天净沙系列

CAT#:230712

低温运输，-20℃保存

染料法实时易错 PCR 试剂盒

SYBR Real-Time Error-Prone PCR Kit

使用手册 1.20

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

易错 PCR（Error-Prone PCR）是利用天然 Taq DNA 聚合酶不具有 3′→5′校对功能的特性，在一定条件下能够按较高的机率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。但是易错 PCR 在操作中最大的问题是最佳 PCR 循环数的摸索，循环次数太多或太少，都得不到成形的突变 DNA 条带，影响后续的 DNA 回收和克隆步骤。为克服此缺点，本公司开发了染料法实时易错 PCR 产品，它具有下列特点：

1. 即开即用，十分简单方便。
2. 可以实时监控 PCR 的进程，用户可以不需要任何摸索就能在最佳时间（荧光信号刚进入平台期）停止 PCR，立即进行电泳，回收到突变 DNA。
3. 配方经过精心优化，突变率稳定，用本试剂盒进行一次标准的易错 PCR 扩增实验一般会得到 6-7 个突变（对 1000 bp 的片段而言）。进行定向突变时每个基因有 2-6 个突变为最佳范围。
4. 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。
5. 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。
6. 只适用于扩增 1 kb 以下的产物，对于 1 kb 以上的产物，建议分段扩增。
7. 本产品足够 100 次 30 μL 体系的染料法实时易错 PCR 反应。
8. 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
10×染料法易错 PCR Mix	220167a	300 μL	0.5 mL 红盖管
易错 PCR 专用 dNTP	230712b	150 μL	0.5 mL 黄盖管
易错 PCR 增强剂	220167c	300 μL	0.5 mL 白盖管
追加 dNTP，0.5 mM each	220167d	300 μL	0.5 mL 本色管
易错 PCR 专用 MnCl2	220167e	300 μL	0.5 mL 绿盖管
使用手册	230712sc	1 份	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

1. 将自备的 PCR 引物稀释到 10 μM。引物是决定易错 PCR 成败的关键因素，设计引物时要保证其 Tm 在 70℃，长度在 25-30 nt 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），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 1 kb 以下的产物，对于 1 kb 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 1 ng/μL、10 ng/μL 和 100 ng/μL 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 30 μL 体系的易错 PCR 反应。在干净的 PCR 管中，分别加入下列成分。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 MnCl2：

成分	管 1	管 2	管 3
10×染色法易错 PCR Mix	3 μL	3 μL	3 μL
自备 DNA 模板	1 μL (1 ng/ μL)	1 μL (10 ng/ μL)	1 μL (100 ng/ μL)
自备易错 PCR 引物 (10 μM each)	各 1 μL	各 1 μL	各 1 μL
易错 PCR 增强剂	3 μL	3 μL	3 μL
易错 PCR 专用 dNTP	1.5 μL	1.5 μL	1.5 μL
易错 PCR 专用 MnCl2	3 μL	3 μL	3 μL
补自备超纯水	加到 30 μL	加到 30 μL	加到 30 μL

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℃ 3 min	循环 1 次

染料法实时易错 PCR	94℃ 1 min	循环 60 次，在 72℃时采集 SYBR Green I 通道的荧光信号
	60℃ 1 min	
	72℃ 3-10 min	

注：由于易错 PCR 含高浓度的镁离子，引物容易互为模板形成引物二聚体，因此应使用 60℃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。但循环次数过多，又得不到完整的 DNA 条带，没法进行后续的克隆，故最适循环数需要优化。设置 60 次 PCR 循环并不表示一定要完成 60 次，而是在荧光信号，进入平台期后立即停止易错 PCR 并进行电泳回收。

6. 易错 PCR 结束后，立即电泳检测。如果扩增产物长度正确，则进行胶回收，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。
7. 如果电泳没有看见预期的扩增，只是表示预期的扩增条带的量没有达到电泳后可肉眼看见的水平，可按下列操作进行追加 PCR，将这些片段扩增，达到电泳可见水平。
8. 在易错 PCR 管中，加入 3 μL 追加 dNTP 到 27 μL 剩下的染料法实时易错 PCR 体系中，按下表进行追加实时 PCR（chasing Real-Time PCR）。

步骤	参数	循环数
追加实时 PCR	94℃ 1 min	循环 20 次，在 72℃时采集 SYBR Green I 通道的荧光信号
	60℃ 1 min	
	72℃ 1 min	

9. 追加实时 PCR 荧光信号进入平台期后立即结束 PCR，并不需要等到 20 个循环结束，并进行电泳检测。如果有 DNA 条带并且长度正确，则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。
10. 如果没有预期大小的 PCR 产物，则需要分析原因。

关联产品	可调染料法实时易错PCR试剂盒