

天
净
沙
系
列

CAT#:211216-100
低温运输, -20℃保存

BINGENE

可调式易错 PCR 试剂盒

Controlled Error-prone PCR Kit

使用手册 V1.4

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	易错 PCR（Error-prone PCR）是利用 Taq DNA 多聚酶不具有 3′ →5′ 校对功能的特性，在一定条件下（如不同的 dNTP 浓度、Mg 浓度和 MnCl₂ 存在）能够按较高的机率引入随机引入突变。如果有适当的选择方法，则可从构建的突变库选出所需突变体。本产品是在本公司的易错 PCR 试剂盒的基础上改进而得，本产品具有下列特点： 1. 即开即用，十分简单方便，尤其在生物制药和酶学研究领域显示出了它的优越性。 2. 配方经过精心优化，实验人员在一定范围内可以控制突变率，一轮 PCR 的突变率范围在 2-8 突变/1000bp，更高的突变率可以通过多轮 PCR 达到。 3. 可用于连续易错 PCR（sequential error-prone PCR），只需把上一次易错 PCR 的产物用作下一次易错 PCR 的模板即可，使每一次获得的小突变累积而产生重要的有益突变。 4. 可以扩增的 DNA 片段更长，达到 2kb，对于 2kb 以上的产物，建议分段扩增。 5. 本试剂盒足够 100 次 30uL 体系的易错 PCR。 6. 本产品只能用于科研。																												
规格及成分	本产品采用五孔盒包装 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>可调易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶（5U/uL）</td><td>101005c</td><td>50 uL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>5×可调易错 PCR Mix（含 dNTP）</td><td>211216a</td><td>600 uL</td><td>1.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>可调易错 PCR 专用 MnCl₂</td><td>211216c</td><td>300 uL</td><td>0.5mL 紫盖管</td></tr><tr><td>可调易错 PCR 专用 dGTP</td><td>211216d</td><td>300 uL</td><td>0.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>10×可调易错 PCR 追加 dNTP</td><td>211216e</td><td>300 uL</td><td>0.5mL 本色管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>211216sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成份	编号	规格	包装材料	可调易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶（5U/uL）	101005c	50 uL	0.5mL 红盖管	5×可调易错 PCR Mix（含 dNTP）	211216a	600 uL	1.5mL 黄盖管	可调易错 PCR 专用 MnCl ₂	211216c	300 uL	0.5mL 紫盖管	可调易错 PCR 专用 dGTP	211216d	300 uL	0.5mL 蓝盖管	10×可调易错 PCR 追加 dNTP	211216e	300 uL	0.5mL 本色管	使用手册	211216sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																										
可调易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶（5U/uL）	101005c	50 uL	0.5mL 红盖管																										
5×可调易错 PCR Mix（含 dNTP）	211216a	600 uL	1.5mL 黄盖管																										
可调易错 PCR 专用 MnCl ₂	211216c	300 uL	0.5mL 紫盖管																										
可调易错 PCR 专用 dGTP	211216d	300 uL	0.5mL 蓝盖管																										
10×可调易错 PCR 追加 dNTP	211216e	300 uL	0.5mL 本色管																										
使用手册	211216sc	1 份	无																										
运输及保存	低温运输，-20℃ 保存，有效期为一年。																												
自备试剂	引物、DNA 模板、常规 PCR 试剂盒。																												
使用方法	1. 将引物稀释到 10uM。引物也是决定易错 PCR 成败的关键因素，设计引物时要保证其 T_m 在 70℃，长度在 25-30nt 之间，GC 含量在 45%-60%之间，3 端 GC 含量低，并且没有发夹结构。 2. 用自备易错 PCR 引物和自备的常规 PCR 试剂扩增制备易错 DNA 模板(常规 PCR 产物)，胶回收并准确确定浓度。注意：易错 PCR 的模板一定要用胶回收的常规 PCR 产物，因为胶回收会可以把电泳不可见的非特异性扩增片段去除，否则这些片段由于也是用易错 PCR 引物扩增所得，在易错 PCR 扩增时也会被扩增，产生竞争抑制，降低靶分子的扩增																												

效率。

3. 将回收的 DNA 片段（模板）稀释到 1ng/uL 、 10ng/uL 和 100ng/uL 三个浓度。注意：模板使用量是影响突变率的最重要因素，模板 DNA 为非突变 DNA，扩增产生的 DNA 为突变 DNA，易错 PCR 体系最终 DNA 量是基本固定的，因此模板 DNA 使用量越大，则突变 DNA 在终产物中的相对比例就越低，突变率就越低。故建议同时测试三个模板用量。如果都成功，则优先选用模板浓度低的 PCR 产物进行分析。
4. 根据每 1000bp 的预期突变数按下表确定 30uL 易错 PCR 体系中 MnCl₂ 和 dGTP 的用量（这是在模板 DNA 不超过 1ng 的前提下的数据）。表中的 Mn 表示可调易错 PCR 专用的 MnCl₂，dG 表示可调易错 PCR 专用的 dGTP：

预期突变数	2 个	3 个	4 个	5 个	6 个	7 个	8 个
Mn 用量 (uL)	0	1.0	2.5	4.0	4.0	4.0	4.0
dG 用量 (uL)	0	0	0	1.0	2.0	3.0	4.0

5. 设置 30uL 体系的可调易错 PCR：第一次建议设置 3 个模板浓度。在 3 干净的 PCR 管中，分别加入下列成分。最后加可调易错 PCR 专用 MnCl₂：

成分	模板用量 1	模板用量 2	模板用量 3
可调易错 PCR Mix, 5×	6 uL	6 uL	6 uL
可调易错 PCR 专用 dGTP	根据上步用量表选择	根据上步用量表选择	根据上步用量表选择
自备 DNA 模板	1 uL (1ng/uL)	1 uL (10ng/uL)	1 uL (100ng/uL)
自备 PCR 引物 (10 uM each)	1 uL each	1 uL each	1 uL each
可调易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL
可调易错 PCR 专用 MnCl ₂	根据上步用量表选择	根据上步用量表选择	根据上步用量表选择
自备超纯水	补水到 30uL	补水到 30uL	补水到 30uL

6. 按已经优化的常规 PCR 条件进行易错 PCR：

PCR 前变性	94℃ 3 分钟
易错 PCR(循环 30-60 次)	94℃ 1 分钟
	60℃ 1 分钟
	72℃ 3-10 分钟

注：由于易错 PCR 含高浓度的镁离子，因此容易形成引物二聚体，因此需要使用较高的复性温度，以避免小片段扩增产物竞争性抑制 PCR。易错 PCR 一般不需要热启动，也不

	需要在易错 PCR 结束后做延伸处理。易错 PCR 循环次数越多，突变 DNA（扩增产物）与非突变 DNA（原始模板）的比例就越高。此外在突变率和模板长度恒定的情况下，扩增次数越多，发生突变的绝对数就越高，在同一模板上发生的突变位点数就越多，所以需要，可以做 30、35、40、45、50、55、60 次 7 个循环数的比较。 7. 易错 PCR 结束后，取 3uL 进行电泳检查。 8. 如果有预期大小的 PCR 产物，则全部电泳，进行胶回收，再进行克隆和测序等后续操作。如果需要增加突变率，可以选择一个突变后的 DNA 为模板，再进行下一轮易错 PCR。 9. 如果没有预期大小的 PCR 产物，可以按下列操作追加进行一轮常规 PCR（追加 PCR）。 10. 在 PCR 管中，加入 3uL 10×可调易错 PCR 专用追加 dNTP 到 27uL 电泳剩下的 PCR 体系中，按下表进行追加 PCR（chasing PCR）。注意追加 PCR 只做 20 次循环。 <table><tr><th>步骤</th><th>参数</th><th>循环数</th></tr><tr><td rowspan="3">追加 PCR</td><td>94℃ 1 分钟</td><td rowspan="3">循环 20 次</td></tr><tr><td>60℃ 1 分钟</td></tr><tr><td>72℃ 1 分钟</td></tr></table> 11. 追加 PCR 结束后，再电泳检测。如果有条带，再进行克隆和测序等后续操作。如果需要增加突变率，可以选择一个突变后的 DNA 为模板，再进行下一轮易错 PCR。 12. 如果没有预期大小的 PCR 产物，则需要分析原因。	步骤	参数	循环数	追加 PCR	94℃ 1 分钟	循环 20 次	60℃ 1 分钟	72℃ 1 分钟
步骤	参数	循环数							
追加 PCR	94℃ 1 分钟	循环 20 次							
	60℃ 1 分钟								
	72℃ 1 分钟								
疑难解答	Q：现象：没有 PCR 产物。 A：可能原因：一是引物没有优化，可以重新设计引物；二是模板 DNA 太少，可以增加用量；三是模板不纯，最好先胶回收；四是 DNA 溶液中有 EDTA，可以适当补加 Mg⁺⁺。 Q：现象：太多的 PCR 条带或 PCR 条带模糊一片。 A：可能原因：一是模板有胶回收、二是 PCR 循环数太多；三是复性温度太低；四是引物没有优化；五是 PCR 条件没优化，可以使用 touch-down PCR。 Q：如果需要更高的突变率，如何办？ A：可以使用连续多次易错 PCR 来提高突变率。但最好先用胶纯化回收易错 PCR 片段,再用于下一轮易错 PCR。								
关联产品	易错PCR试剂盒								