

天
净
沙
系
列

CAT#:100212-10
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

一管式点突变试剂盒

One-Stop Point Mutagenesis Kit

使用手册 V1.3

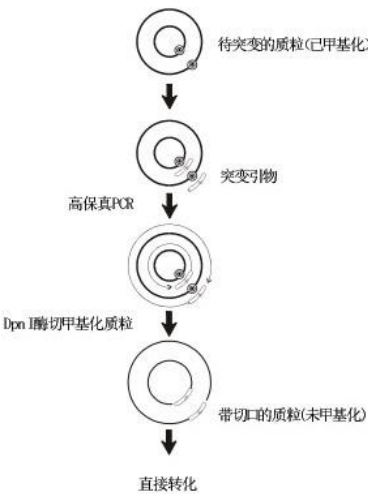
北京天恩泽基因科技有限公司

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; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

基因的定点突变是重要的分子生物学技术，广泛用于载体构建、基因改造、蛋白质功能研究等领域。但传统的方法需要使用单链 DNA 模板，而得到单链 DNA 模板又需要先将基因克隆到类似 M13 这种载体中，操作过程冗长。为了克服这些缺点，本公司将突变位点设计到一对互补的引物中，用超保真 PCR 体系扩增甲基化质粒模板，然后用 Dpn I 限制性内切酶去除原始的甲基化模板，新合成的非甲基化 DNA 通过互补形成带切口的双链质粒，直接用于转化感受态细菌。本方法过程示意图如下：



本产品具有下列特点：

- 1. 直接使用质粒 DNA 作为模板，免去了制备单链 DNA 的步骤。
- 2. 基于高保真 PCR，对模板 DNA 序列没特殊要求，可以用于突变任何序列。
同时对模板的需求量很少。
- 3. 一管式，全部在一个优化的缓冲体系中完成，非常简单。
- 4. 使用 Dpn I 去除未突变模板，突变效率高达 90%。
- 5. 可用于制备点突变，缺失突变和插入突变。
- 6. 本产品适用于 10-15 kb 的片段。

规格及成分

成 份	编 号	十孔盒包装
点突变专用 DNA 聚合酶	100212a	10 uL（红盖）
2×点突变 PCR Buffer（含 dNTP）	100212b	200 uL（绿盖）
Dpn I 限制性内切酶	100212c	10 uL（紫盖）
超纯水	100935	1 mL（亮黄盖）
使用手册	100212sc	1 份

运输及保存

低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

质粒 DNA、突变引物、细菌转化试剂

使用方法

一、 引物设计及注意事项

用于特定基因突变的引物必须用户单独设计，请参考如下一些基本原则进行设计。

- 1. 共需设计两条完全互补的一对引物，它们覆盖要扩增的突变区位点，突变位点最好放在引物的中心。可以先设计一条，然后就可得互补的另一条引物。
- 2. 引物的长度通常为 25-45 个碱基。引物中突变位点任何一侧都必需满足 Tm 大于 45℃的条件，Tm 计算方式为 $Tm=4 \times (GC \text{ 碱基数}) + 2 \times (AT \text{ 碱基数})$ 。例如引物 agtcaggccaattcgAAGcagtcgaattgccaag 就达到此标准，它的突变位点 AAG 所放位置使左侧 Tm=46；右侧 Tm=48，均大于 45℃。
- 3. 尽量把引物的 GC 含量控制在 40%-60%，结尾的 1-3 个碱基最好是 G 或 C。
- 4. 尽量使引物不要产生非常稳定的二级结构和引物二聚体。
- 5. 最好使用经过 PAGE 纯化的引物或更高纯度的引物。

二、待突变模板质粒的选择

- 6. 必须使用从 dam+ 基因型的大肠杆菌中制备得到的质粒（甲基化）用于基因定点突变 PCR 的模板，如果使用 dam- 基因型的大肠杆菌制备的质粒，由于其未甲基化，Dpn I 限制性内切酶不能把质粒 DNA 切除，这些模板质粒也能转化形成转化子，产生大量的假阳性，严重干扰后续的筛选。实验室常用的大肠杆菌大多数都是 dam+ 基因型,包括 DH5α、JM109 等,常用的 dcm- 大肠杆菌只有 DM1、INV110、JM110 等 SCS110 等少数几种。
- 7. 待突变质粒和目的基因的 GC 含量应该在 40-55%，没有任何 GC 含量超过 70%、长度在 50bp 以上的区域。如果质粒 GC 含量过高，请先把目的基因克隆到其它合适的载体上，再进行基因定点突变反应。如果目的基因 GC 含量过高，而突变位点不在高 GC 含量区域，可以先把该基因的不含高 GC 含量的一个区域克隆出来，进行定点突变，然后再把突变后的片断克隆回原基因中。如果突变位点在高 GC 区，则可以使用高 GC 专用 PCR 反应试剂。

三、 基因定点突变反应（40uL 体系）

- 8. 在一个塑料离心管中加入下列成分：

成分	加入量
待突变模板质粒	0.1-0.5 ug
2×点突变 PCR Buffer（含 dNTP）	20 uL
自备引物一和引物二（10 uM）	各 1 uL
点突变专用 DNA 聚合酶	1 uL
补自备超纯水到	40 uL

9. 放入 PCR 仪器中按下面参数进行 PCR:

步骤	温度	时间	循环数
变性	95℃	1 分钟	1 次
PCR (注: 只 18 次循环)	95℃	40 秒	18 次
	60℃	1 分钟	
	68℃	1 分钟/Kb	
延伸	72℃	10 分钟	1 次
保存	4℃	长时间保持	

四、Dpn I 限制性内切酶消化:

10. PCR 反应后, 直接在 PCR 反应体系中加入 1uL Dpn I 限制性内切酶 (该酶在甘油保存液中会下沉到管底, 故用前需要充分混匀), 混匀后 37℃ 孵育 2 小时后样品可以直接用于转化, 或者 -20℃ 保存备用。。DpnI 限制性内切酶可以酶切双链都被甲基化的模板质粒, 也能降解一条链被甲基化的双链质粒。

五、转化、挑克隆鉴定:

11. 每 100uL 感受态细菌 (转化效率必须在 $10E7$ /ug 以上) 中可以加入 5-10uL 经过 Dpn I 消化后的突变产物, 按照所使用的感受态细菌的操作方法进行操作。强烈建议使用能限制甲基化质粒的宿主菌 (mcrA+ 或 macBC+ 基因型, 如 DH5、HB101、JM109 等), 最后不要使用丢失了基于甲基化的限制性功能的宿主菌 (mcrA- 或 macBC- 基因型, 如 DH10B、INV110、SURE、Tg1、XL10-Gold), 这样只有非甲基化的突变质粒才能扩增, 可以使阳性率提高到 95% 左右。在涂板前通过离心浓缩的办法, 把所有被转化后的细菌全部涂布到含有适当抗生素的平板上培养过夜。通常会得到 50 个以下的克隆, 可按常规方法制备质粒并测序。

六、常见问题:

12. 转化后没有克隆或克隆数极少: (1) 感受态细菌效率不够高, 请检测一下感受态细胞的效率, 确保转化效率在 $10E7$ 转化子/ug。(2) 把 Dpn I 消化后的产物用常规的乙醇沉淀浓缩, 这样就可以把所有的产物全部用于转化。(3) 优化基因定点突变中的 PCR 参数。可以把最初的 95℃ 变性时间延长为 2 分钟, 循环中 95℃ 变性的时间延长至 1 分钟, 把循环中的 68℃ 的延伸时间改为 1.5 分钟/kb 至 2 分钟/kb, 退火可以改为 60-55℃ 或 65-55℃ 等的 touch down, 退火时间也可以适当延长。(4) 引物设计有问题。通过突变反应中的 PCR 没有很好地扩增出预期的突变质粒。