

Taq Pro Multiplex DNA Polymerase (High sensitivity)

PM201

Version 21.2



产品概述

Taq Pro Multiplex DNA Polymerase是基于抗体法修饰，经过升级改造提升模板亲和能力的新一代热启动DNA聚合酶，High sensitivity版本经过适用于多重PCR的精心优化，具有强劲的扩增能力和极高的检测灵敏度。搭配针对多重PCR层层筛选的最佳缓冲体系，可兼容极其宽泛的产物GC含量和引物Tm值，无需额外优化，即可在60°C通用退火温度下完成绝大多数多重PCR检测。

本产品**扩增效率极高**，可同时扩增50 - 3,500 bp范围内的目的片段；**扩增能力强**，可进行几百重及以上扩增子的富集；**杂质耐受能力超凡**，高度耐受多种抑制剂和杂质类型，并可兼容全血、血卡等直扩。试剂稳定性好、适用性广泛，可兼容多种检测场景。

产品组分

组 分	PM201-01 (200 rxns/25 µl/rxn)	PM201-02 (1,000 rxns/25 µl/rxn)
2 × Multiplex Buffer (High sensitivity)	2 × 1,250 µl	12.50 ml
Multiplex DNA Polymerase (High sensitivity) (10 U/µl)	200 µl	1 ml

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

适用范围

以DNA为模板的多重PCR扩增；病原体的检测和分型；分子杂交检测等。

注意事项

- 引物设计对于多重PCR扩增的成功与否至关重要。一方面，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。另一方面，设计好的引物对应逐一通过PCR验证，然后才能选择效果较好的引物对用于多重PCR扩增。推荐使用高质量引物。
- 推荐目标片段不超过3,500 bp。
- 推荐每条引物反应终浓度为0.2 µM。新合成的引物使用前，应先对其真实浓度进行校准。如某些目标片段产量偏低，可适度提高其对应引物使用量以提高扩增产量。
- 扩增效率低的情况下，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：

- 引物长度21 - 30 bp，GC含量40% - 60%，退火温度68°C以上。
- 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。
- 引物设计时请尽量避免T/C或者A/G的连续结构。
- 引物3'端最后五个碱基不能包含2个以上的G或者C。

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	12.5 µl
Multiplex DNA Polymerase (10 U/µl) ^b	1 µl
5 × Primer Mix ^c	5 µl
Template DNA ^d	x µl
ddH ₂ O	Up to 25 µl

- 包含dNTP Mix、Mg²⁺等。
- 当出现非特异性扩增时，可通过降低酶量进行优化。一般来说，酶量越高，扩增能力越强，特异性越差。
- 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。
- 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 ^a
退火	60°C ^a	90 sec ^c	
延伸	72°C	60 sec/kb ^d	
彻底延伸	72°C	10 min	1

- 多数情况下，使用默认退火温度即可。如扩增效果不佳，可通过退火温度梯度实验来摸索最适退火温度。
- 预变性时间可根据不同模板类型进行调整。提取的核酸，预变性时间为30 sec；全血、血卡等直扩时，可适当将预变性时间延长至5 min。
- 扩增低拷贝模板、长片段或者扩增片段较多时，可适当延长退火时间至3 min以提高扩增效率。
- 延伸时间以最长片段为准。然而，延伸时间太长会导致非特异性扩增增多，可通过缩短延伸时间来提高扩增特异性。
- 微量样本扩增时，可通过增加循环数来提高扩增产物量。但是，循环数过高会导致非特异性扩增增多。

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	30 sec ^a	
延伸	72°C	30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	1

- 快速程序会损失部分扩增产量，初次扩增建议采用标准程序。

常见问题与解决方案

◇ 扩增产物少或没有扩增

- 血液、血卡、拭子等直扩类实验时，确认PCR程序预变性条件为95°C/5 min，以充分释放模板。
- 使用高质量的引物。检查引物是否降解，确认引物终浓度为0.2 μM。
- 增加PCR循环数。
- 降低退火温度(间隔1~3°C)，必要时进行退火温度梯度测试。确认退火时间为90 sec，必要时可延长退火时间至3 min。
- 检查单对引物的扩增性能和特异性。
- 使用高质量的模板。确认DNA模板纯度、浓度；增加模板使用量。
- 产物过长，重新设计引物。
- 延长循环内的延伸时间；延长彻底延伸时间。
- 提高低产或缺失扩增子引物使用量。

◇ 存在非特异性扩增

- 减少循环数。
- 提高退火温度。
- 减少引物使用量。
- 重新设计引物。
- 降低酶量。

◇ 电泳时条带模糊

- 减少循环数(每次减少3个循环)。
- 减少起始模板量。
- 延长彻底延伸步骤时间至15 - 30 min。
- 降低电泳电压，更换新的电泳缓冲液。

*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。