

4×Hieff® Multiplex PCR Master Mix For Pathogen

4×病原多重 PCR 预混液

产品信息

产品名称	产品编号	规格
	13592ES24	180 μL
4×Hieff® Multiplex PCR Master Mix for Pathogen	13592ES96	720 μL
4×病原多重 PCR 预混液	13592ES98	7.5 mL

产品描述

本产品适用于多重 PCR 实验。4×Multiplex PCR Master Mix for Pathogen 以热启动多重 Taq 酶制剂与 4×扩增缓冲液为组分配置成预混液。本预混液可快速便捷地用于多重 PCR 反应，扩增子 GC 含量 25-75% 范围内可以有效扩增。具备高均一性、高特异性和高灵敏度的特点，同时严控背景菌。本试剂可兼容 30~100 对以内不同大小片段的多重扩增，也可用于进行数千重及以上扩增子的捕获。可应用病原微生物检测、环境微生物鉴定、食品安全检测等多个应用场景。

运输与保存方式

冰袋运输。-25 ~ -15°C 储存，有效期 2 年。

实验流程

1. 推荐反应体系：

一轮反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
4×Hieff® Multiplex PCR Master Mix for Pathogen	7.5	1×
Primer mix	x	0.02 μM-0.5 μM
模板 DNA	x	1 ng-400 ng
无菌超纯水	x	-
总体积	To30	

【注】

- 1 上表中 DNA 量和引物浓度均为推荐用量和浓度，可根据具体实验情况进行调整最适浓度。
- 2) 参考建议：每条引物的浓度可在 0.02 μM-0.5 μM 范围内进行调整。
- 3) 预混液中已经包含扩增所需要的酶、dNTP、盐离子等，无需额外添加。

二轮反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
2×Hieff® Multiplex PCR Master Mix for Pathogen (Cat.13581)	15	1×
Primer Index mix	4 (~6 pmol)	
一轮纯化产物	11	
无菌超纯水	x	-
总体积	To 25	

2. 推荐反应程序:

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	30 sec	
退火	60°C	30 sec	X
延伸	72°C	30 sec	
终延伸	72°C	3 min	
暂存	4°C	-	1

【注】

- 1) 退火时间可以根据 Panel 种类不同, 进行适当延长, 或者是梯度退火, 比如 64°C 1 min, 60°C 1 min;
- 2) 延伸时间以最长片段为准。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, 延伸时间不少于 30 sec。
- 3) 针对模板含量较低的样本, 可通过增加循环数提高扩增产出。
- 4) Panel 引物重数较多时可增加退火时间, 调整梯度退火程序, 或者根据已有 Panel 的合适的 PCR 反应程序进行测试。

3. 循环数推荐:

单管引物重数	推荐循环数 (10 ng gDNA)		退火延伸时间
	一轮	二轮	
10-50	10~28	18~28	30 s~2 min
50-200	10~28	16~28	30 s~2 min
200-800	10~28	14~28	30 s~2 min
800 以上	10~28	12~28	30 s~4 min

【注】

上表是基于 10 ng gDNA 进行的一轮及二轮循环数的推荐; 当投入量大于 10 ng, 二轮的相应的循环数可以减少; 当投入量小于 10 ng, 一, 二轮的相应的循环数要相应的增加。

4. 多重扩增引物纯化

一轮 PCR 产物 0.9×磁珠纯化

- 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。

二轮 PCR 产物 0.9 \times 磁珠纯化

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 \times , 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) 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 30 μL Nuclease-free ddH₂O 覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀。室温孵育 2 min。如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间。

8) 将 PCR 管短暂离心收集后置于磁力架中，分离磁珠和液体直到溶液澄清(约 5 min)。小心吸取 25 μL 上清转移至新的 EP 管中，继续进行下一步反应。