

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):

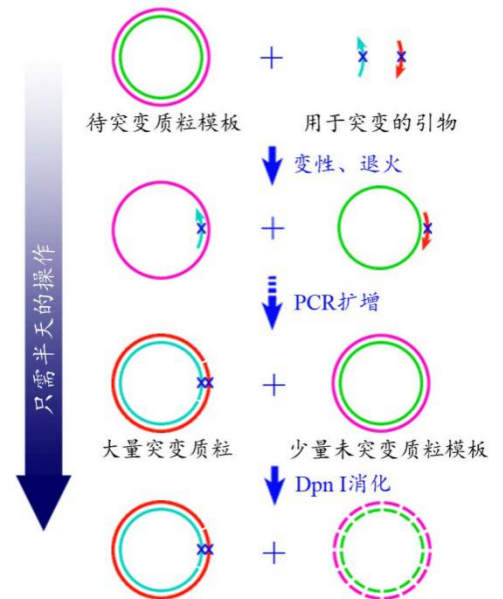


图1. 基因定点突变试剂盒原理图

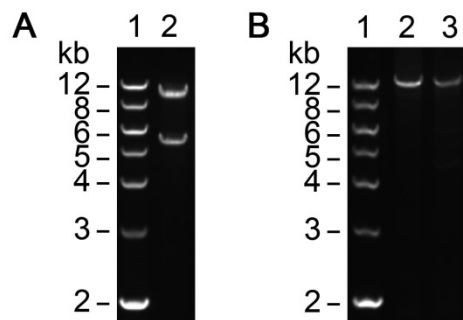


图2. 使用本试剂盒对pcDNA3.1-SRCAP(14566bp)质粒进行点突变时的PCR及PCR酶切后的电泳效果图。图A. pcDNA3.1-SRCAP质粒大小的酶切鉴定电泳图。XbaI酶切后产生两条带, 一条带为9173bp, 另一条带为5393bp。图B. pcDNA3.1-SRCAP点突变PCR后DpnI消化前后的质粒电泳图。1. DNA ladder (D0110); 2. DpnI消化前的PCR产物, 3. DpnI消化后的PCR产物。

- 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。

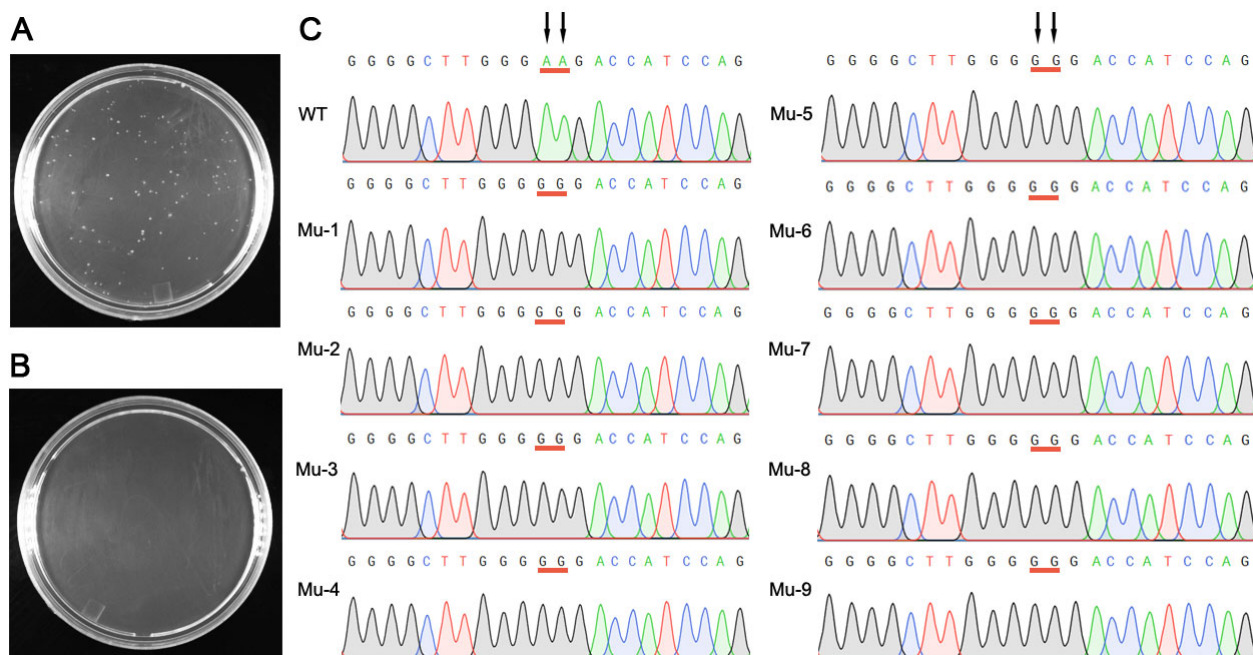


图3. 本试剂盒对pcDNA3.1-SRCAP(14566bp)质粒进行点突变的实际效果图。A. 使用本试剂盒进行点突变获得的LB平板照片。以pcDNA3.1-SRCAP质粒为模板, 使用本试剂盒进行PCR扩增以实现点突变, DpnI 37°C消化5min, 取10μl产物转化100μl DH5α感受态, 涂板后37°C培养过夜所获得的LB平板照片。B. 阴性对照LB平板照片。与A相比没有添加BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase, 这样模板质粒完全被DpnI酶所消化, 没有任何的假阳性克隆产生。C. 突变前后的测序图。突变前的测序结果(WT, wild type)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 T_m 值的估算，通常 T_m 值应该不低于78°C。

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

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'-CCAATTTTCGAGGAATTAGACCTTATTTTGAAGCTTACTGAAGG-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'-CCAATTTTCGAGGAATTAGACCTTATTTTGAAGCTTACTGAAGG-3'

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

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'-GGGAGCTCACCAAGCTGAAGAGCACCTACATTGA-3'

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

对于插入、缺失型的突变引物，推荐利用如下公式进行引物 T_m 值的估算：

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

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AGTCAGCCAATTCGAAGCAGTCGAATTGCCAAG，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200μl水，配制成浓度为100μM，在引物B中加入190μl水也配制成浓度为100μM。吸取20μl 100μM引物A和20μl 100μM引物B到一新的离心管中，再加入160μl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(10μM 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DH5α、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	-	?μl	-	?μl
10X BeyoAmp™ Buffer (with Mg ²⁺)	1X	5μl	1X	5μl
引物混合物(10μM each)	0.4μM each	2μl	0.8μM each	4μl
dNTP mix (2.5mM each)	0.25mM each	5μl	0.5mM each	10μl
待突变模板质粒	200ng	?μl	200ng	?μl
BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	1/50	1μl	1/50	1μl
总体积	-	50μl	-	50μl

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消化完毕后可以用于转化,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操作,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没有很好地扩增出预期的突变质粒。
- 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质量过多,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