

版本号: KM140603

Fast Site-Directed Mutagenesis Kit

快速定点突变试剂盒

目录号: KM101

产品内容

| 产品组成 | KM101 (20 rxn) |
|---|------------------------|
| FastAlteration DNA Polymerase (2.5 U/ μ l) | 30 μ l |
| 5 \times FastAlteration Buffer | 200 μ l |
| <i>Dpn</i> I restriction enzyme (20 U/ μ l) | 20 μ l |
| 4.5 kb Control plasmid (5 ng/ μ l) | 40 μ l |
| Control primers (5 μ M, each) | 80 μ l |
| FDM competent cells | 20 \times 50 μ l |

储存条件

收到本产品后, 请立即将FDM competent cells置于-70 $^{\circ}$ C条件下保存, 试剂盒其他组分置于-20 $^{\circ}$ C条件下保存。感受态细胞-70 $^{\circ}$ C条件下保质期6个月, 试剂盒其他组分在-20 $^{\circ}$ C条件下保质期1年。

产品简介

体外定点突变技术是当前生物、医学各领域研究中的一种重要实验手段，多用于改造、优化目的基因；探索启动子的调节位点；以及研究蛋白质结构和功能之间的复杂关系。本试剂盒采用目前领先技术，可在目标载体上直接对靶基因进行单点突变，多点突变及插入或缺失突变，并且单点突变的突变率可达90%以上。另外，与以往的突变试剂盒需要多轮PCR及亚克隆等耗时耗力的步骤不同，本试剂盒的操作更为简便，从未突变菌株到突变菌株的构建只需要4步（如图1所示）。

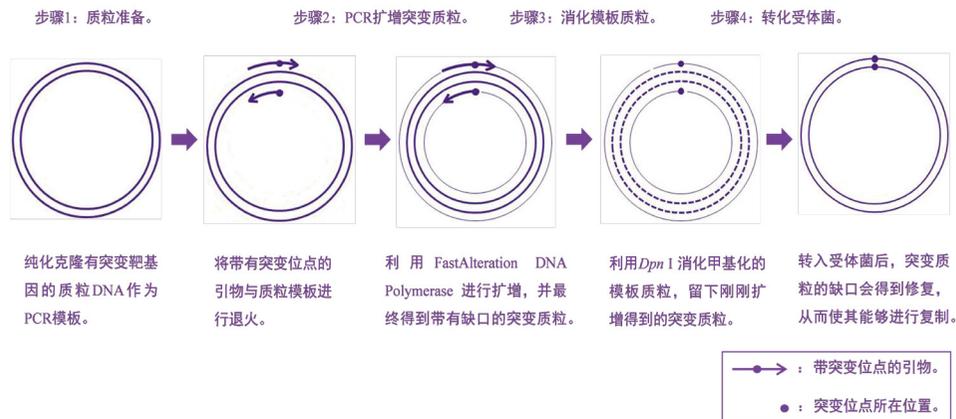


图1 TIANGEN 快速定点突变试剂盒操作流程

试剂盒提供的FastAlteration DNA Polymerase是一种快速高保真DNA聚合酶，该酶保真性能优良，灵敏度高，扩增速度可达15~30 sec/kb，并且最高可扩增长度为10 kb的质粒DNA。试剂盒附带的FDM感受态细胞具有体内降解甲基化质粒的功能，可以对未被*Dpn* I降解掉的质粒模板进行进一步的降解，因此可以保证试剂盒具有更高的阳性率。同时，本试剂盒还为客户提供了对照质粒和引物，方便客户查找实验问题。

试剂盒特点

简便快速：试剂盒采用非链取代式质粒扩增技术，只需4步即可实现由非突变菌株到突变菌株的转变，而不需要多轮PCR及亚克隆等耗时耗力的步骤。

高效引物：试剂盒采用部分重叠的引物设计原则，可以扩增得到更多的突变质粒。

应用广泛：本试剂盒不但可进行单点突变，还可以进行多点突变，且突变点数可达5个。

适应性强：本试剂盒最大可对10 kb的质粒进行定点突变，基本覆盖所有常用质粒。

突变率高：本试剂盒具有体外和体内双重消化甲基化质粒模板的功能，可以保证更高的突变率。对于单点突变而言，本试剂盒的突变率可达90%以上。

操作方法

一、建立 PCR 反应体系：

注意：以下举例仅供参考，实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异，需根据实际情况，设定最佳反应条件。

1. 将-20°C下保存的PCR反应相关试剂，突变引物及模板质粒解冻并混匀。
2. 按照下表中各组分的加入量进行反应液的配制。

反应体系：

| 组成成分 | 50 μ l 体系 | 终浓度 |
|--|---------------|------------------|
| DNA Template | 10~100 ng | — |
| 正向突变引物 (10 μ M) | 2 μ l | 400 nM |
| 反向突变引物 (10 μ M) | 2 μ l | 400 nM |
| 5 \times FastAlteration Buffer | 10 μ l | 1 \times |
| FastAlteration DNA Polymerase (2.5 U/ μ l) | 1.5 μ l | 0.075 U/ μ l |
| RNase-Free ddH ₂ O | 至50 μ l | — |

3. 按照下表体系配制对照组PCR体系。

反应体系：

| 组成成分 | 50 μ l 体系 | 终浓度 |
|--|---------------|------------------|
| 4.5 kb Control plasmid (5 ng/ μ l) | 2 μ l | 0.2 ng/ μ l |
| Control primers (5 μ M, each) | 4 μ l | 400 nM |
| 5 \times FastAlteration Buffer | 10 μ l | 1 \times |
| FastAlteration DNA Polymerase (2.5 U/ μ l) | 1.5 μ l | 0.075 U/ μ l |
| RNase-Free ddH ₂ O | 至50 μ l | — |

4. 将实验组及对照组按照如下PCR反应程序进行PCR反应。

PCR反应程序：

注：下表中PCR程序按照对照组实验条件设置，客户可根据自身实验进行相应调整。

| 阶段 | 循环 | 温度 | 时间 | 内容 |
|-------|-----|------|---------|------|
| 预变性 | 1× | 95°C | 2 min | 预变性 |
| PCR反应 | 18× | 94°C | 20 sec | 变性 |
| | | 55°C | 10 sec | 退火 |
| | | 68°C | 2.5 min | 延伸 |
| | | 68°C | 5 min | 补充延伸 |
| 补充延伸 | 1× | 68°C | 5 min | 补充延伸 |

二、质粒模板的消化

1. 按照下表所述配制酶切体系：

| 组成成分 | 51 μ l 体系 | 终浓度 |
|---|---------------|----------------|
| PCR产物 | 50 μ l | - |
| <i>Dpn</i> I restriction enzyme (20 U/ μ l) | 1.0 μ l | 0.4 U/ μ l |
| Total Volume | 51 μ l | - |

2. 充分混匀后，将上述酶切体系于37°C条件下消化1 h。

三、转化宿主菌

注：此转化流程为通用流程，可用于实验组及对照组。

1. 从-70°C冰箱中取出1支FDM感受态细胞置于冰上解冻。
2. 感受态细胞解冻后，加入5 μ l *Dpn* I 消化产物（在感受态细胞刚刚解冻时加入产物），继续冰浴30 min。
3. 42°C准确热激90 sec，立即置于冰上2 min。
4. 加入350 μ l 无菌的SOC或LB培养基（不含抗生素），混匀后置于37°C摇床振荡培养45~60 min（150转/分钟），使菌体复苏。
5. 孵育结束后，将离心管内菌液混匀，并将所有菌液涂布到含相应抗生素的LB固体琼脂培养基上，将平板置于室温直至液体被吸收，倒置平板，37°C培养12~16 h。
6. 待菌落长出后，进行突变克隆筛选。

四、根据对照组统计突变结果

试剂盒提供的对照质粒和对照引物主要用于评估试剂盒的突变率。在氨苄抗性的平板上，涂布20 μ l 0.2 M的IPTG和40 μ l 40 mg/ml的X-gal，正常情况下，对照组在上述平板上的菌落生长数应该在50个以上，且阳性突变菌株显蓝色，因为对照质粒上的*lacZ*基因是经过改造的，而成功的突变会使其回复成野生型。因此可根据菌落的颜色推断本次操作的阳性突变率，具体计算公式如下：

$$\text{突变率} = \frac{\text{呈蓝色的菌落数(cfu)}}{\text{平板上所有的菌落数(cfu)}} \times 100\%$$

注意：对于突变实验而言，需要通过测序来最终验证突变是否成功，及突变位点以外的碱基未发生改变。

常见问题及解决办法

1. 转化效率低或菌落数少

| 原因 | 解决办法 |
|------------------|---|
| 反应体系中扩增出的突变质粒量不足 | 增加转化体系的量至10 μ l。 |
| PCR反应体系中模板质粒量不足 | 将模板质粒进行琼脂糖凝胶电泳及定量分析，以确定质粒的质量和浓度是否符合试剂盒要求。 |

2. 对照组突变率低或者菌落数少

| 原因 | 解决办法 |
|----------------------------|--|
| PCR程序不适宜 | 确定PCR程序适宜对照组要求，并用确定后的程序再进行一次对照组实验以彻底排除PCR程序的影响。 |
| 扩增产物不足 | 可将PCR反应的循环数增加至25个。 |
| 感受态细胞保存不当 | 收到试剂盒以后应第一时间将感受态细胞转入-70 $^{\circ}$ C冰箱中保存，且应将感受态放于冰箱的里面而不要放在门口。 |
| X-gal和IPTG的用量不足 | 对本试剂盒而言，应在氨苄抗性的平板上，涂布20 μ l 0.2 M的IPTG和40 μ l 40 mg/ml的X-gal，才能保证阳性突变株的菌落变为蓝色。 |
| 5 \times PCR反应Buffer反复冻融 | 此Buffer中含有dNTP等容易降解的成分，反复冻融会加速这些物质的降解，因此，在实际操作中应尽量避免对5 \times PCR反应Buffer的反复冻融。 |

3. 实验组突变率低或者菌落数少

| 原因 | 解决办法 |
|----------------------------|---|
| PCR程序不适宜 | 确定PCR程序适宜实验组要求，并用确定后的程序再进行一次对照组实验以彻底排除PCR程序的影响。 |
| 反应体系混合不均匀 | 用移液器轻轻吸打将反应体系混合混匀。 |
| 加入Dpn I后未混匀充分 | 酶切阶段，加入Dpn I后一定要用移液器轻轻吸打多次以保证Dpn I与PCR体系混合均匀。 |
| 转化体系中质粒模板过剩 | 质粒模板过剩会极大的影响突变效率。若排除其他影响后，突变率仍然很低，可以考虑增加Dpn I的用量至2 μ l或延长酶切时间至1.5 h。 |
| 5 \times PCR反应Buffer反复冻融 | 此Buffer中含有dNTP等容易降解的成分，反复冻融会加速这些物质的降解，因此，在实际操作中应尽量避免对5 \times PCR反应Buffer的反复冻融。 |

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品