



RandomMutation 基因随机突变试剂盒

产品编号	产品名称	包装
PC6901	RandomMutation基因随机突变试剂盒	50次
PC6902	RandomMutation基因随机突变试剂盒	200次

产品简介:

- ❖ 北京艾德莱生产的RandomMutation基因随机突变试剂盒(RandomMutation Random Mutagenesis Kit)是一种基于易错PCR(Error Prone PCR)的方法使目的基因片段通过PCR扩增后发生一定几率的随机突变的试剂盒。
- ❖ 基因的随机突变是研究蛋白结构与功能的关系、以及抑制或者改良甚至创造蛋白或酶活性的重要方法。
- ❖ 易错PCR方法通常是指通过易错耐热DNA聚合酶进行PCR扩增，从而在目的基因序列中引入随机突变的方法。易错PCR方法在目的基因序列中引入随机突变后，最终很可能在蛋白水平上产生氨基酸序列的突变，从而可以随机产生活性更强、更弱甚至失去活性的蛋白或酶，也有可能使蛋白或酶产生新的活性。
- ❖ 为了分析蛋白结构和功能的关系，理想的突变应该是每个蛋白发生1个氨基酸改变(1-2核苷酸突变)；在蛋白进化研究方面，理想的突变是每个蛋白发生1-4个氨基酸改变(约2-7核苷酸突变)；从突变文库中筛选高活性的蛋白或者酶则通常希望每个基因产生20个左右的核苷酸突变。
- ❖ 本试剂盒提供的RandomMut DNA polymerase，是一种全新的专门用于易错PCR的DNA聚合酶，在配套的反应缓冲液中加入推荐量的Mutation enhancer情况下，可以在每kb的基因中引入约7.8个随机突变，而且这些突变是AT→GC和GC→AT两个方向的突变基本均衡的， $(AT \rightarrow GC \text{ mutations}) / (GC \rightarrow AT \text{ mutations}) = 1.06$ ，同时还会引入适量的插入(insertion)和缺失(deletion)突变。
- ❖ 本试剂盒扩增出来的DNA片段为黏性末端，可以直接用于常规的T载体克隆。
- ❖ 本试剂盒可扩增长达6kb的目的片段。
- ❖ **用户可以自行调整本试剂盒的突变几率，使用更加便捷。**本试剂盒提供了Mutation enhancer (10X)，通过改变Mutation enhancer的用量可以显著影响突变率(参见表1)。

表1. 利用 RandomMutation基因随机突变试剂盒使用不同浓度的 Mutation enhancer PCR 扩增 1000bp 片段后双酶切插入空载体，然后随机挑选若干克隆进行测序分析的结果。PCR 扩增的 1000bp 模板片段插入在约 4kb 的质粒中，测试时 1000bp 模板的用量是 120pg/μl，相当于模板质粒的用量为 600pg/μl，PCR 循环数为 30。

	0.5X Mutation enhancer		1X Mutation enhancer		2X Mutation enhancer	
Total mutations found	63		98		134	
Mutations	Mutations	Percentage	Mutations	Percentage	Mutations	Percentage
A→T	8	12.7%	10	10.2%	21	15.7%
A→G	10	15.9%	13	13.3%	21	15.7%
A→C	1	1.6%	2	2.0%	4	3.0%
T→A	7	11.1%	10	10.2%	15	11.2%
T→G	1	1.6%	4	4.1%	2	1.5%
T→C	8	12.7%	15	15.3%	17	12.7%
G→A	11	17.5%	13	13.3%	10	7.5%
G→T	1	1.6%	6	6.1%	6	4.5%
G→C	2	3.2%	4	4.1%	8	6.0%



C→A	2	3.2%	3	3.1%	8	6.0%
C→T	5	7.9%	10	10.2%	13	9.7%
C→G	3	4.8%	3	3.1%	4	3.0%
Insertions	1	1.6%	1	1.0%	0	0.0%
Deletions	3	4.8%	4	4.1%	5	3.7%
Bias Indicators (AT→GC/GC→AT)						
(AT→GC) / (GC→AT)	1.05		1.06		1.19	
A→N, T→N	19+16=35	55.6%	25+29=54	55.1%	46+34=80	59.7%
G→N, C→N	14+10=24	38.1%	23+16=39	39.8%	24+25=49	36.6%
Transitions						
A→G, T→C	18	28.6%	28	28.6%	38	28.4%
G→A, C→T	16	25.4%	23	23.5%	23	17.2%
Transversions						
A→T, T→A	15	23.8%	20	20.4%	36	26.9%
A→C, T→G	2	3.2%	6	6.1%	6	4.5%
G→C, C→G	5	7.9%	7	7.1%	12	9.0%
G→T, C→A	3	4.8%	9	9.2%	14	10.4%
Insertions and Deletions						
Insertions	1	1.6%	1	1.0%	0	0.0%
Deletions	3	4.8%	4	4.1%	5	3.7%
Mutation Frequency						
Mutations/kb (per PCR)	5.5		7.8		10.7	
突变碱基数范围	0-11		3-12		4-18	

- ❖ 本试剂盒如果用于20μl的PCR突变体系，两种包装的本试剂盒分别可以进行50次和200次基因随机突变，如果用于50μl的PCR突变体系，两种包装的本试剂盒分别可以进行20次和80次基因随机突变。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
PC6901	RandomMut DNA polymerase	25μl
	RandomMut buffer (10X)	125μl
	Mutation enhancer (10X)	125μl

产品编号	产品名称	包装
PC6902	RandomMut DNA polymerase	100μl
	RandomMut buffer (10X)	500μl
	Mutation enhancer (10X)	500μl

保存条件：

-20°C保存，一年有效。



注意事项：

- ❖ PCR反应非常灵敏，在使用RandomMut DNA polymerase进行PCR扩增反应时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量设置不加模板的空白对照。
- ❖ 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- ❖ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 引物设计。

- 引物的长度通常为约20个碱基。
- 如果引物带有克隆酶切位点，引物长度通常约为28-30个碱基，其中包含了酶切位点和通常必须添加的保护碱基以确保酶切效率。
- 引物的GC含量尽量控制在40-60%。
- 最好使用经过PAGE纯化的引物或更高纯度的引物。

2. 随机突变PCR反应。

- 参考下表设置随机突变PCR反应体系：

试剂	最终浓度	体积	体积
双蒸水或MilliQ水	-	(13.2-x) μ l	(33-y) μ l
RandomMut buffer (10X)	1X	2 μ l	5 μ l
Mutation enhancer (10X)	1X	2 μ l	5 μ l
dNTP (2.5mM each)	0.25mM	2 μ l	5 μ l
模板DNA	0.2pg/ μ l -20ng/ μ l	x μ l	y μ l
引物混合物(10 μ M each)	0.2 μ M each	0.4 μ l	1 μ l
RandomMut DNA polymerase	-	0.4 μ l	1 μ l
总体积	-	20μl	50μl

- 对于不同类型模板DNA的推荐用量如下：哺乳动物基因组DNA 2-10ng/ μ l；大肠杆菌基因组DNA 0.2pg/ μ l-2ng/ μ l；质粒DNA模板20pg/ μ l-5ng/ μ l，质粒DNA模板的起始推荐用量为0.1-1ng/ μ l。随机突变扩增的模板DNA浓度越高，随机突变率则越低。
- 对于质粒DNA模板的具体推荐用量请参考下表。低突变率(0-4.5 mutations/kb)，建议突变扩增的模板DNA用量为1-20ng/ μ l；中突变率(4.5-9 mutations/kb)，建议突变扩增的模板DNA为0.1-1ng/ μ l；高突变率(大于9 mutations/kb)，建议突变扩增的模板DNA用量为2-100pg/ μ l。突变扩增的模板DNA计算：上述推荐量是以拟PCR扩增的目的片段的量(Target amount)进行计算的，而不是以整个质粒的量来计算，并且计算的标准是拟扩增片段的大小为1kb。例如低突变率推荐的模板DNA用量为1-20ng/ μ l时，如果拟扩增片段为1kb，质粒总大小为4kb，实际的推荐质粒用量为(1-20ng/ μ l)*(1kb/1kb)*(4kb/1kb)=4-80ng/ μ l；如果拟扩增片段为2kb，质粒总大小为6kb，实际的推荐质粒用量为(1-20ng/ μ l)*(2kb/1kb)*(6kb/2kb)=6-120ng/ μ l。比较理想的模板用量需要根据实际突变效果进行适当调整。

Mutation rate	Mutations/kb	Target amount/20 μ l	Target concentration
Low	0-4.5	20-400ng	1-20ng/ μ l
Medium	4.5-9	2-20ng	0.1-1ng/ μ l
High	9-16	40pg-2ng	2-100pg/ μ l



d. 按照如下参数设置PCR仪：

步骤	循环数	温度	扩增时间	说明
1	1	94°C	3min	最初变性
2	25~30	94°C	30sec	变性
		55°C	30sec	退火
		72°C	1min/kb	延伸
3	1	72°C	10min	延伸、补全
4	1	4°C	forever	暂时存放

(a) 上表中1min/kb表示，如果扩增片段是2kb，那么72°C的延伸时间为2分钟。

(b) 如果发现目的片段较难被扩增，根据RandomMut DNA polymerase本身的特性，推荐尝试使用92°C变性。

(c) PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同设定不同的变性、退火和延伸的温度和时间以及循环数等。

(d) 对于初次进行的PCR，为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物，可以把循环数设置为30。

3. PCR产物的克隆和测序。

根据实验目的，可以把PCR产物连入T载体，或者酶切后插入特定的目的载体，随后即可转化并挑取克隆进行测序，以确认随机突变的效果。

常见问题：

1. PCR产物非常少。

- 延伸时间是否足够，可以将延伸时间调整为2min/kb。
- 引物设计不佳是PCR过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中，一定要注意加入酶切位点后整条引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下，可以考虑更换引物。待扩增片断GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难，此时可以使用适合扩增高GC含量DNA片断的GC-rich buffer，并相应地根据GC-rich buffer的要求或说明调整PCR反应参数的设置。直接添加1-10% DMSO或5-20%甘油对于扩增高GC含量的片段也有帮助。
- PCR反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置PCR反应。
- 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体，或引物偏短，导致退火效果不佳。此时可以采用Touch down等方法进行退火，通常采用从65°C逐步缓慢降温到55或50°C的方法，使退火更加充分。
- 退火温度不佳，需要优化。如果有温度梯度PCR仪，则可以设置退火的温度梯度，摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度PCR仪，则可以通过多次PCR反应摸索最佳的退火温度。
- 延伸时间不足。可以在推荐的延伸时间基础上把延伸时间延长2-5倍，对于较难扩增的片断可以设置为每1kb延伸2分钟。
- 待扩增片断GC含量较高或长度较长，变性不够充分。可以调节起始变性条件至94°C 2-4min甚至94°C 5min。
- 在不同PCR仪上进行PCR反应，避免有时PCR仪出现问题。
- 循环数不足，适当延长PCR的循环数。通常循环数最高不必超过40，常用的循环数范围为25-35。
- 模板中含有抑制PCR反应的物质，可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。
- 对PCR引物进行脱盐纯化。
- 使用高质量的dNTP混合物。
- 适当增加DNA polymerase的用量。
- 当产生较多非特异性条带时，可以适当提高退火温度。



- o. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。
 - p. 使用完整、高纯度、高质量的DNA模板，且避免模板反复冻融。长片段DNA反复冻融过程中可能会出现断裂的问题。
 - q. Mg^{2+} 浓度较低，或 Mg^{2+} 与dNTP的比例不合适。使用本产品中提供的缓冲液就无需担心镁离子浓度的问题。
 - r. 根据片段大小选择合适的琼脂糖凝胶浓度和电泳条件。大片段DNA的电泳需要使用低浓度的琼脂糖凝胶和较低的电泳电压，并电泳较长的时间。
 - s. PCR反应体系中有气泡或者PCR管盖子漏气导致有溶液蒸发。
- 2. 杂带较多或条带弥散。**
- a. 退火温度提高 2-5°C。
 - b. 减少 DNA 模板的用量。
 - c. PCR 反应设置时在室温进行容易产生非特异性条带。推荐在冰浴上设置 PCR 反应。
 - d. 适当减少 DNA Polymerase 的用量。
 - e. 适当缩短延伸时间。
 - f. 减少循环数可减少非特异性条带的产生。
- 3. 随机突变率结果不理想。**
- a. 突变率偏低。
 - (a) 可适当提高 Mutation enhancer (10X)的用量至使用标准推荐用量 1.2、1.5 甚至 2 倍的用量(参考表 1)。注意：随着Mutation enhancer (10X)的用量增多，AT→GC/GC→AT 的比值会越高，即 AT 变成 GC 的倾向越高。
 - (b) 可采用连续易错 PCR 策略：即将一次易错 PCR 扩增得到的突变几率较低的产物作为下一次待扩增的模板，连续两次甚至多次进行易错 PCR 随机突变，使每一次扩增获得更多的突变，并且也可以通过这种方法累积有益突变。
 - (c) 减少突变扩增的模板 DNA 用量，并增加扩增的循环数，减少模板用量并增加扩增的循环数会提高突变几率。扩增的循环数最多可以增加到 35-40 个循环。
 - b. 突变率偏高。
 - (a) 可适当减少 Mutation enhancer (10X)的用量至使用标准推荐用量 0.8 或0.5 倍的用量。
 - (b) 可通过提高突变扩增的模板 DNA 用量(500-1000ng)来减少突变率。
 - (c) 减少 PCR 循环数至 20~25 个循环。