



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室

AllStart[®] Multiplex PCR Kit

PM303



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品特点	1
产品组成	1
产品应用	1
储存条件	1
实验方案	2
实验案例	3
注意事项	3
常见问题及解答	4

产品简介

本产品 AllStart® Multiplex PCR Kit 包含多重 PCR 专用适配体修饰的热启动聚合酶 Multiplex DNA Polymerase 及多重促进因子，再配以针对该反应混合有 dNTP，Mg²⁺等深度优化的缓冲体系 2 × Multiplex Buffer，能够在默认条件下完成绝大多数多重 PCR 检测，且适应性广泛，可同时加入多对引物，同时对多个基因目的片段进行扩增检测，减少移液操作，节约试剂器材及时间成本，最大程度上减少了反应体系优化步骤，提供更高的扩增特异性、灵敏度和多重兼容的特性。

产品特点

特异性好 兼容性强 产量高

产品组成

组 分	PM303 (200 rxns)
AllStart Multiplex Enzyme Mix	200 μl
2 × AllStart Multiplex Buffer	5 ml
5 × Multiplex PCR Enhancer	2 ml

产品应用

DNA 模板多重扩增

储存条件

-20°C 保存，于-20~0°C运输，有效期一年。

实验方案

1. 制备 10 × Primer Mix:

预先混合所有扩增引物，得到每条引物终浓度为 0.1 μM。

2. 反应体系配制:

组分	用量
ddH ₂ O	to 50 μl
2 × AllStart Multiplex Buffer	25 μl
模板 DNA *	optional
10 × Primer Mix	5 μl
AllStart Multiplex Enzyme Mix	1 μl
5 × Multiplex PCR Enhancer	optional

*不同模板最佳反应浓度有所不同，下表为 50 μl 反应体系推荐模板使用量:

模板类型	使用量
人基因组 DNA	100 ng
cDNA	1 ~ 5 μl
质粒 DNA	100 pg

3. PCR 反应条件设置:

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	95°C	30 sec ~ 5 min ^a	Stage 1	Reps: 1
变性	95°C	10 ~ 30 sec		
退火	57°C ^b	30 ~ 90 sec ^c	Stage 2	Reps: 30 ~ 35
延伸	72°C	30 sec/kb		
彻底延伸	72°C	7 min	Stage 3	Reps: 1

a. 预变性时间至少需要 30 sec。如扩增不理想，可适当延长 95°C 预变性时间，最长可至 7 min。

b. 退火温度需要根据引物退火温度调整，一般设置成低于引物退火温度 1 ~ 2°C 即可或采用最低退火温度。

c. 扩增低拷贝模板、长片段或者扩增片段较多，可延长退火时间至 3 min 以提高扩增效率。

实验案例

使用不同量的 λ DNA 进行 10 重 PCR，混液搭配每种 0.2 μ M 的引物使用。循环条件：95°C 30 sec；95°C 10 sec、58°C 30 sec 和 72°C 30 sec；72°C 5 min，循环数 35，Marker (M)为 1kb DNA Marker (ATG #DM103)。如 Fig. 1 可发现 ATG #PM303 扩增特异性极高，低初始含量的模板也能良好扩增。

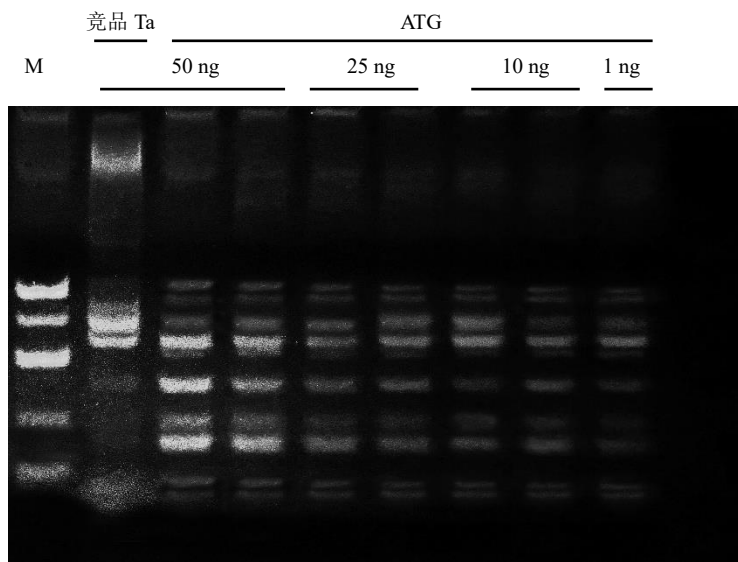


Fig. 1 扩增不同含量模板及多种片段结果

注意事项

1. 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；
2. 推荐目标片段不超过 1500 bp；
3. 预先单独检测每对引物的扩增情况，尽可能挑选扩增特异性好的引物对进行组合；
4. 推荐每条引物反应终浓度为 0.1 μ M。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。

常见问题及解答

1. 扩增产物少或没有扩增

- (1) 确认 PCR 程序预变性条件为 95°C 5 min，以充分释放 Multiplex DNA Polymerase 活性；
- (2) 使用高质量的引物，检查引物是否降解，确认引物浓度为 0.1 μ M；
- (3) 增加 PCR 循环数；
- (4) 降低退火温度 (间隔 1 ~ 3°C)，必要时进行退火温度梯度尝试。确认退火时间为 90 sec，必要时可延长退火时间至 3 min；
- (5) 检查单对引物的扩增性能和特异性；
- (6) 扩增子高 GC 或含有复杂二级结构时，推荐尝试 Multiplex PCR Enhancer，添加终浓度为 0.5 ~ 1.0 \times ；
- (7) 使用高质量的模板；确认 DNA 模板纯度、浓度；增加模板使用量；
- (8) 产物过长，重新设计引物；
- (9) 延长循环内延伸时间、延长彻底延伸时间；
- (10) 提高低产或缺失扩增子引物使用量。

2. 存在非特异性扩增

- (1) 减少循环数；
- (2) 提高退火温度；
- (3) 减少引物使用量；
- (4) 重新设计引物；
- (5) 扩增子高 GC 或含有复杂二级结构时，推荐尝试 Multiplex PCR Enhancer，添加终浓度为 0.5 ~ 1.0 \times 。

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) 降低电泳电压，更换新的电泳缓冲液。