

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:160903-100  
低温运输, -20°C保存

**TIANDZ**

可调式易错 PCR 试剂盒

Controlled Error-prone PCR Kit

使用手册 V1.4

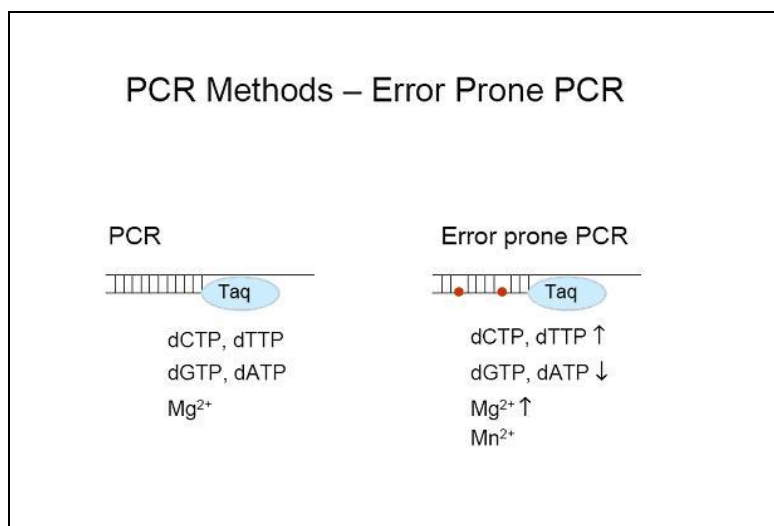
北京天恩泽基因科技有限公司

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](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto: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 MnCl<sub>2</sub> 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:



本产品是在本公司的易错 PCR 试剂盒基础上改进而得, 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。

## 规格及成分

成 份	编 号	十孔盒包装
易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶 (5U/uL)	101005c	50 uL (红色盖)
易错 PCR Mix 2.0, 10×	160903a	300 uL (黄色盖)
易错 PCR 专用 dNTP 2.0, 10×	160903b	300 uL (白色盖)
易错 PCR 专用 MnCl <sub>2</sub>	160903c	300 uL (紫色盖)
易错 PCR 专用 dGTP	160903d	300 uL (蓝色盖)
超纯水	100935	1 mL (本色盖)
使用手册	160903sc	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、常规 PCR 试剂盒。

## 使用方法

1. 将引物稀释到 10 $\mu$ M。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 $^{\circ}$ C，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。
3. 将回收的 DNA 片段（模板）稀释到 1ng/ $\mu$ L、10ng/ $\mu$ L 和 100ng/ $\mu$ L 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，所以建议同时测试两个模板用量。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 30 $\mu$ L 易错 PCR 体系中  $MnCl_2$  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 表示易错 PCR 专用的  $MnCl_2$ ，dG 表示易错 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 ( $\mu$ L)	0	1.0	2.5	4.0	4.0	4.0	4.0
dG 用量 ( $\mu$ L)	0	0	0	1.0	2.0	3.0	4.0

5. 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（这里是设置 30 $\mu$ L 的反应体系，如果反应体系不是 30  $\mu$ L，则各成分用量需要按等比例增加或减少）：

成分	模板用量 1	模板用量 2	模板用量 3
易错 PCR Mix, 10 $\times$	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L
易错 PCR 专用 dNTP, 10 $\times$	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L
易错 PCR 专用 $MnCl_2$	根据上步计算	根据上步计算	根据上步计算
易错 PCR 专用 dGTP	根据上步计算	根据上步计算	根据上步计算
自备 DNA 模板	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L

	(1ng/uL)	(10ng/uL)	(100ng/uL)
自备 PCR 引物 (10 uM each)	1 uL each	1 uL each	1 uL each
易错 PCR 专用 Taq DNA 聚合酶	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL
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
	45℃ 1 分钟
	72℃ 1 分钟 (对 1Kb 长的模板)

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。长度每增加 1Kb, 时间延长 1 分钟。易错 PCR 循环次数越多, 突变 DNA (扩增产物) 与非突变 DNA (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, 所以第一次实验时最好做 30、35、40、45、50、55、60 次 7 个循环数的比较。

7. 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。

8. 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: 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<sup>++</sup>。

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。此外不能用少于千分之一的第一次易错 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易错 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

易错 PCR 试剂盒 (CAT#:101005-100)