30 sec.

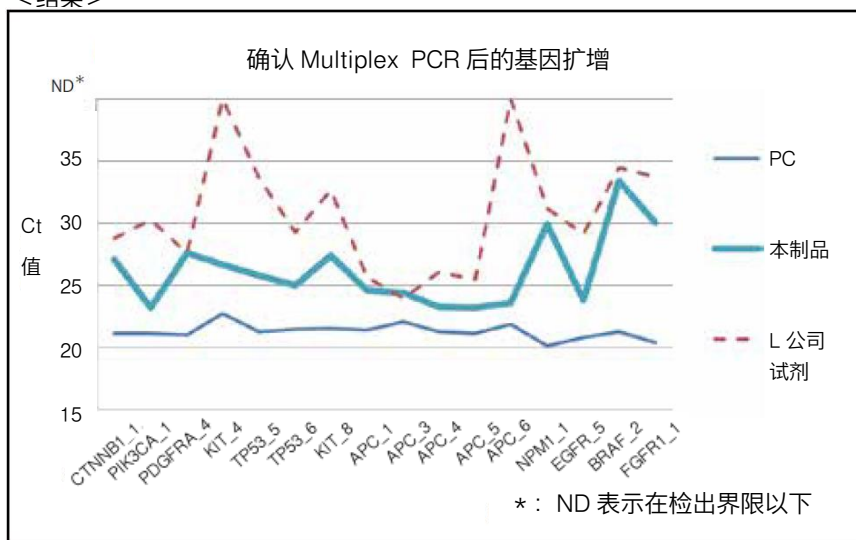
60°C 4 min.

72°C 10 min.

17 Cycles

Multiplex PCR反应后, 以本制品、L公司的任意16种基因扩增产物作为模板进行Real Time PCR反应, 其定量结果与以人基因组DNA为模板的阳性对照 (PC) 的定量结果进行比较。

<结果>



使用 Multiplex PCR Assay Kit Ver.2的扩增产物进行定量反应, 所有的16种目的基因均得到扩增。同L公司 Multiplex 试剂的扩增产物定量结果相比较, 可以确认到本制品有较低的扩增偏好性。

● 参数优化

<Multiplex PCR 反应>

- 退火温度间隔 1°C, 梯度研讨最适反应温度。
- 退火时间基本上设定为 30 秒, 但反应时间因仪器种类不同会有所不同。使用高速 PCR 仪时, 退火时间设定为 60 秒可改善扩增结果。
- 引物数在 10 对以下进行 Multiplex PCR 时, 延伸时间基本上设定为 30 sec./kb, 但反应时间因仪器种类不同会产生时间差; 使用高速 PCR 仪时, 延伸时间设定为 60 sec./kb 可改善扩增结果。
- 引物数在 10 对以上进行 Multiplex PCR 时, 增加酶 (Multiplex PCR Enzyme Mix) 的添加量可改善扩增结果。

<提高 PCR 反应特异性> (使用一对引物时)

- 退火温度间隔 1°C, 梯度研讨最适反应温度。
- 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°C, 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 (必要时重新调制)。
2. 有非特异性片段产生。
 - (1) 提高退火温度 (间隔 1°C, 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 pseudogene (假基因) 扩增 (必要时重新设计引物)。
 - (6) 在 PCR 循环反应结束后, 增加一步 72°C, 10 min 的反应。

● 关联产品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Gradient* (Code No. TP600)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (Code No. NJ200)
100 bp DNA Ladder (Code No. 3407A/B)

Thermal Cycler Dice is a trademark of TAKARA BIO INC.

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品, 或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术(北京)有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201702Da