



TFP Multiplex PCR Mix

Cat. No. CW3351

产品简介

TFP Multiplex PCR Mix适用于多重PCR实验，预混液浓度为2×，包含DNA聚合酶、PCR Buffer、dNTPs、Mg²⁺以及稳定剂和增强剂等成分，操作简便快速。

TFP Multiplex PCR Mix包含的DNA聚合酶是一种经基因工程改造的重组酶，具有5'→3'DNA聚合酶活性，无5'→3'外切酶活性；DNA聚合酶是经过新型抗体修饰的热启动酶，具有高效扩增效率，同时能够有效减少非特异性扩增（常温条件下由引物和模板或引物二聚体非特异性结合而产生），同时具有激活时间短、扩增能力强、灵敏度高、稳定性好等优良特点。独特的PCR缓冲体系与热启动酶的组合，显著提高了PCR的扩增效率，灵敏度更高，抑制物耐受性更强。

TFP Multiplex PCR Mix应用范围广，适用于多重PCR实验，如扩增子建库、微卫星分析、基因分型以及SNP检测等。

保存条件： -30~-15℃

运输条件： 2~8℃

产品内容

Component	CW3351S 1mL	CW3351M 5mL
2×TFP Multiplex PCR Mix	1mL	5×1mL
RNase-Free Water	1mL	5×1mL

使用说明

以下举例为常规qPCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据具体用途、模板、引物结构、目的片段大小和扩增效果不同进行相应的改进和优化。

1. PCR反应体系

试剂	20 μ L体系	50 μ L体系
2 \times TFP Multiplex PCR Mix	10 μ L	25 μ L
Primer Mix ¹⁾	X μ L	X μ L
Template DNA ²⁾	X μ L	X μ L
RNase-Free Water	Up to 20 μ L	Up to 50 μ L

注意：

- 1) 推荐反应体系中每条引物终浓度为0.2 μ M,可在0.1–0.3 μ M之间调整。引物设计时，应尽量减小各引物的T_m间的差值，差值尽量控制在5 $^{\circ}$ C以内。扩增效率不高的情况下，可提高引物浓度；发生非特异性扩增时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。为达到最优扩增效果，建议引物混合物使用前涡旋震荡10s短暂离心后使用。
- 2) DNA投入量建议在1ng–500ng之间，投入量过低可能会导致目的片段无检出，投入量过高可能抑制部分引物扩增，同时操作过程中应避免DNA污染，推荐实验时设置一组阴性对照（无DNA）。

2. PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
热盖	105 $^{\circ}$ C	On	
预变性	95 $^{\circ}$ C	3–10min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	10s	} 28–35cycles ²⁾
退火	60 $^{\circ}$ C ¹⁾	30s–4min ³⁾	
延伸	72 $^{\circ}$ C	1kb/min	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5min	1
保温	4 $^{\circ}$ C	Hold	

注意：

- 1) 一般实验中退火温度比扩增引物的溶解温度T_m低5 $^{\circ}$ C，无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度，由此优化反应条件。
- 2) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。如果循环次数太少，扩增量不足；如果循环次数太多，错配机率会增加，非特异性背景严重。所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数；当扩增低浓度模板时，可通过增加循环数提高扩增量。
- 3) 根据扩增体系中引物重数调整退火时间，引物重数较多时可适当延长退火时间。
- 4) PCR产物极易产生气溶胶污染，进而导致实验结果不准确、可信度不高等问题。建议将PCR反应体系配制区和PCR反应区进行物理隔离，使用专用的移液器等设备，并定时对各实验区域进行清洁（推荐使用CW3141 RNA酶和DNA清除剂），以保证实验结果的可信度。

相关产品

Cat. No.	产品名称
CWY129	磁珠法血液DNA提取试剂盒
CW2298	通用型柱式基因组DNA提取试剂盒
CWY036	一次性使用游离DNA保存管（玻璃，10mL）
CWY041	一次性使用粪便采集保存管
CW3171	DNA Purification Magbeads (for NGS Size Selection)
CW3141	RNase and DNA Remover

常见问题与解决方案

1. 扩增产量偏低

- (1) 提高循环数;
- (2) 降低退火温度;
- (3) DNA模板进行绝对定量后, 重新进行模板稀释;
- (4) 当引物重数较多时, 可适当延长退火时间, PCR退火时间参考下表:

单管引物重数	退火时间
3-10	30s~1min
10-30	2min
30-800	4min
800重以上	8min

- (5) PCR产物纯化时, 磁珠干燥时间不能过长, 磁珠过于干燥可能会导致产物难以洗脱。

2. 存在非特异扩增

- (1) 提高退火温度;
- (2) 减少循环数;
- (3) 降低引物投入量;
- (4) 降低退火、延伸时间;
- (5) 引物进行重新设计。

3. 部分引物无扩增或扩增效率低

- (1) 提高相应引物浓度;
- (2) 排除DNA模板是否存在降解, 可将DNA模板进行绝对定量后, 重新稀释使用;
- (3) 可能引物间Tm值相差较大, 或扩增目的片段间GC含量相差较大, 可重新设计引物后进行扩增检测。

4. 文库检测均一性较差

- (1) 较短扩增子 (≤ 100 bp) 产量偏低: 可提高PCR产物纯化过程中磁珠投入量;
- (2) 较长扩增子 (≥ 500 bp) 产量偏低: 排除DNA模板是否存在降解, 可将DNA模板进行绝对定量后, 重新稀释使用; 或者延长反应程序中延伸时间;
- (3) 目的片段GC含量 (65%~75%) 高的扩增子产量偏低: 可延长预变性时间至5-10min, 变性时间至30s, 延长退火时间; 或在反应体系中加入3%-6%DMSO以促进高GC目的片段的扩增;
- (4) 目的片段AT含量 (65%~75%) 高的扩增子产量偏低: 可降低退火温度或延长退火时间。