

天
净
沙
系
列

CAT#:101005-100
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

即用型易错 PCR 试剂盒

Instant Error-prone PCR Kit

使用手册 2.0

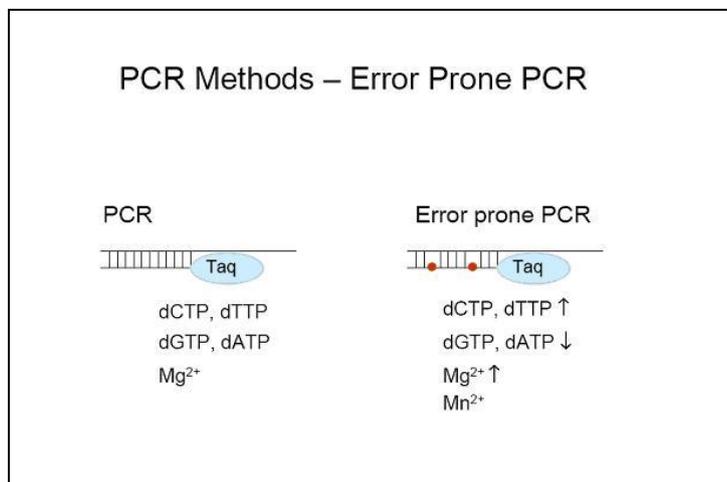
北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.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。易错 PCR 和常规 PCR 的比较如下:



本产品就是专门为广大的研究工作者进行易错 PCR 而开发, 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, 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, 只能用于科研。

规格及成分

成 份	编 号	十孔盒包装
易错 PCR Mix, 10×	101005a	300 uL (白盖)
易错 PCR 专用 dNTP, 10×	101005b	300 uL (绿盖)
易错 PCR 专用 MnCl ₂	160903c	300 uL (黄盖)
易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶 (5U/uL)	101005c	50 uL (红盖)
使用手册	101005sc	1 份

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	<p>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 Tm 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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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：</p> <table border="1" data-bbox="456 1395 1396 1989"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>模板用量 1</th> <th>模板用量 2</th> <th>模板用量 3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>易错 PCR Mix, 10×</td> <td>3 uL</td> <td>3 uL</td> <td>3 uL</td> </tr> <tr> <td>自备 DNA 模板</td> <td>1 uL (1ng/uL)</td> <td>1 uL (10ng/uL)</td> <td>1 uL (100ng/uL)</td> </tr> <tr> <td>易错 PCR 专用 dNTP, 10×</td> <td>3 uL</td> <td>3 uL</td> <td>3 uL</td> </tr> <tr> <td>易错 PCR 专用 MnCl₂</td> <td>3 uL</td> <td>3 uL</td> <td>3 uL</td> </tr> <tr> <td>自备易错 PCR 引物 (10 uM each)</td> <td>各 1 uL</td> <td>各 1 uL</td> <td>各 1 uL</td> </tr> <tr> <td>易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶 (5U/uL)</td> <td>0.5 uL</td> <td>0.5 uL</td> <td>0.5 uL</td> </tr> <tr> <td>补自备超纯水到</td> <td>30 uL</td> <td>30 uL</td> <td>30 uL</td> </tr> </tbody> </table> <p>4. 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</p>	成分	模板用量 1	模板用量 2	模板用量 3	易错 PCR Mix, 10×	3 uL	3 uL	3 uL	自备 DNA 模板	1 uL (1ng/uL)	1 uL (10ng/uL)	1 uL (100ng/uL)	易错 PCR 专用 dNTP, 10×	3 uL	3 uL	3 uL	易错 PCR 专用 MnCl ₂	3 uL	3 uL	3 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	补自备超纯水到	30 uL	30 uL	30 uL
成分	模板用量 1	模板用量 2	模板用量 3																														
易错 PCR Mix, 10×	3 uL	3 uL	3 uL																														
自备 DNA 模板	1 uL (1ng/uL)	1 uL (10ng/uL)	1 uL (100ng/uL)																														
易错 PCR 专用 dNTP, 10×	3 uL	3 uL	3 uL																														
易错 PCR 专用 MnCl ₂	3 uL	3 uL	3 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																														
补自备超纯水到	30 uL	30 uL	30 uL																														

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
易错 PCR	94℃ 1 分钟	循环 30-60 次
	45℃ 1 分钟	
	72℃ 1 分钟	

注: 易错 PCR 一般不需要热启动, 也不需要 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。

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% ($\pm 0.13\%$), 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

PCR Inhibitor Erasol、PCR Enhancer