

版本号: KM210831

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 (1 U/ μ l)	20 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-90~-65 $^{\circ}$ C条件下保存, 试剂盒其他组分置于-30~-15 $^{\circ}$ C条件下保存。感受态细胞-90~-65 $^{\circ}$ C条件下保质期6个月, 试剂盒其他组分在-30~-15 $^{\circ}$ 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）。

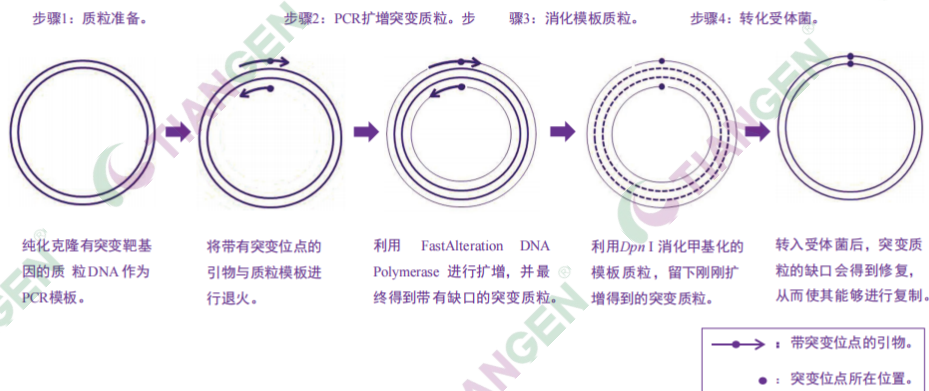


图1 TIANGEN 快速定点突变试剂盒操作流程

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，并且可扩增长度达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：本试剂盒可对长达10 kb的质粒进行定点突变，基本覆盖所有常用质粒。

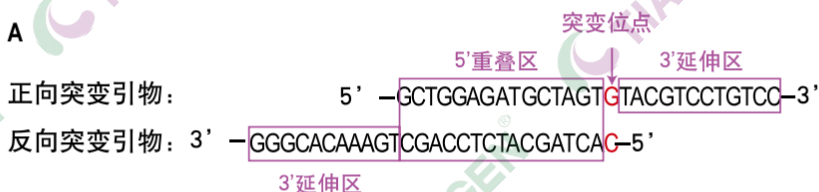
突变率高：本试剂盒具有体外和体内双重消化甲基化质粒模板的功能，可以保证更高的突变率。对于单点突变而言，本试剂盒的突变率可达90%以上。

引物设计原则

1. 两条引物上都要包含突变位点，且除突变位点以外的碱基都要与质粒模板互补配对。
2. 若引物中只有一个突变位点，则需采用图2-A的设计原则。此类引物包括5' 重叠区和3' 延伸区两部分。引物总长度大约为30 nt，其中5' 重叠区为15-20 nt，3' 延伸区至少为10 nt。突变位点在正向突变引物的重叠区以后，反向突变引物的5' 末端。
3. 若引物上含有2-5个突变位点，则需采用图2-B的设计原则。此类引物的两条序列完全互补，分为突变区和非突变区两部分。引物总长度大约为40 nt，其中突变区为15-20 nt，非突变区至少为10 nt。根据实验需求可在突变区内设计2-5个突变位点。
4. 为保证高突变率，突变引物需通过FPLC或PAGE方式纯化。
5. 突变引物T_m值的计算按下列公式进行：

$$T_m = 81.5 + 0.41(\text{GC}\%) - 675 / N - \text{mismatch}\% \quad (\text{N: 引物长度})$$

A



B



图2 TIANGEN 快速定点突变试剂盒引物设计原则

注意事项

1. 在进行单引物多位点突变时，由于增加了突变位点个数，所以突变率较单点突变时会有所降低，根据我们的实验数据，当突变位点个数达到5个时，突变阳性率会降低到50%。因此建议客户要增加验证的克隆子数。
2. 本试剂盒支持多引物多位点突变，这样可以在基因内更广泛的范围内进行突变实验。突变位点个数的上限仍然是5个。
3. 建议在进行新的突变实验时要带上试剂盒附带的对照质粒和引物，以便于对实验问题进行分析。

适用范围

本试剂盒适用于：改造优化目的基因和载体；分析启动子上与调控蛋白结合的关键位点；研究蛋白质结构和功能之间的关系。

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-30~-15°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 (1.0 U/ μ l)	1 μ l	0.02 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 (1.0 U/ μ l)	1 μ l	0.02 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-90~-65°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	收到试剂盒以后第一时间将感受态细胞转入-90~-65 $^{\circ}$ 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。



TIANGEN官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

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