

EasyMut 基因定点突变试剂盒

Gene site-directed mutagenesis kit



试剂盒组成:

Component	CL302-01 (20 rxns)
Xerox DNA polymerase(1U/μl)	25μl
5x Xerox DNA polymerase buffer	300 μl
SDM Enzyme(10U/μl)	25μl
10mM dNTP mixture	25μl
Control plasmid(4.5kb,10ng/μl)	12μl
Control forward primer(10μM)	5μl
Control reverse primer(10μM)	5μl
BMXL10-Gold competent cells	20x100μl

保存条件: XL10-Gold 感受态细胞-70℃保存, 有效期12个月。其它成分-20℃保存, 有效期一年。

试剂盒介绍:

基因定点突变是一种对质粒 DNA 序列上的指定碱基进行体外定点替换、插入或缺失等序列改变的基因操作技术, 在蛋白质结构与功能以及 DNA 表达调控研究中是一种非常重要的技术。基因定点突变试剂盒在不需要特殊载体、不需要 T4 DNA 连接酶、不需要亚克隆的条件下可以对指定碱基进行突变。试剂盒使用了具有快速扩增性、超高保真性和强大扩增能力特点的 Xerox DNA 聚合酶, 只需以甲基化质粒为模板进行一次 PCR 扩增、一次酶切消化和一次转化就可以在一天之内完成基因突变过程, 整个过程非常简单。该试剂盒也可以同时对多个位点进行突变。

突变原理:

1. 在 Xerox DNA 聚合酶的作用下, 突变引物以质粒为模板扩增出互补链, 产生的互补链包含已突变碱基。
2. 特异性降解甲基化DNA的限制性内切酶SDM (Site-Directed Mutagenesis) Enzyme可以选择性地降解原始质粒模板。PCR产生的互补链因DNA没有甲基化, 不能被SDM酶降解。
3. SDM处理过的产物转化细菌后, 质粒中的断点可被大肠杆菌修复, 得到的克隆就会含有预期突变的质粒。

一、突变引物设计及要求

1. 对单一位点进行突变的引物设计基本原则 (阴影部分为突变区双链DNA序列)

- (1) 共需设计两条互补的引物。可以先设计一条, 然后就可以得到互补的另一条引物。

扩增时，两条引物反向延伸。见实验例1和例2。

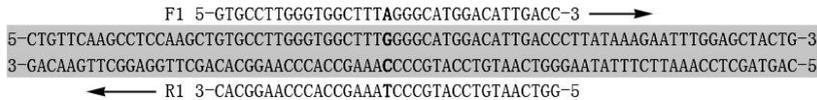
- (2) 引物的长度通常为30-40个碱基，通常把突变位点两侧的碱基数控制在15个左右，GC%在40%以上。但引物也不宜过长，否则会形成非常稳定的二级结构,导致引物和模板结合困难。

实验例1：碱基G突变成碱基A

设计的突变引物为

F1:5-GTGCCTTGGGTGGCTTTAGGGCATGGACATTGACC-3

R1:5-GGTCAATGTCCATGCCCTAAAGCCACCCAAGGCAC-3

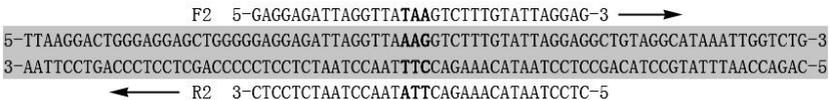


实验例2：碱基AAG突变成碱基TAA

设计的突变引物为:

F2:5-GAGGAGATTAGGTTATAAGTCTTTGTATTAGGAG-3

R2:5-CTCCTAATACAAAGACTTATAACCTAATCTCCTC-3



2.对两个位点同时进行突变的引物设计基本原则

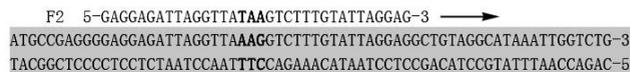
共需设计两条同方向的引物。扩增时，两条引物沿一个方向延伸。见实验例3。

实验例3

设计的突变引物为:

F1 5-CCTCTGCACGTTGCATGAAGACCACCGTGAACGC-3

F2 5-GAGGAGATTAGGTTATAAGTCTTTGTATTAGGAG-3



3.突变引物合成和配制

使用经过PAGE纯化或FPLC纯化等高纯度引物。如果合成得到的突变引物A的量是

2.3nmol, 另一个引物B的量是2.1nmol。分别在引物A中加入23 μ l灭菌水, 在引物B中加入21 μ l灭菌水, 配成浓度为100 μ M的储存液。吸取5 μ l的100 μ M引物A, 再加入45 μ l水, 混匀后即可得到50 μ l直接用于突变实验的工作浓度(10 μ M)的引物A。引物B的工作液可按引物A的稀释方法配制。

二、质粒模板要求

只能使用从基因型为 dam^+ 的大肠杆菌(这类菌中质粒 DNA 可以被甲基化)中抽提得到的质粒用于基因定点突变。包括 DH5 α 、TOP10、DH10B、Mach1-T1、BL21、JM109 等常用的大肠杆菌都是 dam^+ 的。用于扩增的质粒模板一定要纯, 含有 RNA 的质粒会导致 DNA 定量不准, 突变前一定要对质粒进行琼脂糖凝胶电泳检测, 确认质粒的质量和数量。如果质粒模板 GC 含量较高, 在 70% 以上, 请在突变反应中补加促进高 GC 模板扩增的增强试剂, 如 DMSO 等。

三、突变步骤

1. 突变质粒扩增

在一个0.2ml的PCR薄壁管中建立反应体系:

表1 PCR反应体系

Component	Volume
ddH ₂ O	31 μ l
5 \times Xerox DNA polymerase Buffer	10 μ l
10mM dNTP mixture	1 μ l
Mutagenic forward primer (10 μ M)	1 μ l
Mutagenic reverse primer (10 μ M)	1 μ l
Plasmid template (10 ng/ μ l)	5 μ l
Xerox DNA polymerase (1 U/ μ l)	1 μ l
Total volume	50 μ l

按照上面表1所列试剂的顺序依次加入各种反应组分, 混匀后离心数秒, 置于PCR仪中。按下面表2中所立的循环参数进行扩增。

重要建议:

由于高保真聚合酶具有很强的具有校正功能的3' \rightarrow 5'外切酶活性, 为了避免在配制PCR混合物时导致引物降解, 建议采用手工热启动方法。首先将除Xerox DNA polymerase以外的所有组分混合, 离心后, 将PCR管放在PCR仪中运行, 在98 $^{\circ}$ C预变性1分钟后, 按暂停键, 将1 μ l的Xerox DNA polymerase加到PCR管中, 用吸头轻轻吹打混合。然后继续运行PCR仪。

表2 突变质粒扩增循环参数

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	20-25	98°C	10 seconds
		55-60°C *	20 seconds
		72°C	30 seconds/kb of plasmid length**
3	1	72°C	5 minutes

注意:

- (1)进行单点突变时，如果突变区设计的引物的Tm很高，可以提高退火温度至58°C或60°C以增强扩增特异性。如果进行多点突变，建议使用55°C退火温度。
- (2)质粒的长度是指空载体和插入片段长度之和。例如：一个5kb的载体质粒中插入一段3kb的外源片段，那么这个重组质粒总长度为8kb，72°C延伸时间应设定为4分钟。

2.电泳检测

取10 μ l PCR产物，用1% 琼脂糖凝胶电泳检测。注意：即使观察到多条扩增条带，如果出现与目的条带大小一致的扩增条带，可继续用SDM酶消化PCR产物及转化实验。

3.SDM酶消化:

电泳检测达到所要求后，直接向余下的PCR反应液中加入1 μ l 的SDM酶 (10 U/ μ l)，用吸头轻轻混匀，离心后，将反应管置于37°C孵育1-3小时以降解甲基化的模板链（未突变的质粒）。SDM酶消化完毕后可以直接用于转化，或者-20°C保存备用。或者用乙醇沉淀方法灭活SDM酶和浓缩酶切产物，不建议用核酸回收试剂盒浓缩。

4.转化及克隆鉴定

- (1)取2-5 μ l SDM酶消化产物加入到100 μ l 感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴30 min。
- (2) 42°C准确热激60sec，立即置于冰上2 min。
- (3)加800 μ l平衡至室温的SOC培养基或LB培养基，37°C，200 rpm 震荡培养60 min。
- (4) 4000 rpm离心1 min，弃掉部分上清，保留200 μ l，用吸头吹打悬浮菌体，取100 μ l 菌液涂板，37°C培养过夜。

注意：若感受态的转化方法不同，则参考感受态的说明书操作。

(5) 挑克隆鉴定及测序鉴定

对于得到的克隆，可以先挑5个克隆，少量提取质粒进行酶切鉴定，以未突变的原始质粒作为对照。以确认得到的质粒的大小预期结果相符。取3-5个酶切鉴定正确的克隆去测序，以最终确认得到的克隆是否是预期的突变克隆。通常大约每2个克隆中会得到一个预期的突变克隆。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。

(6) 突变前，最好先选择或设计好测序引物。选择的测序引物要求其测序结果刚好能够覆盖突变位点。可先用选择好的测序引物将待突变质粒进行试测，测序结果证实测序引物有效，再送突变质粒测序，这样能够保证实验准确和快速进行。

四、常见问题及解决方法：

1. 转化后没有克隆或克隆数少

- (1) 感受态细菌效率降低，请用pUC19检测一下感受态细胞的效率，确保转化效率在 10^8 CFU/ug以上。
- (2) 转化时，增加 SDM 酶处理过的 PCR 产物。或将 SDM 消化后的产物用常规的乙醇沉淀方法进行沉淀，然后溶解在的 10ul TE Buffer 中。取 5 μ l 产物或全部用于转化。
- (3) 保证足量的质粒 DNA 模板，质粒模板一定要纯，含有 RNA 的质粒会导致 DNA 定量不准，最好突变前，对模板 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测，确认 DNA 的质量和数量。增加模板量，使用 100ng，200ng 或 500ng。
- (4) 突变质粒扩增时将 72 $^{\circ}$ C 延伸时间延长到 1kb/40Sec。
- (5) 对照质粒为氨苄抗性，如用对照质粒模板检验突变效率，在含氨苄的平板上涂40 μ l 的40 mg/ml X-gal和8 μ l的500mM IPTG，如突变成功菌落呈蓝色。

2. 没有突变或突变效率低

- (1) 确保 SDM 酶已经加入到 PCR 产物中。
- (2) 延长 SDM 酶的消化时间到 3 小时，保证有足够时间消化未突变的质粒模板 DNA。
- (3) 避免 dNTPs 的多次反复冻融。

3. 有额外的突变引物序列插入

- (1) 减少一半的引物用量。
- (2) 错配导致，提高退火温度，每次提高 3 $^{\circ}$ C。
- (3) 重新设计突变引物。

4. 测序没有信号

- (1) 检查送测序的质粒和原始待突变质粒酶切后是否大小完全一致。
- (2) 用原始质粒验证测序引物的有效性。