

天
净
沙
系
列

CAT#:220167-100
低温运输, -20℃保存

BINGENE

易错 PCR (易突变 PCR) 试剂盒

使用手册 1.1

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而设计。如果有适当的突变选择方法，则可从构建的突变库选出所需突变体，用于人工诱变。本产品就是根据此原理开发得产品，它具有下列特点： 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，突变率稳定，突变没有趋向性。易错 PCR 的突变率为 0.66% (±0.13%)，详见使用手册疑难解答。 3. 比体内基因突变更快捷简单，但如果在 PCR 引物中设计位点，则可使产物克隆到表达载体，也可以用于体内蛋白活性的筛选。 4. 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。 5. 只适用于扩增 1kb 以下的产物，对于 1kb 以上的产物，建议分段扩增。 6. 本产品足够 100 次 30uL 体系的易错 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。			
规格及成分	本产品使用五孔盒包装			
	成份	编号	规格	包装材料
	5×易错 PCR Mix (含 dNTP)	220167a	600 uL	2.0mL 白色盖
	易错 PCR 专用 MgCl ₂	220167b	100 uL	0.5mL 本色盖
	易错 PCR 专用 MnCl ₂	960903c	300 uL	0.5mL 绿色盖
	易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶 (5U/uL)	220167c	50 uL	0.5mL 红色盖
	使用手册	220167sc	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、超纯水。			
使用方法	1. 将自备的 PCR 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。 用自备引物和常规 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。如果常规 PCR 制备模板的引物和易错 PCR 引物不同(类似巢式 PCR) 则可以避免此问题，但需要合成两对引物。本试剂盒只适用于扩增 1kb 以下的产物，对于 1kb 以上的产物，建议分段扩增。

2. 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。反之亦然。但模板太少又不容易扩增成功，所以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。
3. 以 30 uL 的标准 PCR 反应体系为例，如果反应体系不是 30 uL，各成分需要等按比例增加或减少。在一干净的 PCR 管中，加入下列成分（由于 Mn 离子容易跟其他成分发生沉淀反应，因此最后加错 PCR 专用 MnCl₂）：

成分	模板用量 1	模板用量 2	模板用量 3
5×易错 PCR Mix (含 dNTP)	6 uL	6 uL	6 uL
易错 PCR 专用 MgCl ₂	1uL	1uL	1uL
自备 DNA 模板	1 uL (1ng/uL)	1 uL (10ng/uL)	1 uL (100ng/uL)
自备易错 PCR 引物 (10 uM each)	各 1 uL	各 1 uL	各 1 uL
易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶 (5U/uL)	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL
易错 PCR 专用 MnCl ₂	3 uL	3 uL	3 uL
补自备超纯水到	30 uL	30 uL	30 uL

4. 立即按用户已经优化的 PCR 条件进行一定循环数的 PCR（循环数与突变率的关系见下表），然后取 10uL 电泳检查。如果没有优化的 PCR 条件，一般可以先尝试下面的 PCR 条件。(注意：易错 PCR 一般不需要热启动，也不需要 PCR 结束后做延伸处理)：

步骤	参数	循环数
PCR 前变性	94℃ 3 分钟	循环 1 次

	<table><tr><td rowspan="3">易错 PCR</td><td>94℃ 1 分钟</td><td rowspan="3">循环 30-60 次</td></tr><tr><td>60℃ 1 分钟</td></tr><tr><td>72℃ 3 分钟</td></tr></table> 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，所以如果需要，可以做 30、35、40、45、50、55、60 次 7 个循环数的比较。 5. 电泳检测是否得到预计长度的 PCR 产物。如果没有，可以调整模板用量和 PCR 参数。 6. 胶回收易错 PCR 扩增产物、克隆并对单菌落进行功能筛选或测序分析、如果需要增加突变率，可以以突变后的 DNA 为模板，进行下一轮易错 PCR。	易错 PCR	94℃ 1 分钟	循环 30-60 次	60℃ 1 分钟	72℃ 3 分钟
易错 PCR	94℃ 1 分钟		循环 30-60 次			
	60℃ 1 分钟					
	72℃ 3 分钟					
疑难解答	Q：易错 PCR 与定点突变 PCR 有什么区别？ A：定点突变是指通过聚合酶链式反应（PCR）等方法向目的 DNA 片段（可以是基因组，也可以是质粒）中引入所需变化（通常是表征有利方向的变化），包括碱基的添加、删除、点突变等。它需要预先知道靶基因的序列。易错 PCR 是一种随机突变，它不需要预先知道靶基因的序列（引物结合部分除外），但需要后续的筛选方法筛选自己所需要的突变。 Q：易错 PCR 的错误率是多少？ A：易错 PCR 的突变率为 0.66%（±0.13%），对 500 bp 的 PCR 产物，相当于有 4% 的 PCR 片段为野生型，12% 的含一个突变，20% 的含两个突变，22% 的含三个突变，18% 的含四个突变，12% 的含五个突变，12% 的含六个或更多突变。 Q：如果需要每个核苷酸有高于 0.66% 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 PCR 片段,再用于下一轮 PCR。此外不能用少于千分之一的第一次 PCR 产物作为第二轮易错 PCR 的模板，否则多样性将受到影响。第三轮易错 PCR 最好使用所有第二轮的 PCR 产物作为模板,但需要在 10mL 体系中完成(可以分成很多 100uL 体系进行)。					
关联产品	可调易错PCR试剂盒					