

产品概述

Blood Direct Multi Premix 具有很强的血源性抑制物耐受性，是血液样品免核酸提取、直接进行 DNA 扩增的专用试剂。本品具有很强的抑制物耐受性，无需进行血液样品 DNA 的提取纯化，即可在有血源性抑制物存在下进行 EDTA、肝素、柠檬酸钠等抗凝全血样品的直接扩增；由于本品经过特殊优化，因此具有更高的特异性，非常适合进行全血免提取 DNA 多重直接扩增。

试剂组成

2×Blood Direct Multi Premix

*本试剂已含有扩增酶、PCR Buffer、MgCl₂、dNTPs、稳定剂等成分。

保存条件

-20℃长期保存，4℃可保存 3 个月。使用前应混匀，避免反复冻融。

PCR 反应体系配制

试 剂	25 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
2×Blood Direct Multi Premix	12.5 μL	25 μL	1×
10×Primer Mix (1 μM) ^{1,2}	2.5 μL	5 μL	1×
Blood ³	2 μL	4 μL	8%
ddH ₂ O	To 25 μL	To 50 μL	—

1. 多重引物 10×Primer Mix：预先混合所有扩增引物，使每条引物的浓度为 1 μM。
2. 推荐引物的反应终浓度为每条引物 0.1 μM，可在 0.05~0.5 μM 之间调整。
3. 反应中推荐全血量 8%，可在 4%~20%范围调整。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数
预变性	95℃	5 min	1
变性	95℃	30 s	35
退火	55~65℃	45 s	
延伸	72℃	X sec/kb	
延伸	72℃	7 min	1
—	4℃	∞	Hold

质量控制

1. 功能检测：qPCR 的敏感性、特异性、可重复性。
2. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

常见问题及解答

1. 扩增产物少或没有扩增：
 - (1) PCR 程序预变性条件为 95℃ 5 min，以充分裂解血细胞、变性核酸模板。
 - (2) 建议使用高质量引物。

- (3) 增加 PCR 循环数。
- (4) 降低退火温度，必要时进行退火温度梯度尝试。延长退火时间至 120 sec/kb（按照最大片段算）可增加扩增产物量。
- (5) 检查引物的扩增性能和特异性。
- (6) 4%~20%终浓度范围内调整全血模板使用量。
- (7) 产物过长，需重新设计引物，产物长度不应超过 1 kb。
- (8) 延长循环内延伸时间。
- (9) 提高低产或缺失扩增子引物使用量。
- (10) 各引物 Tm 相近，当多重引物含有高 GC 片段时，尽量设计引物 Tm 在 65~72℃，退火温度在 60~68℃调整。
- (11) 本品仅适用于直扩，一般不适用于纯模板 DNA 扩增。

2. 存在非特异性扩增：

- (1) 减少循环数。
- (2) 提高退火温度。
- (3) 减少引物使用量。
- (4) 优化引物设计。