

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:180501-25  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

即用型易错滚环扩增试剂盒  
Instant Error-prone RCA Kit

使用手册 V1.4

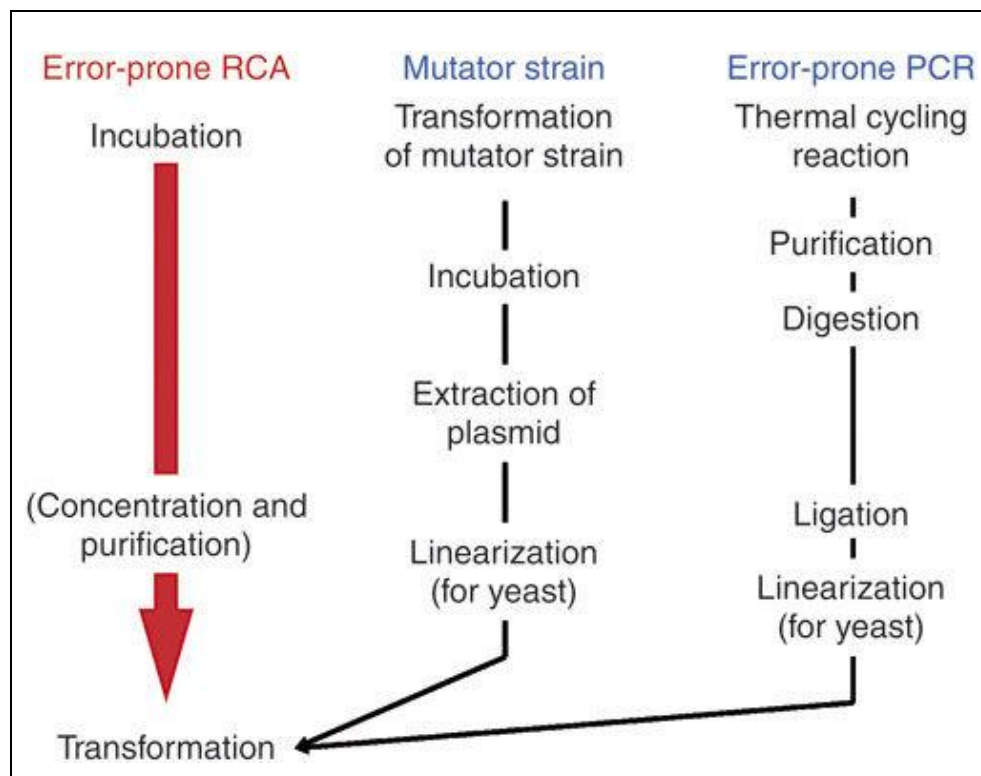
北京天恩泽基因科技有限公司

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 RCA 即易错滚环扩增 (error-prone RCA、error-prone rolling circle amplification) 技术是利用 phi29 DNA 多聚酶在一定条件下 (如  $MnCl_2$  存在) 能够按较高的机率随机引入突变而系统进行基因突变的方法。由于 RCA 可以直接用环状质粒作为模板扩增, 所以扩增产物可以不需要连接, 直接转化 E.coli 进行筛选 (如果是转化酵母, 则需要酶切线性化后再转化)。易错 RCA 和常用的易错 PCR 扩增和易错宿主菌突变的比较如下:



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。1kb 的 DNA 片段平均有 3 个突变。
3. 一步法, 直接用扩增产物转化细菌, 免去酶切和克隆步骤。
4. 可用于连续易错 RCA (sequential error-prone RCA), 只需把上一次易错 RCA 的产物用作下一次易错 RCA 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. 适用于扩增几百 bp 到几十 kb 的模板, 比易错 PCR 长。
6. 本试剂盒可以进行 25 次 20uL 体系的易错 RCA 实验。

## 规格及成分

成份	编号	十孔盒包装
变性液	100941a	75 uL

		RCA 引物	100941b	150 uL
		RCA Mix, 2×	100941c	300uL
		phi 29 DNA 聚合酶 (10U/uL)	100941d	30uL
		MnCl <sub>2</sub> 溶液	100941e	300uL
		使用手册	100941sc	1 份
<b>运输及保存</b>	低温运输, -20℃保存, 有效期为一年。			
<b>自备试剂</b>	质粒 DNA 模板 (必须是环状)			
<b>使用方法</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 纯化带有靶片段的质粒 DNA, 将其准确定量并稀释到 2pg/uL。注意: 碱变性法提取的质粒 DNA 都有残留的 RNA 污染, 尽管电泳时看不见, 但测 OD 时这些 RNA 会使得 DNA 浓度虚高。因此质粒 DNA 需要电泳时跟浓度已知的 DNA marker 比较来确定浓度。此方法误差在 2 倍之内, 但可以接受。</li> <li>2. 在 PCR 塑料管中加入不超过 2.5uL 纯化好的质粒 DNA, 用量在 50pg 左右。如果体积不足 2.5uL, 则用自备的超纯水补齐。最好同时做一个不加质粒 DNA 模板的阴性对照。</li> <li>3. 加入等体积 (2.5uL) 变性液, 轻柔吹打混匀。</li> <li>4. 室温放置 2 分钟。</li> <li>5. 加入 2.5uL RCA 引物和 2.5uL MnCl<sub>2</sub> 溶液。此时样品总体积为 10uL。</li> <li>6. 在 10uL DNA 样品中, 加入 10 uL 的 RCA Mix, 轻柔吹打混合均匀。</li> <li>7. 加入 1 uL Phi 29 DNA 聚合酶 (10U/uL), 轻柔吹打混合均匀。</li> <li>8. 30℃保温 24 小时。最好使用 PCR 仪进行 30℃保温并打开热盖保温。注意: 反应时间不要短于 24 小时。如果采用 30℃水浴, 最好在样品管中加入 30-50uL 石蜡油以防水分蒸发, 因为 30℃长时间的水浴也能使水分蒸发到管壁, 从而改变反应体系中各成分的浓度、降低 RCA 反应效率。</li> <li>9. 65℃保温 10 分钟使 phi29 DNA 聚合酶灭活。注: 由于 phi29 DNA 聚合酶有 DNA 外切活性, 所以最好将其灭活以免干扰后续反应。</li> <li>10. 立即取 5uL RCA 反应液进行电泳检测扩增效果, DNA 片段大小将在 10kb 以上。注意: 易错 RCA 的扩增效率低于常规 RCA。</li> <li>11. 扩增的 DNA 可以用于后续试验或当冰箱长期保存。如果用于转化, 则需要纯化 DNA, 否则 RCA 扩增体系里面的成分会降低转化效率。如果用于转化细菌, 则可以不先酶切。如果转化酵母, 则需要用合适的内切酶线性化。由于突变也在载</li> </ol>			

	<p>体区域发生影响抗性基因和复制起始位点等区域，所以转化效率只有常规转化的 10-20%左右，即转化子数量只有正常质粒转化的 10-20%。</p> <p>附：可以采取先让突变片段（不含载体部分）两端带酶切位点，然后用连接酶环状化，作为易错 RCA 的模板扩增（短片段扩增效率远远低于环状 DNA），扩增后再用能识别上述酶切位点的内切酶线性化，再克隆到载体中。此操作步骤更多，需要用于自备连接酶和内切酶。</p> <p>如果 20uL 易错 RCA 扩增得到的产物量不够，可以继续用扩增得到的 DA 25-50ng 作为模板继续进行易错 PCR。</p>
<p><b>疑难解答</b></p>	<p>Q: 易错 PCR 与定点突变 PCR 有什么区别?</p> <p>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。</p> <p>Q: 易错 PCR 的错误率是多少?</p> <p>A: 易错 PCR 的突变率为 0.66% (<math>\pm 0.13\%</math>), 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。</p> <p>Q: 如果需要每个核苷酸有高于 0.66% 的突变率, 如何办?</p> <p>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)。</p>
<p><b>关联产品</b></p>	<p>易错PCR</p>