

多位点突变试剂盒

本公司有多种零背景即用型线性化载体

单片段重组克隆试剂盒	GA02A	10次
	GA02B	20次
	GA02C	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	GA02A	GA02B	GA02C
5×多位点突变 Buffer	40 μl	80 μl	200ul
重组酶	20 ul	40 ul	100ul
1kb control insert 混合物 (20 ng/μl×3)	5 μl	5 μl	5ul
linearized control vector (50 ng/μl, Amp ^r)	5 μl	5 μl	5ul
2×PCR Mix	600 μl	1200 μl	3ml

特点

多个位点的一次性突变成功

最多可以同时做 7 个位点的点突变

适用范围

- ◇DNA 多位点定点突变
- ◇快速克隆
- ◇高通量克隆
- ◇无缝克隆

产品说明

本试剂盒为多位点突变试剂盒，在多片段基因重组克隆试剂盒的基础上添加了高保真 PCR Mix，试剂盒组分经过特殊优化，显著提高了多位点突变的菌落数与突变率等参数指标。也可用于单位点突变实验。

类似多片段基因重组克隆试剂盒，首先设计各个位点的突变引物，在相邻突变片段的 PCR 引物对的 5'端加入 20 个碱基的互补序列，使得相邻 PCR 产物的末端带有 20 个相同碱基的同源序列。将所有突变片段的 PCR 产物按一定比例混合后，在重组酶作用下，50 度反应 15-30 min 即可将所有突变片段环化成突变质粒，最后进行转化涂板，挑取 2-3 克隆测序验证突变是否成功。

本公司多位点突变试剂盒基于独特的重组酶体系，并优化了反应缓冲液，显著提高了成功率，突变成功率可达 95% 以上。当突变位点不多于 4 个时，突变片段 PCR 产物可以不进行纯化，直接进行重组反应，极大地简化了实验步骤。



突变片段4 (带突变的载体骨架片段)

图 1 多位点基因突变原理图

蓝色，红色，紫色，绿色分别为 4 段同源区序列，白色小圆点为突变碱基

订货网址: <http://www.angmeibio.com>

订货热线: 4006609586

自备材料

野生型质粒、突变引物、高保真聚合酶（无聚合酶 Mix 的点突变试剂盒需自备）；
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

- 突变片段扩增：通过 PCR 获得带突变碱基的线性化质粒与各段基因片段。
- 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：将带突变碱基的线性化质粒与各段基因片段按一定分子比例混合在一起，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，涂布平板，从平板上随机挑取克隆，抽提质粒测序验证是否突变成功。



图 2 多位点同时突变操作流程原理图

实验步骤

01. 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，使扩增后的相邻 PCR 片段末端带有 18-20 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 18-20 个碱基（多位点突变，同源区长度建议不低于 18 个碱基）。
- 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图 3：

2 个位点突变引物设计

野生型质粒原始序列

```
5' ...TGACCATGATTACGAAITCCAGCAGCGGGCTGGTCAATGAAAAGTACTTCCTCC...
3' ...ACTGGTACTAATGCTTAAAGTCTCGCCGACCACTATACTTTCATGAAGGAGG...
```

突变位点 1. 碱基突变

```
5' ...TGACCATGATTACGAAITCCAGCAGCTGCCTGGTCAATGAAAAGTACTTCCTCCTC...
3' ...ACTGGTACTAATGCTTAAAGTCTCGACCGACCAGTATACTTTCATGAAGGAGGAG...
```

正向引物 1: 5' CCAGCAGCTGCCTGGTCAATGAAAAGTAC

反向引物 1: 5' TGACCAGGCACTGCTGGAATTCGTAATCA

位点 2. 碱基 deletion

```
5' ...GAATTCAGCAGCGTGACCATGATAGAAAGTACTTCCTCGCCTGGTCAATG...
3' ...CTTAAAGGTCTCGCACTGGTACTAATGTTGATGAAGGAGCGGACCACTATACT...
```

正向引物 2: 5' GACCATGATTACTTCCTCGCCTGGTCAAT

反向引物 2: 5' GAGGAAGTAAATCATGGTACGCTGCTGGA

两个突变片段的 PCR 引物对组合使用原则：

突变片段 1: 正向引物 1+反向引物 2；

突变片段 2: 反向引物 1+正向引物 2；

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

图 3 多位点基因点突变引物设计图

02. PCR 扩增突变片段，并引入突变碱基

为了减少扩增突变的引入，突变片段的 PCR 扩增需用高保真酶。50ul 的 PCR 体系中，推荐使用 1-5ng 环状质粒模板。强烈推荐利用限制性内切酶 DpnI 对 PCR 产物进行处理，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。多个长度相近的突变片段可以在同一管 PCR 中进行扩增。

03. 重组环化反应的线性化质粒使用量

(1) 浓度测定：

◆ 若各个 PCR 突变片段已通过高质量的试剂盒进行胶回收纯化，且经电泳检测无明显杂带或 Smear 现象时，也可使用 Nanodrop 等基于吸光值的仪器进行浓度测定，但只有当 A_{260}/A_{280} 在 1.8-2.0 之间时浓度值可信。当样品浓度低于 10 ng 时，

不同型号的仪器基于 A_{260} 得到的浓度值可能存在较大差异，推荐使用 Qubit、PicoGreen 等进行浓度测定；并电泳观测条带亮度的方法对 DNA 浓度进行定性测定。

◆ 若各个 PCR 突变片段未经纯化，请务必按照下图所示，通过电泳比较条带亮度的方法对 DNA 进行定量。将线性化载体和插入片段分别做数个梯度稀释后，原液和稀释后产物各取 1ul 上样进行电泳，与标准的 DNA 定量 Marker (条带浓度均一旦确定) 比较条带亮度以确定其近似浓度。

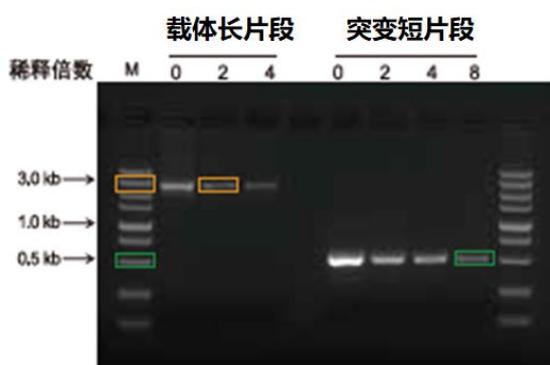


图 4 线性化载体和插入片段凝胶电泳浓度检测

例如 M: DL5,000 Marker。上样 5 μ l, 除 1.0 kb 条带为 100 ng 以外, 其余条带 DNA 量均为 50 ng。图中橙色框 / 绿色框分别标记线性化载体和插入片段在某个稀释梯度下与相近大小的 Marker 条带亮度相似。因此：

Vector 浓度约为： 50 ng x 2 = 100 ng/ul。

Insert 浓度约为： 50 ng x 8 = 400 ng/ul。

(2) 载体片段使用量计算：

◆ 若最大突变片段长度小于 3.0kb, 多片段重组反应的各 PCR 片段可以按照等摩尔比使用, 且最适使用量为 0.03 pmol。可由以下公式粗略计算对应摩尔数的 DNA 纳克数。

突变片段最适使用量(0.03 pmol) = [0.02x 克隆载体碱基对数] ng

◆ 若最大突变片段长度大于 3.0kb, 则大于 3kb 突变片段最适用量为 0.03pmol, 小于 3kb 突变片段的最适用量为 0.06pmol。

例如, 将 3 个长度为 1 kb 的基因突变片段与长度为 5 kb 的载体框架突变片段构建 4 位点同时突变质粒时, 载体框架突变片段的最适使用量应为： 0.02 X 5000 = 100 ng; 每个基因突变片段最适使用量应为： 0.04 X 1000 = 40 ng。

◆ 长度大于 3kb 的载体框架突变片段的使用量应在 50-200 ng 之间; 短的基因突变片段的使用量应在 10-100ng 之间。

◆ 突变片段未经纯化时, 为了保证突变效率, 各个片段的加入总体积应不超过反应体系体积的 1/5, 最高不能超过 1/3。

04. 重组反应环化突变质粒

(1) 根据公式计算重组反应所需 DNA 量。

若突变片段浓度过高, 为了确保加样的准确性, 可适当稀释, 在配制重组反应体系时使各组分加样量不低于 1 ul。

(2) 于冰上按表 1 配制以下反应体系 (4 位点同时突变)：

(3) 使用移液器轻轻吸打混匀 (请勿振荡混匀), 短暂离心将反应液收集至管底。

(4) 50 $^{\circ}$ C 反应 30 min; 降至 4 $^{\circ}$ C 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, 重组效率在反应 30 min 左右达到

订货网址: <http://www.angmeibio.com>

订货热线: 4006609586

最高，反应时间不足或者太长都将会降低克隆效率。

- ◆ 重组产物可于-20℃存放 1 个月，待需要时解冻转化即可。

表 1 重组环化反应体系构成

组分	重组反应 ^a	阴性对照 ^b	阳性对照 ^c
突变载体框架	X μl	X μl	2 μl
突变片段 1	Y μl	Y μl	1 μl
突变片段 2	Z μl	Z μl	1 μl
突变片段 3	W μl	W μl	1 μl
5×多点突变 Buffer	4 μl	4 μl	4 μl
重组酶	2 μl	0 μl	2 μl
ddH ₂ O	to 20 μl	to 20 μl	to 20 μl

- X/Y 根据公式计算得到各个突变片段用量。
- 阴性对照用来确认图片片段中是否有环状野生型质粒残留，推荐进行。
- 阳性对照反应用来排除其他实验材料及操作因素的影响。

05. 环化质粒重组产物转化

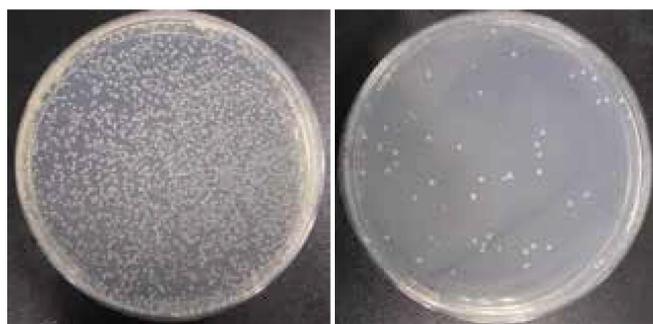
- ◆ 在冰上解冻克隆感受态细胞，冰上放置 15min (如：DH5α Competent cell)
- ◆ 取 5 ul 重组产物加入到 50ul 感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置 15-20 min。

! 重组产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的 1/10;

- ◆ 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)。
- ◆ 5. 将相应抗性的 LB 平板固体培养基在 37℃培养箱中预热。
- ◆ 可以直接吸取 100-200ul 菌液到含有正确抗性的平板上，用无菌涂布棒涂匀。也可以 12,000 rpm 离心 1 min，弃掉 350ul 上清。用剩余 150ul 培养基将菌体重悬，再涂布于含有正确抗性的平板上。
- ◆ 37℃培养箱中倒置培养 12 - 16 h。

06. 点突变测序鉴定

- ◆ 过夜培养后，重组反应转化平板上形成数百个单克隆，而阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者（图 5）。
- ◆ 在平板上挑取2-3个克隆进行DNA序列测定，鉴定是否突变成功。



重组反应转化板

阴性对照转化板

图5 突变组与阴性对照组菌落数

注意事项

1. 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 1/10。
2. 试剂盒可进行 7 位点同时突变。
3. 突变片段的使用方式
 - (1) 当进行总长小于 5kb 的 2-3 片段重组（2-3 位点同时突变）时：
如 PCR 扩增产物电泳条带单一，扩增产物无需纯化可直接用于重组环化反应，使用总体积不应超过 4ul（环化反应总体积的 1/5），最高不能超过 1/3，加入体积增大会降低环化效率。
 - (2) 当进行总长度>5kb 的 4-7 个突变片段重组（4-7 个位点同时突变）时：
推荐使用高质量的胶回收试剂盒对突变片段 PCR 产物进行纯化，提高突变片段纯度。

07 常见问题与解决方案

◆ 引物如何设计？

1. 引物设计：按照说明书的设计原则设计引物。
2. 引物三部分：5'-末端同源序列(18 - 20 bp)+突变位点+目标序列特异性反向配对序列（配对区 Tm 值在 55-65 度为佳）。

◆ 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：可通过不加重组酶的阴性对照检测野生型环状质粒是否去除完全。若野生型质粒克隆数较多，**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。