

# Hieff® Multiplex RT-PCR Kit

## 多重 RT-PCR 试剂盒

### 产品简介

本产品适用于多重 RT-PCR 实验，采用一步法 RT-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 RT-PCR 为基础，结合热启动技术并匹配最优的缓冲体系，可实现 Panel 重数为 1 - 2000 重扩增 panel。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 100-500 bp 等不同长度片段的多重扩增，也可用于进行数千重以上扩增子的捕获。

### 产品信息

|    |           |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 货号 | 12950ES24 | 12950ES48 | 12950ES96 | 12950ES98 |
| 规格 | 24 T      | 48 T      | 96 T      | 1000 T    |

### 组分信息

| 产品编号    | 组分名称              | 12950ES24   | 12950ES48   | 12950ES96   | 12950ES98   |
|---------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 12950-A | 多重 RT-PCR buffer  | 168 $\mu$ L | 336 $\mu$ L | 672 $\mu$ L | 7 mL        |
| 12950-B | RT-PCR Enzyme mix | 12 $\mu$ L  | 24 $\mu$ L  | 48 $\mu$ L  | 500 $\mu$ L |
| 12950-C | 4X 多重 PCR mix     | 180 $\mu$ L | 360 $\mu$ L | 720 $\mu$ L | 7.5 mL      |

### 储存条件

-15~-25°C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. 一轮 RT-PCR 扩增

##### A. 反应体系

| 产品编号    | 组分                | 体积 ( $\mu$ L) | 终浓度                     |
|---------|-------------------|---------------|-------------------------|
| 12950-A | 多重 RT-PCR buffer  | 7             | 1 $\times$              |
| 12950-B | RT-PCR Enzyme mix | 0.5           | 1 $\times$              |
| -       | Primer mix        | x             | 0.1 $\mu$ M-0.5 $\mu$ M |
| -       | 模板DNA 或 RNA       | -             | 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  $\mu$ M-0.5  $\mu$ M 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     |     |
| 逆转录  | 50°C    | 30 min | 1   |
| 预变性  | 95°C    | 3 min  | 1   |
| 变性   | 95°C    | 30 sec | 28  |
| 退火延伸 | 58-62°C | 30 sec |     |
| 延伸   | 72°C    | 1 min  |     |
| 终延伸  | 72°C    | 3 min  | 1   |
| 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<sup>®</sup> DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出, 室温平衡至少 30 min, 新鲜配置配制 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<sup>®</sup> DNA Selection Beads (0.9×, Beads:DNA=0.9:1) 至一轮 PCR 产物中, 充分震荡混匀, 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<sub>2</sub>O, 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

| 产品编号    | 组分               | 体积 (μL)  | 终浓度 |
|---------|------------------|----------|-----|
| 12950-C | 4X 多重 PCR mix    | 7.5      | 1×  |
|         | Primer Index mix | 6 pmol   | -   |
|         | 一轮 PCR 纯化产物      | 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 |     |
| 延伸   | 72°C    | 1 min  |     |
| 终延伸  | 72°C    | 3 min  | 1   |
| 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<sup>®</sup> DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min，新鲜配制 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<sup>®</sup> DNA Selection Beads (0.9×, Beads:DNA=0.9:1) 至一轮 PCR 产物中，充分震荡混匀，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<sub>2</sub>O 覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀。室温孵育 5 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。