

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:220167-100

低温运输, -20°C保存

天净沙

易错 PCR 试剂盒

Error-Prone PCR Kit

使用手册 1.3

北京天净沙基因科技有限公司

网址: [www.tjs.bio](http://www.tjs.bio); 电话: 400-1078566; 电邮: [order@tjs.bio](mailto:order@tjs.bio)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>易错 PCR (error-prone PCR) 是利用天然 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:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>6. 本产品足够 100 次 30uL 体系的易错 PCR 反应。</li> <li>7. 本产品只能用于科研。</li> </ol>																												
<p><b>规格及成分</b></p>	<p>本产品使用五孔盒包装</p> <table border="1" data-bbox="427 1252 1455 1700"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10×易错 PCR Mix (含酶)</td> <td>220167a</td> <td>300 uL</td> <td>0.5mL 红色盖</td> </tr> <tr> <td>易错 PCR 专用 dNTP</td> <td>220167b</td> <td>300 uL</td> <td>0.5mL 黄色盖</td> </tr> <tr> <td>易错 PCR 增强剂</td> <td>220167c</td> <td>300 uL</td> <td>0.5mL 白色盖</td> </tr> <tr> <td>追加 dNTP, 0.5mM</td> <td>220167d</td> <td>300 uL</td> <td>0.5mL 本色管</td> </tr> <tr> <td>易错 PCR 专用 MnCl<sub>2</sub></td> <td>220167e</td> <td>300 uL</td> <td>0.5mL 绿色盖</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>220167sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装	10×易错 PCR Mix (含酶)	220167a	300 uL	0.5mL 红色盖	易错 PCR 专用 dNTP	220167b	300 uL	0.5mL 黄色盖	易错 PCR 增强剂	220167c	300 uL	0.5mL 白色盖	追加 dNTP, 0.5mM	220167d	300 uL	0.5mL 本色管	易错 PCR 专用 MnCl <sub>2</sub>	220167e	300 uL	0.5mL 绿色盖	使用手册	220167sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装																										
10×易错 PCR Mix (含酶)	220167a	300 uL	0.5mL 红色盖																										
易错 PCR 专用 dNTP	220167b	300 uL	0.5mL 黄色盖																										
易错 PCR 增强剂	220167c	300 uL	0.5mL 白色盖																										
追加 dNTP, 0.5mM	220167d	300 uL	0.5mL 本色管																										
易错 PCR 专用 MnCl <sub>2</sub>	220167e	300 uL	0.5mL 绿色盖																										
使用手册	220167sc	1 份	无																										
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20℃ 保存, 有效期为一年。</p>																												
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>引物、DNA 模板、超纯水。</p>																												
<p><b>使用方法</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 将自备的 PCR 引物稀释到 10uM。引物是决定易错 PCR 成败的关键因素, 设计引物时要保证其 T<sub>m</sub> 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。</li> <li>2. 用自备引物和自备的常规 PCR 试剂扩增制备易错 DNA 模板 (常规 PCR 产物),</li> </ol>																												

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。

3. 将回收的 DNA 片段（模板）用水稀释到 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，因为模板 DNA 为非突变 DNA，扩增产生的 DNA 为突变 DNA，易错 PCR 体系跟常规 PCR 一样，最后会达到扩增平台，最终得到的扩增 DNA 的量是固定的，因此起始模板 DNA 使用量越大，则突变 DNA 在最终得到的总 DNA 中的相对比例就越低。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。
4. 设置 30uL 体系的易错 PCR 反应。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，因此上机前最后加 MnCl<sub>2</sub>：

成分	管 1	管 2	管 3
10×易错 PCR Mix（含酶）	3 uL	3 uL	3 uL
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 增强剂	3 uL	3 uL	3 uL
易错 PCR 专用 dNTP	3 uL	3 uL	3 uL
易错 PCR 专用 MnCl <sub>2</sub>	3 uL	3 uL	3 uL
补自备超纯水	加到 30 uL	加到 30 uL	加到 30 uL

5. 立即按下列参数进行易错 PCR：

步骤	参数	循环数
PCR 前变性	94°C 3 分钟	循环 1 次
易错 PCR	94°C 1 分钟	循环 30-60 次
	60°C 1 分钟	
	72°C 3-10 分钟	

注：由于易错 PCR 含高浓度的镁离子，因此引物容易互为模板形成引物二聚体，

因此使用 60°C 为复性温度。在错误碱基掺入后，DNA 合成会暂时停滞，因此为了让 DNA 合成继续，需要延长合成的时间到 3-10 分钟。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。

6. 易错 PCR 结束后，各取 3uL 进行电泳检查。
7. 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。
8. 如果没有 PCR 产物，则按下列操作进行追加 PCR。
9. 在易错 PCR 管中，加入 3uL 追加 dNTP 到 27uL 剩下的易错 PCR 体系中，按下表进行追加 PCR（chasing PCR）。

步骤	参数	循环数
追加 PCR	94°C 1 分钟	循环 20 次
	60°C 1 分钟	
	72°C 1 分钟	

10. 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。
11. 如果没有预期大小的 PCR 产物，则需要分析原因。

### 疑难解答

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。

### 关联产品

可调易错 PCR 试剂盒