

化学法点突变试剂盒

本公司有多种零背景即用型线性化质粒

保存条件

-20° C 保存（化学重组试剂常温保存）。

可于-20~0° C 运输。

~使用过程中避免反复冻融。

产品组成

组分	GM05A	GM05B	GM05C
2×PCR Mix	250 μl	500 μl	1250 μl
化学重组试剂	20 μl	40 μl	100ul
10X 化学重组 buffer	20 μl	40 μl	100ul
突变线性质粒 DNA	50ul	100ul	250ul

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与硫代修饰的引物，PCR 扩增野生型质粒，将质粒线性化并引入突变位点，然后用化学重组试剂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 8-12 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 产物用化学重组试剂处理环化质粒，然后进行 DH5a 转化，完成基因定点突变。

本公司化学法突变试剂盒含有高保真 DNA 聚合酶 2XPCR Mix、化学重组试剂，可以从头到尾完成整个实验，极大的方便了实验操作。另有无高保真 DNA 聚合酶 2XPCR Mix 的化学法突变试剂盒。

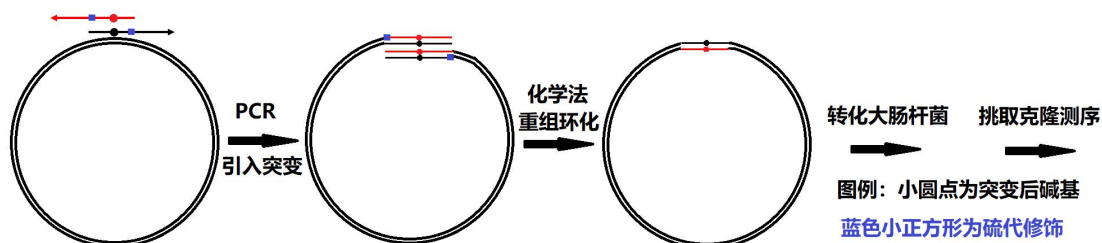


图 1 化学法点突变原理图

订货网址: <http://www.angmeibio.com>

订货热线: 4006609586

自备材料

- ◆ 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。
- 化学法重组环化反应：将线性化质粒，在化学重组试剂作用下，70° C 反应 5 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

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，使扩增后的线性化质粒片段 5'和 3'末端带有 8-12 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+硫代修饰位点+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+硫代修饰位点+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℃为佳，末端同源区序列长度为 8-12 个碱基（一般情况同源区 10 个碱基足）。
- 一般引物不需 PAGE 纯化，如果最终引物长度超过 40 bp，推荐合成时选用 PAGE 纯化，有助于提高 PCR 与点突变成功率。安徽通用生物等公司有硫代修饰引物合成服务。

插入片段引物设计可参照以下实例：

野生型质粒原始序列^①

5'TGACCATGATTACGAATTCAGCAGCGGCCTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCC.....^②
3'ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCGCCGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....^③

1. 碱基突变^④

5'TGACCATGATTACGAATTCAGCAGCTGCCTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCCTC.....^⑤
3'ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCGACCGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....^⑥

正向引物 5' CAGCTGCCTG*GTCATATGAAAGTAC^⑦

反向引物 5' CAGGCACTG*CTGGAATTCGTAATCA^⑧

2. 碱基 deletion^④

5'TGACCATGATTACGAATTCAGCAGCGGGCTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCC.....^⑨
3'ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCGGCGGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....^⑩

正向引物 5' CCAGCTGGTC*ATATGAAAGTACTTC^⑪

反向引物 5' GACCAGCTGG*AATTCGTAATCATGG^⑫

3. 碱基插入^④

5'TGACCATGATTACGAATTCAGCAGCagtcTGCCTGGTCATATGAAAGTACTTCCTCC.....^⑬
3'ACTGGTACTAATGCTTAAGGTCGTCtcagACGGACAGTATACTTTCATGAAGGAGG.....^⑭

正向引物 5' AGCagtcTGC*CTGGTCATATGAAAGTA^⑮

反向引物 5' GCAGactGCT*GCTGGAATTCGTAATCA^⑯

红色碱基为突变碱基，黄色序列为互补同源序列，*代表硫代修饰^⑰

方框内碱基为突变引物的质粒模板互补配对区^⑱

02. 反向 PCR 扩增线性化质粒，并引入突变位点

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。限制性内切酶 DpnI 处理 PCR 产物，可以降低野生型质粒形成的克隆数。由于本突变试剂盒效率极高，可省略 DpnI 消化处理，对突变成功率影响不大。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

03. 重组环化反应的线性化质粒使用量

无需精确计算化学法重组反应的线性化质粒 PCR 产物加入量，一般使用 3-5ul。

04. 质粒重组环化反应

(1) 室温配制以下反应体系：

组分	重组反应 ^a	阴性对照 ^b	阳性对照 ^c
线性化质粒	X μ l	X μ l	5 μ l
化学重组试剂	2 μ l	0 μ l	2 μ l
ddH ₂ O	to 10 μ l	to 10 μ l	to 10 μ l

a. 割胶纯化的 PCR 产物进行重组反应时，一定在重组反应体系中加入 1/10 体积的化学重组 Buffer

b. 用来确认野生型环状质粒残留，推荐进行。

c. 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。

(2) 轻柔混匀后，在 70℃ 反应 8-10 min，置于室温或冰上冷却。

- ◆ 在 PCR 仪及其它加热仪器上进行反应，重组环化效率在反应 8-10 min 左右达到最高。
- ◆ 重组环化产物可于 -20℃ 存放 1 个月，待需要时解冻转化即可。

05. 重组环化质粒产物转化

- ◆ 在冰上解冻克隆感受态细胞，冰上放置 15min
- ◆ 取 5ul 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 μ l 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 20-100ul 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。

06. 点突变测序鉴定

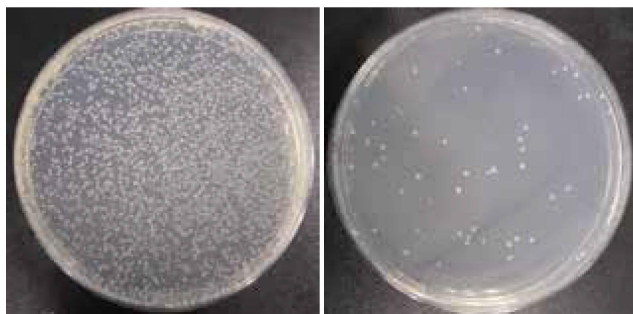
- ◆ 过夜培养后，重组环化反应转化平板上形成数百个单克隆，而不加化学重组试剂的阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者。
- ◆ 挑取重组反应转化平板上 2-3 个克隆进行 DNA 序列测定，验证是否突变成功。

注意事项

订货网址: <http://www.angmeibio.com>

订货热线: 4006609586

- ◆ 割胶纯化的 PCR 产物进行重组反应时，一定在重组反应体系中加入 1/10 体积的化学重组 Buffer。
- ◆ 重组产物冰上冷却后，可直接转化感受态细胞，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。
- ◆ 扩增产物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

07.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 8-12 bp 同源臂。若同源臂 AT 含量大于 50%，建议延长同源臂至 10-12 个碱基。
2. 感受态细胞效率低：感受态细胞的转化效率需大于 10^6 cfu/ μ g。可进行简单检测，转化 1 ng 质粒，取 1/10 进行涂板，生长 100 个菌斑，估算转化效率为 10^6 cfu/ μ g；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）。

◆ 多数克隆为野生型质粒，突变失败

1. 野生型质粒去除不完全：极少数情况下阳性对照组的菌落数较少时，可通过不加化学重组试剂的阴性对照，检测野生型环状质粒是否去除完全。若野生型质粒模板未去除干净，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。
2. 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。
3. 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，扩增产物为未与突变位点配对的非特异性片段。可割胶纯化 PCR 产物。对于割胶纯化的 PCR 产物，建议重组反应体系中加入 1/10 体积的化学重组 Buffer。