

QuickMutation™ Plus基因定点突变试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0208S	QuickMutation™ Plus基因定点突变试剂盒	10次
D0208M	QuickMutation™ Plus基因定点突变试剂盒	50次

产品简介:

- 碧云天生产的QuickMutation™ Plus基因定点突变试剂盒(QuickMutation™ Plus Site-Directed Mutagenesis Kit)可以快速完成质粒特别是超大质粒(10-35kb)的点突变(point mutation)、多个邻近密码子的突变、单个或多个邻近密码子的缺失(deletion)或插入(insertion)突变。
- 基因定点突变常用于研究基因的转录调控、RNA或蛋白质的结构和功能,以及用于质粒中部分序列的微调等。
- 本试剂盒利用了目前最常用的基因点突变技术,只需通过基于PCR的突变质粒的生成,和基于DpnI的模板质粒的消化,转化培养以及后续的酶切或测序鉴定,即可得到预期的突变质粒(参考图1)。DpnI消化仅需5分钟,累计操作时间约2-3小时即可完成基因的定点突变。
- 本试剂盒使用了最新的保真性更强,灵敏度更高,扩增速度可达2kb/min,扩增长度可达35kb的BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase,从而大大缩短了突变反应所需的时间,进一步提高了基因定点突变的成功率。同时进一步严格验证了试剂盒中的DpnI,确保能在5分钟内充分消化掉甲基化的模板质粒,同时不会消化未甲基化的PCR产物。
- 参考图1,使用本试剂盒时需要先设计长度通常为25-45个碱基互补的两个引物,在引物中含有预期的突变位点。然后以待突变的质粒为模板,用这两个引物进行PCR扩增反应。这样可以产生含有预期的突变位点的双链质粒,但这个双链质粒中有两个nick位点。待突变的质粒通常来源于DH5α等*dam*⁺大肠杆菌,在这些*dam*⁺细菌中质粒会被甲基化修饰,而在体外通过PCR扩增得到的质粒不会被甲基化。这样用特异性识别甲基化位点的酶DpnI处理,可以消化掉待突变的质粒模板,而使通过PCR扩增出来的含有突变位点的质粒被选择性地保留下来。随后把DpnI处理过的产物转化感受态细菌后,突变质粒中的两个nick位点可以被大肠杆菌修复,得到的克隆就会含有预期的突变质粒了。
- 本试剂盒提供了DH5α甘油菌,可用于感受态细菌的制备。
- 经检测,本试剂盒可对长达14kb的模板质粒完成定点突变PCR扩增(图2):

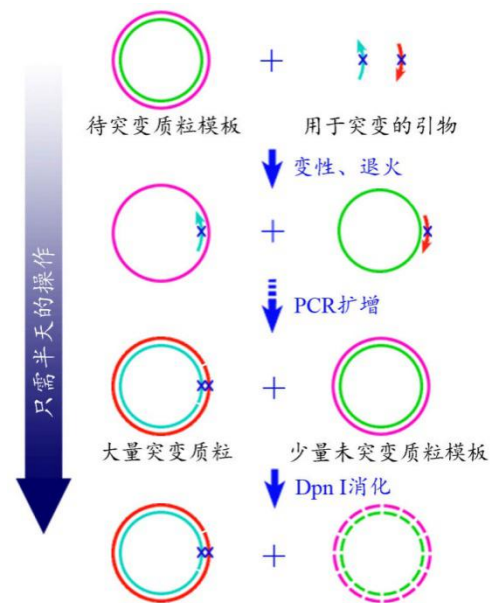


图1. 基因定点突变试剂盒原理图

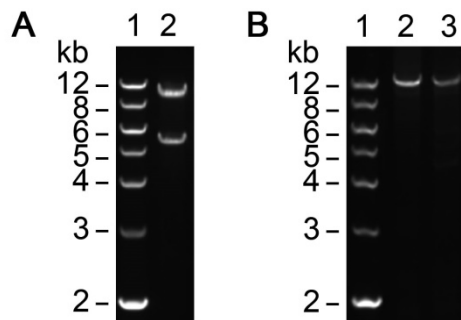


图2. 使用本试剂盒对pcDNA3.1-SRCAP(14566bp)质粒进行点突变时的PCR及PCR酶切后的电泳效果图。图A. pcDNA3.1-SRCAP质粒大小的酶切鉴定电泳图。XbaI酶切后产生两条带,一条带为9173bp,另一条带为5393bp。图B. pcDNA3.1-SRCAP点突变PCR后DpnI消化前后的质粒电泳图。1. DNA ladder (D0110); 2. DpnI消化前的PCR产物, 3. DpnI消化后的PCR产物。

- 本试剂盒使用pcDNA3.1-SRCAP(14566bp)质粒进行了点突变测试,实测突变率接近100%(参考图3)。实际进行点突变时,可能会因为突变引物的设计、模板使用量、感受态效率等因素出现不同的突变率。

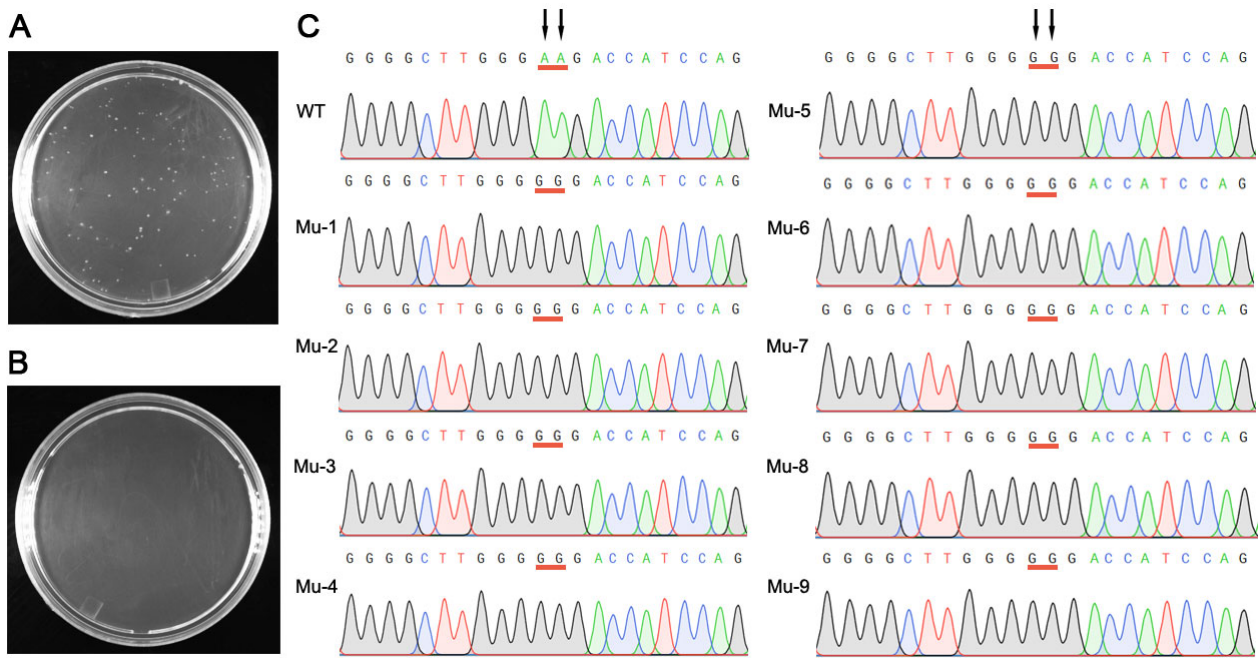


图3. 本试剂盒对pcDNA3.1-SRCAP(14566bp)质粒进行点突变的实际效果图。A. 使用本试剂盒进行点突变获得的LB平板照片。以pcDNA3.1-SRCAP质粒为模板, 使用本试剂盒进行PCR扩增以实现点突变, DpnI 37°C消化5min, 取10μl产物转化100μl DH5α感受态, 涂板后37°C培养过夜所获得的LB平板照片。B. 阴性对照LB平板照片。与A相比没有添加BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase, 这样模板质粒完全被DpnI酶所消化, 没有任何的假阳性克隆产生。C. 突变前后的测序图。突变前的测序结果(WT, wild type)和从图A中挑取9个克隆的测序结果(Mu, mutant)。箭头所示为拟突变的两个位点, 红色下划线的为突变前和突变后的碱基。本次实验的突变率达到了100%。

➤ 本试剂盒小包装D0208S和中包装D0208M分别可以进行十次和五十次基因定点突变反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0208S-1	BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	10μl
D0208S-2	10X BeyoAmp™ Buffer (with Mg ²⁺)	100μl
D0208S-3	dNTP Mix (2.5mM each)	50μl
D0208S-4	DpnI	10μl
D0208S-5	DH5α甘油菌	200μl
D0208S-6	Nuclease-Free Water	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0208M-1	BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	50μl
D0208M-2	10X BeyoAmp™ Buffer (with Mg ²⁺)	500μl
D0208M-3	dNTP Mix (2.5mM each)	250μl
D0208M-4	DpnI	50μl
D0208M-5	DH5α甘油菌	200μl
D0208M-6	Nuclease-Free Water	5ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。

注意事项:

- 需自行配制LB液体培养基和LB平板以用于细菌的培养。
- 需自行设计和合成用于基因定点突变的引物。需自备用于细菌转化的试剂。
- 使用本试剂盒前请先阅读后面的常见问题。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 引物设计:

用于特定基因突变的引物需要单独设计, 请参考如下一些基本原则进行设计:

- 共需设计两条互补的引物。可以先集中设计一条, 然后就可以得到互补的另一条引物。
- 引物的长度通常为25-45个碱基。
- 利用如下公式进行引物 Tm 值的估算, 通常 Tm 值应该不低于78°C。

$$Tm = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N) - \%mismatch$$

N表示引物所含碱基总数

%GC表示引物中GC碱基数占引物总碱基数的百分值, 例如GC含量为50%, 那么%GC就是50。

%mismatch表示引物中突变碱基数占引物总碱基数的百分值, 例如错配率是2.5%, 那么%mismatch就是2.5。

例一: 对于模板序列5'-CCAATTTTCGAGGAATTAGAACCTTATTTTGAACCTACTGAAGG-3', 其中带有灰色阴影的A为待突变位点, 需要突变为C, 设计正向突变引物如下:

5'-CCAATTTTCGAGGAATTAGCACCTTATTTTGAACCTACTGAAGG-3'

$$Tm = 81.5 + 0.41 * (15/43) * 100 - (675/43) - (1/43) * 100 = 77.8$$

例二: 对于模板序列5'-GGGAGCTCACCAAGCTGAAGAGCACCTACATTGA-3', 其中两个有灰色阴影的A为待突变位点, 均需要突变为G, 设计正向突变引物如下:

5'-GGGAGCTCACCAGGCTGAGGAGCACCTACATTGA-3'

$$Tm = 81.5 + 0.41 * (20/34) * 100 - (675/34) - (2/34) * 100 = 79.9$$

对于插入、缺失型的突变引物, 推荐利用如下公式进行引物 Tm 值的估算:

$$Tm = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N)$$

此公式中, N不包含插入或缺失的碱基。因为如果N包含插入或缺失的碱基, 数字可能会比较大, 从而影响计算结果。

- 也可以利用如下公式进行引物设计。

引物中突变位点任何一侧都必需满足 $4 * (\text{GC碱基数}) + 2 * (\text{AT碱基数}) \geq 45$ 。但引物也不宜过长, 否则通常会形成非常稳定的二级结构。通常把突变位点两侧的碱基数控制在15个左右, 且使两侧按照上述计算得到的数值相近。

例如引物为AGTCAGGCCAATTCGAAGCAGTCGAATTGCCAAG, 其中有灰色阴影的AAG为突变位点, 则

$$\text{左侧: } 4 * (\text{GC碱基数}) + 2 * (\text{AT碱基数}) = 4 * 8 + 2 * 7 = 46 \geq 45$$

$$\text{右侧: } 4 * (\text{GC碱基数}) + 2 * (\text{AT碱基数}) = 4 * 8 + 2 * 8 = 48 \geq 45$$

- 上述c和d这两种方法的计算标准有较明显的差异, 但经过多次测试, 两种方法都可以顺利获得预期的突变。
- 在可能的情况下, 尽量把引物的GC含量控制在40-60%。
- 在可能的情况下, 尽量使引物不要产生非常稳定的二级结构和引物二聚体。二级结构和二聚体可通过一些软件进行分析。
- 最好使用经过PAGE纯化的引物或更高纯度的引物。

2. 引物的配制:

如果合成得到的一个引物A的量是20nmol, 另外一个互补引物B的量是19nmol。在引物A中加入200 μ l水, 配制成浓度为100 μ M, 在引物B中加入190 μ l水也配制成浓度为100 μ M。吸取20 μ l 100 μ M引物A和20 μ l 100 μ M引物B到一新的离心管中, 再加入160 μ l水, 混匀后即可得到可以直接用于基因定点突变反应的引物(10 μ M each)。

3. 待突变模板质粒的选择:

选择GC含量在40-55%的待突变模板质粒, 并且每一个50bp左右的局部GC含量最好也不超过70%。如果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。另外目的基因GC含量最好也在40-55%的范围, 并且每一个50bp左右的局部GC含量最好也不超过70%。如果目的基因GC含量过高, 而突变位点不在高GC含量区域, 可以先将该基因的不含高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段克隆回原基因中。如果必需使用高GC含量的质粒模板, 或者有局部高GC含量的质粒模板, 请另外使用专门用于高GC含量模板的PCR反应试剂。

必须使用从 *dam*⁻ 的大肠杆菌(这类菌中质粒可以被甲基化)中抽提得到的质粒用于基因定点突变。常用的大部分大肠杆菌都是 *dam*⁻ 的, 包括DH5 α 、JM109等。

4. 基因定点突变反应:

- 如下设置基因定点突变反应体系:

试剂	扩增片段小于6kb		扩增片段大于6kb	
	最终浓度	体积	最终浓度	体积
Nuclease-Free Water	-	? μ l	-	? μ l
10X BeyoAmp™ Buffer (with Mg ²⁺)	1X	5 μ l	1X	5 μ l
引物混合物(10 μ M each)	0.4 μ M each	2 μ l	0.8 μ M each	4 μ l
dNTP mix (2.5mM each)	0.25mM each	5 μ l	0.5mM each	10 μ l
待突变模板质粒	200ng	? μ l	200ng	? μ l
BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	1/50	1 μ l	1/50	1 μ l
总体积	-	50 μ l	-	50 μ l

按照上面的顺序依次加入各种试剂。在上述反应体系中, 根据待突变模板质粒的量, 计算出需加入的Nuclease-Free Water的量, 使总体积为49 μ l。适当混匀后, 加入1 μ l BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase, 混匀。如果用的PCR仪没有热盖,

在反应体系上加入一滴矿物油(mineral oil)以防止蒸发。

b. 按照如下参数设置PCR仪:

步骤	循环数	温度	时间	说明
1	1	95°C	3min	最初变性
2	20	95°C	30sec	变性
		55°C	30sec	退火
		68°C	30sec/kb	延伸
3	1	68°C	10min	延伸、补全
4	1	4°C	长时间保持	暂时存放

说明: 上面表格中30sec/kb表示, 如果待突变的质粒为14kb, 那么68°C的延伸时间为7分钟。

5. DpnI消化:

PCR反应后, 直接在PCR反应体系中加入1 μ l DpnI, 混匀后37°C孵育5min。37°C孵育可以在PCR仪上进行, 也可以在水浴锅中进行。DpnI消化完后可以直接用于转化, 或者-20°C保存备用。

6. 转化、挑克隆鉴定:

感受态细菌的转化效率必需至少在 10^7 以上, 否则很难得到克隆。根据所使用的感受态细菌, 加入尽量多的经过DpnI消化后的突变产物用于转化。通常每100 μ l感受态细菌中可以加入5-10 μ l经过DpnI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, 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100个以下的克隆。如果发现上千个克隆, 那么通常是有什么地方出了问题。

对于得到的克隆, 可以挑取3-5个克隆送样测序, 以确认得到的克隆是否是预期的突变克隆。通常大部分的是预期的突变克隆。但有时也可能会因为随机因素, 会测序了3-5个克隆才得到一个预期的突变克隆。

常见问题:

1. 转化后没有克隆或克隆数极少:

- 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 10^7 以上, 当然高一些更好。
- 把DpnI消化后的产物用常规的乙醇沉淀方法进行沉淀, 然后溶解在较小的体积中。这样就可以把所有的产物全部用于转化。
- 优化基因定点突变中的PCR参数。可以把最初的95°C变性时间延长为5min, 循环中95°C变性的时间延长至1min, 把循环中的68°C的延伸时间改为1min/kb至2min/kb, 退火可以改为60-55°C或65-55°C等的touch down, 退火时间也可以适当延长。
- 引物设计有问题。通过突变反应中的PCR没有很好地扩出预期的突变质粒。
- 如果使用矿物油(mineral oil), 在转化时如果把矿物油带入感受态菌, 会严重影响转化效率。

2. 有克隆, 但没有或很难检测到预期的突变克隆:

- DpnI消化效果不佳。一种可能是加入DpnI后, 由于该酶在甘油中, 会迅速下沉, 如果没有混匀就会严重影响DpnI的消化作用。另一种可能是DpnI由于保存不当或保存时间过长等原因导致活性下降, 这时可以适当延长消化的时间至1-2小时。
- 使用的待突变的模板质粒量过多, 导致DpnI消化时不完全。我们这里推荐的模板质粒用量0.5 μ g, 已经是模板质粒用量的上限, 不能再使用更多的模板质粒了。
- 尽量避免多次反复冻融dNTP。可以把dNTP适当分装后再使用。

3. 有突变克隆, 但突变位点不是预期的位点:

- 引物设计不佳, 并且PCR反应中退火温度过低, 导致引物退火到错误的地方。
- 引物质量较差, 没有经过PAGE纯化。这样引物中通常会含有比设计的引物要短的特异性较差的引物, 容易导致非预期的突变。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0206S	QuickMutation™ 基因定点突变试剂盒	10次
D0206M	QuickMutation™ 基因定点突变试剂盒	50次
D0208S	QuickMutation™ Plus基因定点突变试剂盒	10次
D0208M	QuickMutation™ Plus基因定点突变试剂盒	50次
D0219S	QuickMutation™ 基因随机突变试剂盒	50次
D0219M	QuickMutation™ 基因随机突变试剂盒	200次
D6257	DpnI	500U
D6258	DpnI	2500U

Version 2022.04.15