Ver.CN20240909

4×Hieff® Multiplex PCR Master Mix

4×多重 PCR 预混液

产品简介

本产品适用于多重 PCR 实验，采用两轮 PCR 多重扩增进行扩增子建库的试剂盒，适用于 DNA&RNA 病原微生物共检测。本试剂盒以超多重 PCR 为基础，结合热启动技术并匹配最优的缓冲，可实现 Panel 重数为 1 ~ 2000 重扩增 pannel。本产品兼容逆转录体系，扩增子 GC 含量可以将覆盖 25-75%的范围。具备高均一性、高特异性和高灵敏度的特点。本试剂适用于 30~500 对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。

产品信息

货号	12948ES24	12948ES48	12948ES96	12948ES98
规格	24 T	48 T	96 T	1000 T

组分信息

产品编号	组分名称	12948ES24	12948ES48	12948ES96	12948ES98
12948	4X 多重 PCR 预混液	180 µL	360 µL	720 µL	7.5 mL

储存条件

-15~-25°C保存，有效期 2 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. 一轮 PCR 扩增

A.反应体系

组分	体积（µL）	终浓度
4×多重 PCR 预混液	7.5	1×
Primer mix	x	0.1 µM-0.5 µM
模板DNA	-	1 ng -400 ng
无菌超纯水	up to 30	-

【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 0.1 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。

B.一轮扩增反应程序

循环步骤	温度（°C）	时间	循环数
热盖	105°C	On	
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	30 sec	x
退火	60°C	1 min	x
延伸	72°C	1 min	x
终延伸	72°C	3 min	
暂存	4°C	-	1

【注】:★ 较低模板投入量可以提高循环数。

C.一轮 PCR 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 ddH_2O，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。

2. 二轮 PCR 扩增

A.反应体系

组分	体积（μL）	终浓度
4×多重 PCR 预混液	7.5	1×
Primer Index mix	6 pmol	-
一轮纯化产物（带磁珠）	11	-
无菌超纯水	x	-
总体积	up to 30	

B. 二轮扩增反应程序

循环步骤	温度（°C）	时间	循环数
热盖	105°C	On	
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	30 sec	x
退火延伸	60°C	30 sec	x
终延伸	72°C	3 min	x
暂存	4°C	-	1

【注】：

1）请根据多重扩增引物对数调整退火时间，Panel 引物重数较多时可增加退火时间。

2）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。

C. 扩增循环数可根据模板（第一轮扩增产物）投入量进行选择，参考条件如下

模板量	20 ng	50 ng	100 ng	200 ng
循环数	8 cycles	7 cycles	6 cycles	5 cycles

【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。

D.二轮 PCR 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) 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 30 μL Nuclease-free ddH_2O 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。