

Truepol 2X PCR Mix for Microbiome

版本号: M16E17V1.3

目录: RK20720

规格: 1 mL / 5 × 1 mL

产品组成:

Truepol 2X PCR Mix for Microbiome	RM20389
-----------------------------------	---------

产品说明

Truepol 2X PCR Mix for Microbiome 中所用到的聚合酶具有高保真性和优异的扩增性能。该聚合酶是一种全新的类似 *Pyrococcus furiosus* 来源的突变酶, 融合了持续合成增强结构域, 这种独特的结构提高了扩增的保真度和延伸速度。同时, 增加了能够抑制 5'-3' 聚合酶活性的单克隆抗体, 可进行高特异性的热启动 PCR。

Truepol 2X PCR Mix for Microbiome 是一款针对微生物多样性检测开发的产品, 对于各种类型的样本均有很高的扩增效率。同时, 试剂盒中增加的某些特定因子, 增强了产品的抗抑制剂能力, 提高了检测的灵敏度, 即使存在大量宿主 DNA 的干扰, 仍能够表现出良好的扩增效率, 较大地提高微生物检测的成功率。可用于一般及复杂样本, 如人类组织样本, 土壤样本, 粪便样本, 空气滤膜样本, 沙土样本等。

保存温度

-20°C

5'-3' 外切酶活性

无

3'-5' 外切酶活性

有

产物末端

平末端

操作说明

标准操作

1. 推荐所有的反应组分在冰上配制, 然后快速将反应体系转移到已经提前预热到 98°C 的 PCR 仪中。
2. 所有组分在使用前应混匀并瞬时离心。将其他反应组分混合后, 最后加入 Truepol 2X PCR Mix for Microbiome, 防止

其 3'-5' 核酸外切酶活性对引物的降解。

3. 注意, 本产品的操作方法可能与其他聚合酶的标准方法不同。因此, 请使用下面推荐的反应条件以获得最佳扩增效果。

推荐 PCR 反应

1. 普通样本

PCR 反应体系 (以 50 μL 反应体系为例)

组份	50 μL	终浓度
Truepol 2X PCR Mix for Microbiome	25 μL	1X
上游引物 (10 μM)	2 μL	0.2 μM-0.4 μM
下游引物 (10 μM)	2 μL	0.2 μM-0.4 μM
提取 DNA*	1-4 μL	/
Nuclease-free Water	to 50 μL	N/A

* 注: 为试剂盒提取 DNA 的原液或者为稀释液。

反应程序

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
预变性	98°C	45 s	1
变性	98°C	10 s	25-27
退火	55°C	60 s	
延伸	72°C	30 s/kb	
终延伸	72°C	5 min	1
Hold	4-12°C	∞	1

2. 困难样本

PCR 反应体系 (以 50 μL 反应体系为例)

组份	50 μL	终浓度
Truepol 2X PCR Mix for Microbiome	25 μL	1X
上游引物 (10 μM)	2-3 μL	0.4-0.6 μM
下游引物 (10 μM)	2-3 μL	0.4-0.6 μM
PCR Enhancer for Microbiome	2.5-5 μL	/
提取 DNA*	1-4 μL	/
Nuclease-free Water	to 50 μL	N/A

* 注: 为试剂盒提取 DNA 的原液或者为稀释液。

反应程序

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
预变性	98°C	45 s	1
变性	98°C	10 s	28-30
退火	55°C	60-90 s	
延伸	72°C	30 s/kb	
终延伸	72°C	5 min	1
Hold	4-12°C	∞	1

PCR 基本原则

1. 模板

使用高质量纯化的 DNA 模板将增加 PCR 的成功率，一般样本投入 10 ng 即可进行扩增；对于复杂样本，宿主含量较高或抑制剂含量较高的样本，需要稀释后再进行扩增，能够显著提高扩增效率。

2. 引物

PCR 反应体系中每条引物的终浓度可以在 0.2-1 μM 范围内调整，一般使用 0.4 μM ，对于复杂场景可提高到 0.6 μM 。

3. 变性

98°C 预变性 45 s 对大多数纯化的 DNA 模板能充分变性，对复杂的模板，例如高 GC 序列，可以延长预变性时间到 3 min 以充分变性。在扩增循环中，对大多数 DNA 模板推荐的变性条件是 98°C 5-10 s。

4. 退火

对于微生物多样性测试，退火温度推荐 55°C，也可以根据引物进行调整，提高退火温度有助于产物的特异性扩增。

5. 延伸

推荐延伸温度为 72°C，延伸时间取决于扩增基因的长度和复杂程度。通常可以按 30 s/kb 速度进行延伸。对于复杂的扩增子，如基因组 DNA，建议按 1 min/kb 速度进行延伸。

6. 循环数

通常进行 25-30 个循环可以得到足量的 PCR 产物。

7. 添加剂

普通样本的扩增无需使用，困难样本或扩增效果有待提升的样本，可以增加添加剂有助于特异性的提高及成功率的提高。

Q&A

微生物 16S 扩增涉及的样本类型众多（例如土壤、淤泥、粪便、酒醋、发酵成品、乳汁、奶原样、肺泡灌洗液、胆汁、发酵物、菌液等），PCR 扩增成功率受模板 DNA 和体系纯度（含有杂质、盐离子、色素、腐殖酸等）等因素影响较大。下面是

几类样本的实验方案推荐和建议：

1. 粪便类样本和土壤类样本

粪便类样本及土壤类样本提取核酸包含抑制剂较多，容易抑制扩增反应，导致扩增效果不佳甚至失败。一般建议如下：

1.1 50 μL 反应体系，粪便及土壤 DNA 直投 1-2 μL ，循环数 25-30 个；如果反应体系减少，可相应减少投入量；

1.2 若扩增失败，根据提取 DNA 胶图及扩增失败的胶图进行分析，若提取 DNA 胶图上显示的 DNA 含量较低，可增加投入量；若扩增胶图上无目的条带，同时无任何条带，可减少投入量进行优化尝试；若扩增胶图上无明显条带，但是有明显的弥散带，可选择降低投入量或者稀释 DNA 2-4 倍后，投入 2-4 μL 进行扩增优化；

1.3 每个试剂盒提取 DNA 的质量有所不同，因此应当根据实际情况进行投入量优化，选择最佳方案进行多样本扩增。

2. 全血液样本

全血液样本的抑制剂较多且提取的 DNA 含量及质量较低，容易造成扩增效果不佳甚至无扩增。一般建议如下：

2.1 50 μL 反应体系，血液 DNA 直投 1-2 μL ，循环数 25-30 个；如果反应体系减少，可相应减少投入量；

2.2 若扩增失败，可以进行投入量优化，减少投入量 1 倍，增加投入量 1 倍，或稀释 2 倍投入 2-4 μL 测试优化；

2.3 若扩增失败，且胶图有弥散条带，可以选择用 **RK20725 PCR Enhancer for Microbiome** 进行特异性扩增目的条带测试。

3. 组织样本

组织样本提取会有大量宿主 DNA 的存在，微生物的 DNA 提取量较少，且宿主 DNA 会直接影响扩增结果，故建议如下：

3.1 50 μL 反应体系，组织样本 DNA 直投 2-4 μL ，循环数 25-30 个；如果反应体系减少，可相应减少投入量；

3.2 若扩增失败，有明显的弥散条带，可以选择用 **RK20725 PCR Enhancer for Microbiome** 进行特异性扩增目的条带测试；

3.3 若扩增失败，可以考虑增加投入量，并使用 **RK20725 PCR Enhancer for Microbiome** 进行特异性扩增目的条带测试。

4. 其他样本

4.1 建议参考反应体系，初步的测试投入量 1-2 μL ，循环数 25-30 个；如果反应体系减少，可相应减少投入量；

4.2 若存在扩增失败或效果不佳，需要对投入量和循环数进行优化测试。