

One Tube Fast Mutagenesis Kit



北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 邮箱：info@aidlab.cn

使用说明书

包装量：

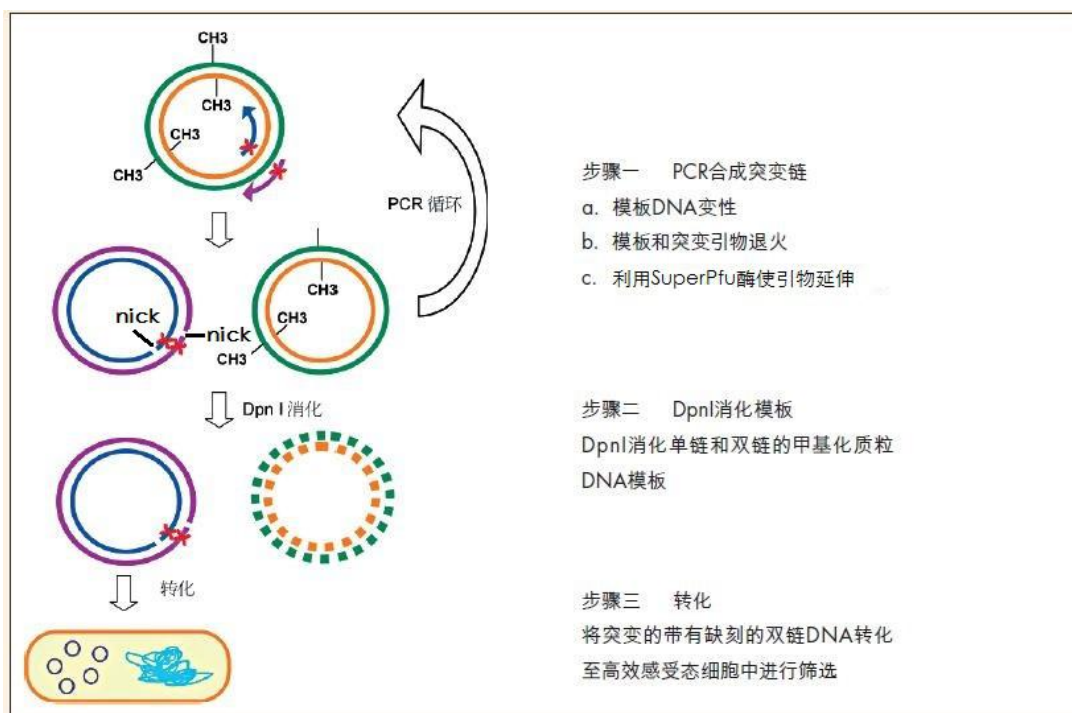
目录编号	包装单位
CV0901	10次
CV0902	20次

Components	CV0901	CV0902
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 $^{\circ}$ 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，利用快速超高保真的 *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： < 12kb 甲基化质粒中核苷酸的突变。



- 步骤一 PCR合成突变链
- 模板DNA变性
 - 模板和突变引物退火
 - 利用SuperPfu酶使引物延伸

步骤二 DpnI消化模板
DpnI消化单链和双链的甲基化质粒 DNA模板

步骤三 转化
将突变的带有缺刻的双链DNA转化至高效感受态细胞中进行筛选

特点:

- 1、简单，一个PCR管中完成所有操作，速度最快。
- 2、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增加成功率。
- 3、效率高，使用Dpn I去除非突变模板，突变效率高达90%；不需要使用特殊感受态细胞降解非突变质粒。
- 4、采用分子进化改造的*SuperPfu*可以提供4倍-6倍于*pfu*的扩增速率提高和3倍于*pfu*的超高保真性。

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18-20bp，3'端延伸区长度大约是10-12bp。
- 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7-9bp，右侧3'端20-22bp。
- 3、引物应该选择PAGE或者更高的纯化方式，3'端为一个或者更多个G/C结尾。
- 4、举例：氨基酸 V (GTA) 连续突变 3 个碱基成为 R (CGT)

突变前序列： GTATCTGGAGCACCCACAGGAT**GTA**CCGACAATTCGTGAAAAAGTG
CATAGACCTCGTGGGTGTCCTA**CAT**GGCTGTTAAGCACTTTTTTCAC



建议PCR条件(25μl反应体系)

Template	2-10ng
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 20 sec
55°C 20 sec
72°C 2Kb/min
72°C 10 min

25-30 cycles

注意：一般选择2kb/min扩增，但是扩增时间通常可以在1kb/20-40秒范围内调整。

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(或者见到目的条带外还有其它条带)，则可预判基本成功；注意即使未见条带，也可以继续进行后续步骤，但是成功几率大大降低。

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 °C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：应该选择效率高的感受态细胞，如无克隆生长，或克隆数少，可以将20μl 消化产物全部转入200μl感受态细胞中，或者把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。