

Hieff NGS® Multiplex Long PCR Master Mix

产品简介

Hieff NGS® Multiplex Long PCR Master Mix 是即用型 2×预混溶液，包含 High-Fidelity DNA Polymerase，dNTP 以及针对 20 Kb 以内的片段扩增而精心优化的缓冲体系，延伸速度为 10 sec/kb。其保真性是 Taq DNA 聚合酶的 83 倍，是普通 Pfu DNA 聚合酶的 9 倍，适用于复杂模板扩增，扩增产物为平末端。

Hieff NGS® Multiplex Long PCR Master Mix 具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点。可扩增 GC 含量在 30%~70%的片段。可以扩增未经核酸提取的全血样本，适用于 EDTA、柠檬酸盐或肝素保存的血液，以及干血斑卡片，更加快速灵活。此外，本品中还含有特异保护剂，使得预混液反复冻融后仍可维持稳定活性。本产品中提供的所有试剂组分均经过严格质检，最高程度保障产品优异性能与批次间稳定性。本试剂适用于不同多重 PCR 需求，可用于凝胶电泳鉴定 20 对以内不同大小片段的多重产物，也可用于进行数百重及以上扩增子的富集。

产品信息

货号	17228ES08	17228ES24	17228ES96	17228ES97
规格	8 T	24 T	96 T	1000 T

组分信息

产品编号	组分名称	17228ES08	17228ES24	17228ES96	17228ES97
		8 T	24 T	96 T	1000 T
17228	2×Multiplex Long PCR Master Mix	200 µL	600 µL	2×1200 µL	25 mL

储存条件

-15~-25℃保存，有效期 1 年。

注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作
2. 本产品仅用作科研用途！

参考反应体系

1. PCR 扩增反应体系

冰上配制表 1 中的 PCR 扩增反应液。配制完成后充分混匀离心。若模板为粗提样本，建议添加体积不超过反应体系的 5%。

表 1. PCR 扩增反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
模板 DNA	1 ng -200 ng	-
正向引物(10 μM)*	x	
2×Multiplex Long PCR Master Mix	25	0.1 μM-0.5 μM
反向引物(10 μM)*	x	
无菌超纯水	up to 50	-

【注】: 1) *PCR 反应体系中引物终浓度范围 0.4~1 μM, 引物终浓度过低, 会影响扩增效果, 若扩增效果不理想, 可适当提高引物添加量, 提升检出率。

2. PCR 扩增反应程序

表 2. PCR 扩增反应程序

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
热盖	105°C	On	-
预变性	98°C	30 sec	1
变性	98°C	10 sec	30-35 (根据实验要求)
退火	60°C*	5 sec	
退火延伸	68°C~72°C**	5~10 sec/Kb	
终延伸	72°C	2 min	1
暂存	4°C	-	-

【注】: *退火温度推荐使用 60°C, 也可根据需要, 设立温度梯度去摸索引物退火的最适温度。推荐退火时间为 5 sec, 可以在 5-20 sec 内调节。退火时间太长可能导致扩增产物在胶上呈弥散状。

**延伸温度和时间: 10K 以上长片段或高 GC 片段扩增, 推荐使用 68°C, 当扩增效果不理想时, 延伸速率根据实际结果可在 5 sec/Kb~10 sec/Kb 之间进行调整, 扩增片段<10Kb 时, 延伸时间可选 5 sec/kb, 当扩增片段≥10Kb 时, 延伸速率可选 10 sec/Kb。

3. 扩增产物 0.9×纯化

- 1) 准备工作: 将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出, 室温平衡至少 30 min, 配制 80%乙醇。
- 2) 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- 3) 吸取 27 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.9×, Beads:DNA=0.9:1) 至一轮 PCR 产物中, 室温孵育 5 min。
- 4) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移除上清。
- 5) 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec 后, 小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5, 总计漂洗两次。
- 7) 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5min)。
- 8) 直接加入 11 μL ddH₂O, 将 PCR 管从磁力架中取出, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。进入下一步反应。