

一管式点突变试剂盒

包装量:

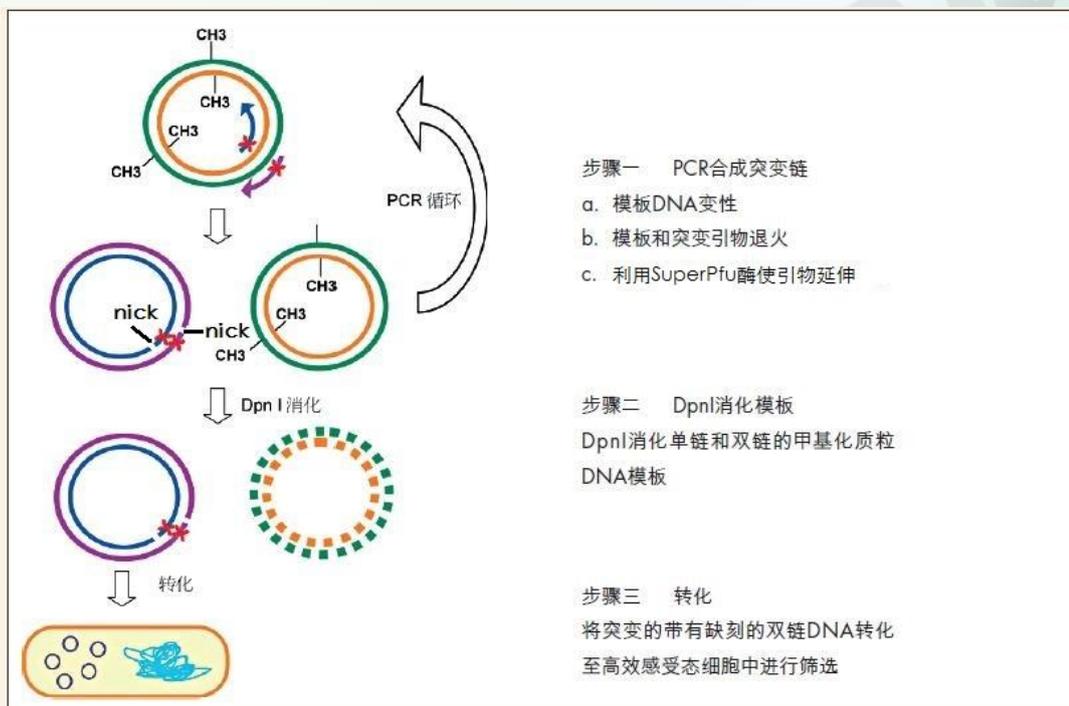
目录编号	包装单位
170901	10次
170902	20次

Components	170901	170902
SuperPfu DNA polymerase	5 μ l	10 μ l
10 \times SuperPfu Buffer	100 μ l	100 μ l
Dpn I	5 μ l	10 μ l
10mM dNTP Mixture	25 μ l	50 μ l

产品储存: -20°C 保存, 有效期 12 个月。由于试剂盒中提供的反应缓冲液及 dNTP 等成份是为反应专门优化的, 所以不要用其它的反应缓冲液及 dNTP 等代替。

制品说明: 本定点突变试剂盒是基于 PCR 原理向目的 DNA 片段(一般为质粒)中引入碱基的点突变, 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)等。一般宿主菌培养扩增的质粒 DNA 是甲基化的, PCR 扩增新合成的 DNA 是非甲基化的。首先以待突变的甲基化质粒为模板, 利用高保真的 SuperPfu 聚合酶实现突变质粒的合成(非甲基化, 包含突变点, 且有两个缺刻点 nick 点), 再利用 Dpn I 酶选择性降解甲基化的模板质粒, 剩下的新合成非甲基化的突变质粒转入大肠杆菌后, 质粒中有两个 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。一般可以产生大于 90%的突变效率。

适用范围: < 10kb 甲基化质粒中核苷酸的突变。



特点: 简单, 一个PCR管中完成所有操作; 采用部分重叠引物设计, 使PCR呈指数扩增, 扩增产物凝胶电泳可见; 使用Dpn I去除非突变模板, 突变效率高达90%。

引物设计:

- 1、引物包含5'端重叠区和3'端延伸区。5'端重叠区长度大约25-30bp, 3'端延伸区长度大约是10-15bp。
- 2、突变位点设计在5'端重叠区的中间位置, 突变位点的左侧5'端大约10-15bp, 右侧3'端20-25bp。
- 3、计算引物的Tm值, 看是否达到78℃, 如果Tm值低于78℃, 则适当改变引物的长度以使其Tm值≥78℃。

定点突变Tm值计算公式: $T_m = 81.5 + 0.41 \times (\%GC) - 675/L - \%mismatch$

注: L: 引物碱基数; %GC: 引物GC含量百分数; %mismatch: 突变位点数/引物长度数的百分数。

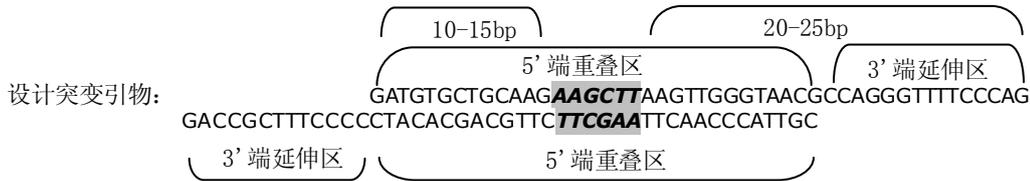
缺失或者插入Tm值计算公式: $T_m = 81.5 + 0.41 \times (\%GC) - 675/L$

注: L: 引物碱基数, 不包括插入碱基或者缺失碱基数; %GC: 引物GC含量百分数

- 4、引物应该选择PAGE或者更高的纯化方式, GC含量应大于40%, 3'端为一个或者更多个G/C结尾。

- 5、举例: GCGATT连续突变前4个碱基成为AAGCTT(引入一个Hind III酶切位点)

突变前序列: CTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAG**GCGATT**AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAG
GACCGCTTTCCCCTACACGACGTT**CGCTAA**TTCAACCCATTGCGGTCCCAAAGGGTC



建议PCR条件(25μl反应体系)

Template	10-20ng
Forward Primer (10 μM)	1 μl
Reverse Primer (10 μM)	1 μl
10×SuperPfu Buffer	2.5 μl
10 mM dNTPs	1 μl
SuperPfu DNA Polymerase	0.5 μl
ddH ₂ O to final volume	25 μl

PCR 循环

94°C 3-5 min
94°C 30 sec
55°C 30 sec
72°C 1Kb/2min
72°C 10 min

20-25 cycles

注意: 如质粒大于4kb, dNTPs使用量为2μl。

电泳检测:

取5μl PCR产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。如能看见目的条带, 则已成功大半; 注意即使未见条带或者见到目的条带外还有其它条带, 也可以继续进行后续步骤。

PCR产物的消化:

直接加 0.5μl Dpn I酶于PCR产物中(约20μl), 充分混匀, 继续PCR仪器上37℃孵育1小时(不用热盖)。

注意: Dpn I含甘油, 易沉底, 一定要吹打混匀。如果非突变质粒较多, 可以延长消化时间到3-5小时。

转化:

加入5-10μl Dpn I酶消化产物于50μl-100μl感受态细胞中(效率≥10的8次方), 轻弹混匀, 冰浴30分钟。按照标准转化步骤转化, 最后将菌液铺板, 培养过夜(为得到较多的克隆, 4000 rpm 离心1min, 弃掉部分上清, 保留100-150μl, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板, 培养过夜)。

注意: 如无克隆生长, 或克隆数少, 把Dpn I酶消化后的产物用常规的乙醇沉淀浓缩, 这样就可以把所有的产物全部用于转化。