

定点突变试剂盒

重组酶

包装: 20 次

存储: -20°C

概述: 定点突变试剂盒可以在质粒DNA序列的特定位点诱导突变。该试剂盒采用Robust fusion超保真DNA聚合酶, 可以诱导某个已知基因的特定碱基进行定点突变、密码子突变、插入或缺失等, 因此广泛应用于功能基因组学及蛋白组学的研究。

产品特点:

1. 操作简单, 无需特殊实验技能, 2-3天即可完成基因的定点突变。
2. 突变效率高, 由于采用Robust fusion超保真DNA聚合酶, PCR过程中引入的目标突变以外的突变可能性很小。对于10 Kb以上的质粒也可进行突变。
3. 广泛的适用范围: 可用于点突变、缺失突变和插入突变。

制品内容:

本试剂盒共可进行20次基因定点突变反应(每次反应体系50 μ l)。

组成	装量
Robust fusion DNA Polymerase	10 μ l
5 \times Robust fusion HF Buffer	0.5 ml
dNTP Mixture (10 mM each)	20 μ l
pUC19 Control Plasmid (10 ng/ μ l)	10 μ l
Control Primer 1 (10 μ M, 5' phosphorylated)	25 μ l
Control Primer 2 (10 μ M, 5' phosphorylated)	25 μ l
T4 DNA Ligase (Rapid)	20 μ l
2 \times Rapid Ligation Buffer	0.5 ml

其它所需试剂: 突变质粒; 5'磷酸化引物^a; X-Gal; IPTG以及感受态细胞。

a. 如果引物为非磷酸化引物, 需进行磷酸化处理。参见突变步骤0。

注意事项:

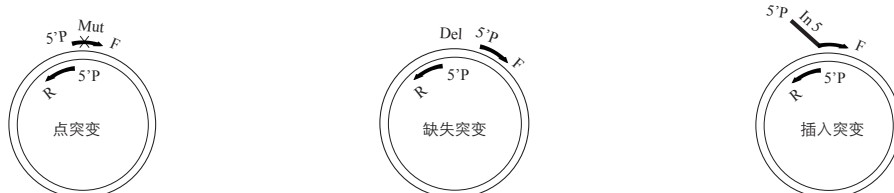
1. 待突变模板的选择:

50 μ l PCR反应体系中DNA模板的建议用量为10 pg, 可根据质粒的质量调至100 pg-1 ng。

2. 引物设计

2.1 突变引物:

设计引物时应按照常规引物设计的原则。同目标模板完全匹配的序列为24-30 bp, 突变引物的设计依赖于突变的类型, 如下图所示。



点突变: 突变位点位于一条引物的中部, 突变位点两端有10-15 bp的同目标模板完全匹配片段。

缺失突变: 突变引物位于要缺失片段的两端。

插入突变: 将要插入片段置于一条引物的5'端, 计算引物的退火温度时只选择引物中同目标模板完全匹配的部分。

2.2 引物的磷酸化:

突变的引物必须是5'端磷酸化引物, 推荐使用商业磷酸化引物, 如果为非磷酸化引物, 可以先进行引物磷酸化参见突变步骤0。

2.3 引物的质量:

在PCR扩增中, 引物的纯度, 尤其是引物的长度对突变成功率有很大的影响。比如, 引物中混入了部分5'端短缺的引物, 最终自身连接可能会缺失这几个碱基。因此, 推荐使用HPLC或PAGE纯化的引物, 对于超过40mer的引物, 推荐使用PAGE级引物。

2.4 退火温度:

当使用Robust fusion DNA聚合酶时, 引物的T_m需要采用nearest-neighbor方法来计算, 使用nearest-neighbor方法计算引物退火温度的网页工具有: NEB的T_m calculator(选择Product group参数为Phusion): <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator> Thermo Scientific的T_m calculator: <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>。

定点突变试剂盒

Robust fusion DNA聚合酶具有稳定引物和模板杂交的性能，当引物长度大于20 nt时，退火温度在最低T_m的基础上以T_m+3°C退火10-30 s；当引物长度小于或等于20 nt时，退火温度为引物最低的T_m。在进行引物设计时，应使退火温度控制在65°C-72°C之间，当退火温度接近72°C，可以采用两步法进行PCR。

3. 突变对照实验：

试剂盒中提供对照质粒为pUC19，通过它可以判断实验的成功与否。pUC19质粒包含lacZ基因，用试剂盒中的对照引物诱导pUC19中丝氨酸(TCG)突变为终止密码子(TAG)，这样会导致lacZ基因失活，因此LB平板上的白色克隆是突变成功的克隆。对于首次做突变实验的用户，可以通过对照反应观察是否成功。

突变步骤：

0. 引物磷酸化（非必需，只有当引物为非磷酸化时才需要此步骤）：

如果PCR过程中使用的是非磷酸化引物，先进行引物的磷酸化(推荐使用天津强微特生物科技有限公司的T4的多聚核苷酸激酶，#M0101)，具体过程如下：

0.1 在微量离心管中制备下列反应混合物：

- 250 pmol 待磷酸化引物，
- 5 μl 10× T4多聚核苷酸激酶缓冲液，
- 5 μl 10 mM ATP，
- 2 μl T4 PNK(10 U/μl)，
- 加水至50 μl。

0.2 37°C温育30分钟。

0.3 75°C灭活10分钟。

0.4 反应产物-20°C保存或直接用于后续突变反应。

1. PCR反应体系的建立：

50 μl反应体系，置于冰上操作。

突变样品反应体系

成份	50 μl反应体系	终浓度
5× Robust fusion HF缓冲液	10 μl	1×
10 mM dNTPs	1 μl	各200 μM
10 μM正向引物	2.5 μl	0.5 μM
10 μM反向引物	2.5 μl	0.5 μM
模板DNA ^b	适量	
水	适量	
Robust fusion DNA聚合酶	0.5 μl	1 U/50 μl

突变对照反应体系

成份	50 μl反应体系	终浓度
5× Robust fusion HF缓冲液	10 μl	1×
10 mM dNTPs	1 μl	各200 μM
10 μM正向对照引物	2.5 μl	0.5 μM
10 μM反向对照引物	2.5 μl	0.5 μM
模板DNA ^b	适量	20 pg
水	适量	
Robust fusion DNA聚合酶	0.5 μl	1 U/50 μl

b. 对于GC含量高的复杂模板，可以加入2%-8%的DMSO等添加剂以提高反应效率。

2. PCR循环：

Robust fusion DNA聚合酶PCR循环的变性(98°C)和退火温度较高，有别于常见的PCR循环，在使用时请注意。

定点突变试剂盒

循环步骤	温度	时间	循环数
初始变性	98°C	30 s	1
变性	98°C	5-10 s	25
退火	45-72°C	10-30 s	
延伸	72°C	15-30 s/kb	
终延伸	72°C	5-10 min	1

当引物的退火温度 $\geq 72^{\circ}\text{C}$ 时建议使用两步法进行PCR扩增。常规的两步法PCR热循环条件如下：

循环步骤	温度	时间	循环数
初始变性	98°C	30 s	1
变性	98°C	5-10 s	25
延伸	72°C	15-30 s/kb	
终延伸	72°C	5-10 min	1

3. 连接转化

3.1 在微量离心管中制备以下连接反应液

成份	20 μl 反应体系	10 μl 反应体系
2 \times 反应缓冲液	10 μl	5 μl
DNA片段 ^c	适量	适量
载体DNA ^c	适量	适量
快速T4 DNA 连接酶	1-2 μl	0.5-1 μl
水	补充至20 μl	补充至10 μl

c. DNA片段的摩尔数应控制在载体DNA摩尔数的3-10倍。

3.2 连接反应条件：25°C连接5分钟。

3.3 取2 μl 连接产物转化至100 μl 感受态细胞中。

4. 突变质粒测序结果分析

参考文献：

1. Nord K. et al. (1997) *Nature Biotechnol* 15:772-777.
2. Wikman M. et al. (2004) *Protein Eng Des Sel* 17:455-462.
3. Frey M. & Suppmann B. (1995) *Biochemica* 2:34-35.