天净沙系列

CAT#:241102

低温运输，-20℃保存

染料法实时可调易错 PCR 试剂盒（热启动法）

SYBR Real-Time Adjustable Error-Prone PCR Kit (Hot-Start Method)

使用手册 V1.0

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 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^{2+}浓度和 $MnCl_2$ 存在）能够以较高的机率随机引入突变。如果有适当的选择方法，则可从构建的突变库中筛选出所需突变体。很多时候，用户需要通过易错 PCR 得到不同突变数的 DNA 片段。为满足此需求，本公司开发了可调易错 PCR 试剂盒。在使用过程中，发现易错 PCR 循环数很难优化，PCR 循环数过多或过少都得不到清晰的 DNA 条带用于后续回收和克隆。本公司继续改进并推出染料法实时可调易错 PCR 试剂盒（热启动法），它具有下列特点：

1. 即开即用，十分简单方便。
2. 使用热启动 Taq 酶，在一定程度上减少非特异扩增。
3. 在荧光信号进入平台期即可终止循环，此时电泳就可以得到清晰的突变 DNA 条带，不需要盲目摸索，节约大量的时间。
4. 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 个突变/1000 bp，更高的突变率可以通过多轮 PCR 达到。
5. 可用于连续易错 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. 可以扩增的 DNA 片段更长，以突变率设置为 0.1%以下的条件进行扩增时，靶分子长度可达 2 kb，对于 2 kb 以上的产物，建议分段扩增。
7. 本试剂盒足够 100 次 30 μL 体系的染料法实时易错 PCR。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
5×染料法实时可调易错 PCR Mix (含 dNTP)	241102a	600 μL	1.5 mL 黄盖管
可调易错 PCR 专用 热启动 Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)	241102b	50 μL	0.5 mL 红盖管
可调易错 PCR 专用 $MnCl_2$	211216c	300 μL	0.5 mL 紫盖管
可调易错 PCR 专用 dGTP	211216d	300 μL	0.5 mL 蓝盖管
10×可调易错 PCR 追加 dNTP	211216e	300 μL	0.5 mL 本色管
使用手册	241102sc	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、常规 PCR 试剂盒。

使用方法

1. 将引物稀释到 10 μM。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 25-30 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. 用自备易错 PCR 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。
3. 将回收的 DNA 片段（模板）稀释到 100 ng/μL、10 ng/μL 和 1 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，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 产量是基本固定的，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。故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. 根据每 1000 bp 的预期突变数按下表确定 30 μL 易错 PCR 体系中 $MnCl_2$ 和 dGTP 的用量（这是在模板 DNA 不超过 1 ng 的前提下的数据)。表中的 Mn 表示可调易错 PCR 专用的 $MnCl_2$, dG 表示可调易错 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（μL)	0	1.0	2.5	4.0	4.0	4.0	4.0
dG 用量（μL)	0	0	0	1.0	2.0	3.0	4.0

5. 设置 30 μL 体系的可调易错 PCR: 第一次建议设置 3 个模板浓度。在 3 个干净的 PCR 管中，分别加入下列成分。最后加可调易错 PCR 专用 $MnCl_2$:

成分	模板用量 1	模板用量 2	模板用量 3
5×染料法实时可调易错 PCR Mix	6 μL	6 μL	6 μL
可调易错 PCR 专用 dGTP	根据上步用量表表选择	根据上步用量表选择	根据上步用量表选择
自备 DNA 模板	1 μL (100 ng/μL)	1 μL (10 ng/μL)	1 μL (1 ng/μL)
自备 PCR 引物(10 μM each)	1 μL each	1 μL each	1 μL each
可调易错 PCR 专用热启动 Taq DNA 聚合酶	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
可调易错 PCR 专用 $MnCl_2$	根据上步用量表表选择	根据上步用量表表选择	根据上步用量表表选择
自备超纯水	补水到 30 μL	补水到 30 μL	补水到 30 μL

注意：5×染料法实时可调易错 PCR Mix 冷冻后有沉淀，使用前可 65℃水浴加热溶解

至透明无色使用。

6. 按已经优化的常规 PCR 条件进行染料法实时易错 PCR:

PCR 前变性	94℃ 3 分钟
易错 PCR (60 次循环，但操作时 PCR 应该在荧光信号进入平台期后结束，不一定要做满 60 个循环)	94℃ 1 分钟
	60℃ 1 分钟
	72℃ 3-10 分钟。在此步采集 SYBR 通道的荧光

注：由于易错 PCR 含高浓度的 Mg^{2+}，因此容易形成引物二聚体，因此需要使用 60℃这种较高的复性温度，以避免小片段扩增产物竞争性抑制 PCR。易错 PCR 一般不需要热启动，也不需要在易错 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。但循环数过多或过少都不容易在电泳时形成清晰的 DNA 条带，没有条带就没法回收克隆。所以需要在荧光信号进入平台期后立即停止 PCR。

7. 染料法实时易错 PCR 结束后，取 3 μL 电泳检查。

8. 如果有预期大小的 PCR 产物，则用剩余的 PCR 产物进行胶回收，再进行克隆和测序等后续操作。

9. 如需要提高突变率,可以选择上轮易错 PCR 产物为模板,再进行下一轮易错 PCR。

10. 如果第一轮易错 PCR 没有得到预期大小的 PCR 产物或者扩增 60 次也没有荧光信号，可以按下列操作进行一轮追加 PCR。

11. 在 PCR 管中，加入 3 μL 10×可调易错 PCR 专用追加 dNTP 到 27 μL 电泳剩下的第一轮易错 PCR 体系中（用了 3 μL 去电泳），按下表进行追加 PCR (chasing PCR)。注意追加 PCR 只做 20 次循环。

步骤	参数	循环数
追加 PCR	94℃ 1 分钟	循环 20 次，但实际操作时，只要荧光信号进入平台期即可在 72℃结束时终止 PCR。
	60℃ 1 分钟	
	72℃ 1 分钟，在此步采集 SYBR 通道的荧光	

12. 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，可以此轮追加 PCR 的产物为模板，再进行下一轮易错 PCR。

13. 如果没有预期大小的 PCR 产物，则需要分析原因。

关联产品 易错PCR试剂盒