

单点突变试剂盒 1.0

本公司有多种零背景即用型线性化质粒

单点突变试剂盒 1.0	GM01A	10 次
	GM01B	20 次
	GM01C	50 次

保存条件:

-20° C 保存。

可于-20~0° C 运输。

使用过程中避免反复冻融。

产品组成:

组分	GM01A	GM01B	GM01C
2×PCR Mix	250 μl	500 μl	1250 μl
5 ×点突变 Buffer	40 μl	80 μl	200ul
重组酶	20 ul	40 ul	100ul
突变线性质粒 DNA	10ul	20ul	50ul

特点

突变成功率极高，不低于 95%

适用范围

DNA 定点突变，包括碱基插入、碱基 deletion、碱基变换等。

产品说明

本试剂盒可以在质粒 DNA 序列中任意位点引入特定的定突变，包括碱基插入、碱基 deletion、碱基变换等。

首先用高保真 DNA 聚合酶与带有突变碱基的引物，PCR 扩增野生型质粒，将质粒线性化并引入突变位点，然后用重组酶将质粒重组成环状质粒。扩增质粒的一对引物各自 5'末端的 15-20 个碱基互补配对，用于重组环化质粒。将带有突变碱基的线性化质粒 PCR 产物在重组酶作用下，50 度反应 15-30 min 环化质粒，然后进行 DH5a 转化，完成基因定点突变。

本公司单点突变试剂盒 1.0 含有高保真 DNA 聚合酶 2XPCR Mix、点突变 buffer、重组酶，可以从头到尾完成整个实验，极大的方便了实验操作。

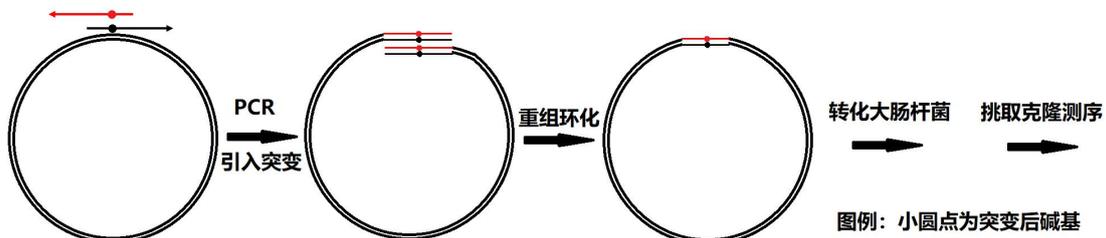


图 1 单一位点基因点突变原理图

自备材料

订货网址: <http://www.angmeibio.com>

订货热线: 4006609586

- ◆ 突变引物、野生型质粒模板、高保真聚合酶（本公司有售无聚合酶的点突变试剂盒，需自备高保真 DNA 聚合酶）；
- ◆ 化学感受态细胞：
 - DH5a Competent cell 常规克隆，适用于 <15 kb 质粒；
 - XL 10 Competent cell 大片段克隆，适用于 > 10 kb 质粒；

其他材料：ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

实验流程概要

- 质粒线性化：通过反向 PCR 获得带突变碱基的线性化质粒。
- 野生型质粒模板的去除：限制性内切酶 DpnI 消化去除野生型质粒。
- 重组环化反应：将线性化质粒，在重组酶催化下，50° C 反应 15-30 min 即可完成重组环化反应，实现线性化质粒的体外环化。
- 转化感受态细胞：重组环化产物直接进行转化，取转化物涂布平板，培养后平板上会形成数百个单克隆，随机挑取克隆，抽提质粒测序验证是否突变成功。

实验步骤

1. 设计突变引物

引物设计总原则：在正反向扩增引物的 5' 端引入末端互补同源序列，使扩增后的线性化质粒两末端带有 15-20 个碱基的同源序列，用于重组环化质粒。

- 正向扩增引物设计原则：5'-末端同源序列+突变位点+目标序列特异性正向配对序列-3'
- 反向扩增引物设计原则：5'-末端同源序列+突变位点+目标序列特异性反向配对序列-3'
- 正 / 反向扩增引物与质粒模板的特异性配对序列 Tm 值 55-65 °C 为佳，末端同源区 GC 含量 40-60% 为佳，长度为 15-20 个碱基（一般情况同源区 15 个碱基足以）。
- 如果最终引物长度超过 40 bp，推荐引物合成时选用 PAGE 纯化，有助于提高 PCR 与点突变成功率。

插入片段引物设计可参照以下实例：

野生型质粒原始序列↵

```
5' .....TGACCATGATTACGAATTCAGCAGCGCGCTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCC.....↵
3' .....ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCGCCGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....↵
↵
```

1. 碱基突变↵

```
5' .....TGACCATGATTACGAATTCAGCAGCTGCCTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCC.....↵
3' .....ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCGACGGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....↵
↵
```

正向引物 5' **CCAGCAGCTGCCTGGTCA**TATGAAAGTAC↵

反向引物 5' TGAC**CCAGCA**GCTGCTGAATTCGTAATCA↵

↵

2. 碱基 deletion ↵

```
5' .....TGACCATGATTACGAATTCAGCAGGGGGTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCC.....↵
3' .....ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCGGGGACCGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....↵
↵
```

正向引物 5' **AATTCAGCTGGTCATATGAAAGTACTTC**↵

反向引物 5' **ATATGACCAGCTGGAATTCGTAATCATGG**↵

↵

3. 碱基插入↵

```
5' .....TGACCATGATTACGAATTCAGCAGCagtcTGCCTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCC.....↵
3' .....ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCtcagACCGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....↵
↵
```

正向引物 5' **CAGCAGCagtc**TGCCTGGTCATATGAAAGTAC↵

反向引物 5' **CCAGCAgaact**GCTGCTGAATTCGTAATCA↵

红色碱基为突变碱基，黄色序列为互补同源序列↵

方框内碱基为突变引物的质粒模板互补配对区↵

2. 反向 PCR 扩增线性化质粒，并引入突变碱基

订货网址：<http://www.angmeibio.com>

订货热线：4006609586

为了防止突变位点之外的碱基额外突变，确保使用高保真聚合酶进行反向 PCR。50ul 的 PCR 体系中，推荐使用 1-5ng 环状质粒模板。另外利用限制性内切酶 DpnI 对 PCR 产物进行处理，可以特异性去除野生型环状质粒模板，只保留 PCR 扩增的突变后线性化质粒，降低转化后野生型质粒形成的克隆数。本公司有售高保真聚合酶与 DpnI 限制性内切酶，详见公司网站

3. 重组环化反应的线性化质粒使用量

最适线性化质粒使用量为 0.03-0.09pmol（线性化质粒的使用量应在 50-200 ng 之间）。可由以下公式粗略计算对应摩尔数的线性化质粒 DNA 纳克数。

最适质粒使用量(0.03 pmol) = [0.02x 质粒碱基对数] ng

最适质粒使用量(0.06 pmol) = [0.04x 质粒碱基对数] ng

最适质粒使用量(0.09 pmol) = [0.06x 质粒碱基对数] ng

例如，长度为 5 kb 的质粒时，若质粒的最适使用量为 0.03pmol，折算成质量为：0.02 X 5000 = 100 ng。

4. 重组反应环化突变质粒

(1) 根据公式计算重组反应所需线性化质粒 DNA 量。

若线性化质粒浓度过高，为了确保加样的准确性，可做适当稀释，在配制重组反应体系时使各组分加样量不低于 1 ul。

(2) 于冰上配制以下反应体系：

组分	重组反应	阴性对照 ^a	阳性对照 ^b
线性化质粒	X μl	X μl	1 μl
5×点突变 Buffer	4 μl	0 μl	4 μl
重组酶	2 μl	0 μl	2 μl
ddH ₂ O	to 20 μl	to 20 μl	to 20 μl

a. 用来确认野生型环状质粒残留，推荐进行。

b. 突变线性质粒 DNA 阳性对照反应可用来排除其他实验材料及操作因素的影响。

(3) 轻柔混匀后，在 50℃ 反应 15-30 min，降至 4℃ 或立即置于冰上冷却。

- ◆ 推荐在 PCR 仪等温控比较精确的仪器上进行反应，重组环化效率在反应 15-30 min 左右达到最高，反应时间不足或者太长都将会降低克隆效率。
- ◆ 重组环化产物可于 -20℃ 存放 1 个月，待需要时解冻转化即可。

5. 环化质粒重组产物转化

- ◆ 在冰上解冻克隆感受态细胞，冰上放置 15min
- ◆ 取 5-10ul 重组环化产物加入到 50ul 感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置 15-20 min。重组产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的 1/5；
- ◆ 42℃ 水浴热激 1-2min 后，立即置于冰上冷却 1-2 min。
- ◆ 加入 450 μl SOC 或 LB 培养基(不添加抗生素)，37℃ 摇菌 30min-1h (转速 200 - 250 rpm)。
- ◆ 将相应抗性的 LB 平板固体培养基在 37℃ 培养箱中预热 30min (可省略)。
- ◆ 直接吸取 30-100ul 菌液到含有正确抗性的平板上，用无菌涂布棒涂匀。
- ◆ 37℃ 培养箱中倒置培养 12 - 16 h。

6. 点突变测序鉴定

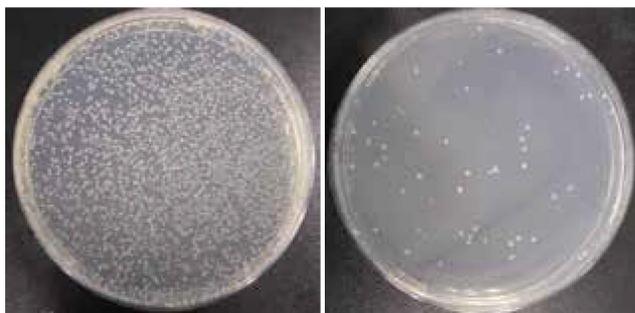
- ◆ 过夜培养后，重组环化反应转化平板上形成数百个单克隆，而不加重重组酶的阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者。
- ◆ 挑取重组反应转化平板上 2-3 个克隆进行 DNA 序列测定，验证是否突变成功。

注意事项

订货网址：<http://www.angmeibio.com>

订货热线：4006609586

- ◆ 重组产物冰上冷却后，可直接转化化学感受态细胞，进行转化时，重组产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的 1/5。
- ◆ 反向 PCR 扩增的 PCR 产物电泳条带单一，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。



重组反应转化板

阴性对照转化板

图3 突变组与阴性对照组菌落数

常见问题与解决方案

◆ 平板上未长出克隆或克隆数目很少。

1. 引物设计不正确：确保引物包含 15-20 bp 同源臂，GC 含量 40-60%。
2. 质粒片段中的其它组分抑制重组环化反应：未纯化 DNA 使用体积不应超过 4ul（即反应体系体积的 1/5，最高不超过 1/3）；建议线性化质粒进行凝胶回收纯化，纯化产物溶解在 ddH₂O 中。
3. 感受态细胞效率低：感受态细胞的转化效率需大于 10⁷ cfu/μg。可进行简单检测，转化 1 ng 质粒，取 1/10 进行涂板，生长 1000 个菌斑，估算转化效率为 10⁷ cfu/μg；重组产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的 1/10，否则会降低转化效率；需尽量选择克隆用感受态细胞（如 DH5a、XL10、Top10 等），不能选择表达感受态细胞（某些表达感受态会大大降低质粒转化成功率）。

◆ 突变失败，多数克隆为野生型质粒或错误突变

1. PCR 产物错误，没有与突变位点序列配对，或与突变位点之外的序列配对。
2. 野生型质粒去除不完全：可通过不加重重组酶的阴性对照检测野生型环状质粒是否去除完全。**强烈建议利用限制性内切酶 DpnI 处理 PCR 产物，去除野生型质粒模板。**
3. 碱基突变成功，但多了几段引物配对区（突变位点的地方插入了不只一段突变序列）。原因可能是形成了引物二聚体，而且该引物二聚体做引物扩增出了线性化质粒。可以多挑几个克隆测序；也可以重新设计引物，去除可能形成引物二聚体的序列。