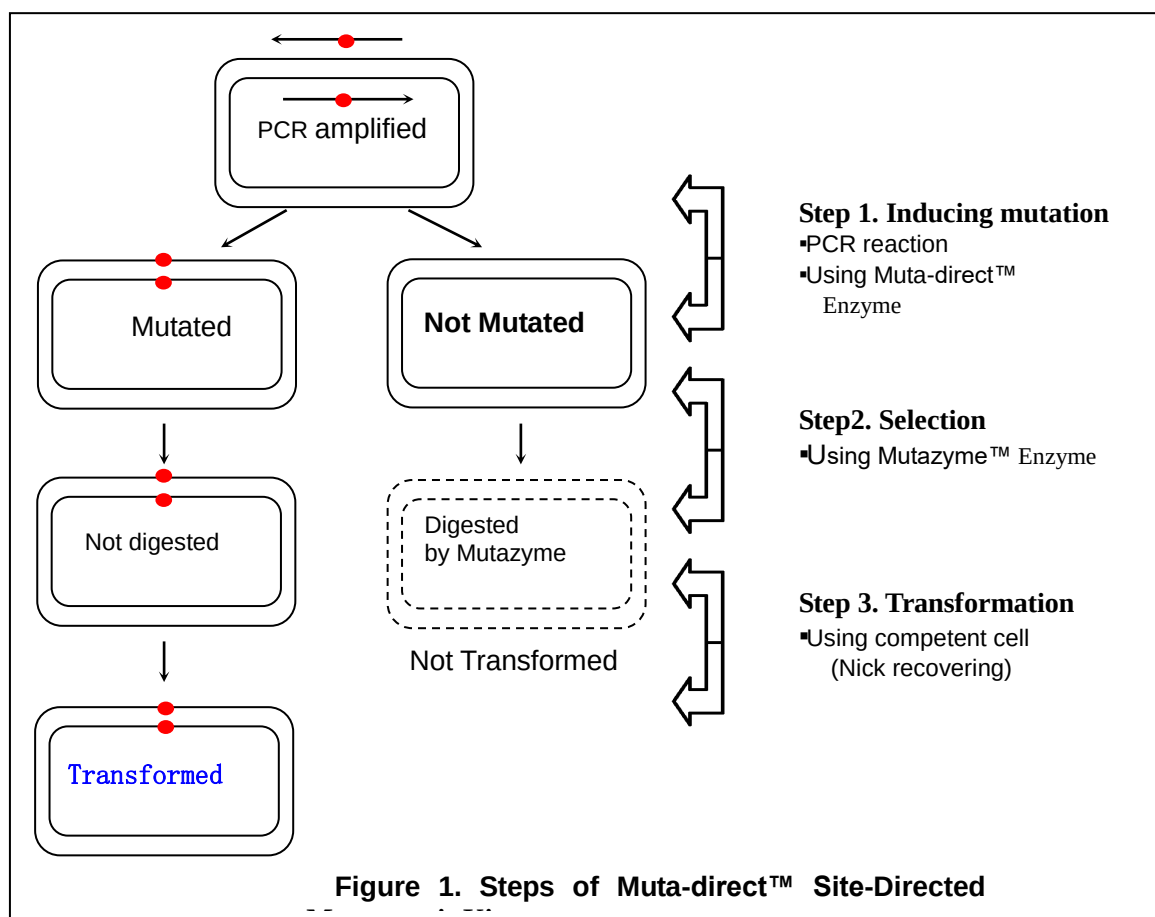


Muta-direct™定点突变试剂盒 使用说明

概述

Muta-direct 定点突变试剂盒可以在克隆于质粒 DNA 序列的特定位点诱导突变，理论上可以保证突变率达到 100%，整个实验过程简单快捷、只有两步，而不需要用到 M13 载体和甲基化步骤。该试剂盒可以诱导某个已知基因的特定碱基进行定点突变、再突变成野生型、密码子突变、插入或者缺失等，因此可以用于功能基因组学和蛋白质组学的研究。另外由于试剂盒能够诱导特异基因突变，又可以应用于蛋白质工程学研究领域。定点突变试剂盒操作十分简单（根据我们提供的引物设计原则设计引物；用 Muta-direct™酶进行 15~18 个循环的 PCR 扩增反应；Mutazyme™酶处理选择突变克隆；转化）。理论上在 LB 平板上的克隆 100%是突变克隆，通过对突变克隆的测序分析，正确的突变可以应用于后续实验。



产品特点

- 操作简便，无需特殊的实验技能
- 2~3 天即可完成基因的定点突变

- a) 整个实验过程只需要用到两种酶：Muta-direct™酶和 Mutazyme™酶
- b) 广泛的使用范围：可以用于点突变(Point mutation)，缺失突变(Deletion)和插入突变(Insertion)等。
- c) 100%的突变效率

贮存条件

请将试剂盒中提供的各种试剂于-20℃贮存。由于试剂盒中提供的反应缓冲液及 dNTP 是为反应专门优化的，所以不要用其它的反应缓冲液及 dNTP 代替。

试剂盒组成

试剂盒提供的对照模板及引物，可以完成 5 次对照实验。包括对照反应在内，本试剂盒共可进行 15 次基因定点突变反应（每次反应体系 50μl）。

组成	次量
Muta -Direct™ Enzyme (2.5U/μl)	15μl
Muta-Direct™ Reaction Buffer (10×)	100μl
dNTP Mixture	30μl
Mutazyme™ Enzyme (10U/μl)	15μl
pUC18 Control Plasmid (10ng/μl)	10μl
Control Primer Mix (20pmol/μl)	15μl
Competent cells	Not provided

定点突变对照实验

试剂盒中提供的对照质粒为 pUC18，通过它可以判断实验的成功与否。pUC18 质粒包含 *lacZ* 基因，用试剂盒中提供的对照引物可以诱导 pUC18 中丝氨酸 (TCG) 突变为终止密码子 (TAG)，这样会导致 *lacZ* 基因失活，因此 LB 平板上的克隆必须都为白色才证明突变成功。对于首次做突变实验的用户，可以通过对照反应观察实验是否成功。

引物设计

- 首先需要进行引物设计，设计时请参考如下原则。
 - 通常引物长度为 25~45mer，我们建议引物长度为 30~35mer。
- 注：突变位点应该设计在引物的中央位置。
- 如果设定的引物长度为 30mer，接下来需要计算引物的 T_m 值，看是否达到 78℃ (GC 含量应大于 40%)。
 - 如果 T_m 值低于 78℃，则适当改变引物的长度以使其 T_m 值达到 78℃ (GC 含量应大于 40%)。
 - ①设计上下游引物时确保突变点在引物的中央位置。
 - ②计算引物的 T_m 值，看是否达到 78℃，如果 T_m 值低于 78℃，则适当改变引物的长度以使其 T_m 值达到 78℃ (GC 含量应大于 40%)。
 - ③最好使用经过纯化的引物。

T_m 值计算公式：T_m=0.41×(% of GC)–675/L+81.5

注：L：引物碱基数；% of GC：引物 GC 含量。

引物设计实例

以 GCG→ACG 为例：

5' -CCTCCTTCAGTATGTAGGCGACTTACTTATTGCGG-3'

① 首先设计 30mer 长的上下游引物，并将 A(T) 设计在引物的中央位置。

Primer #1: 5' -CCTTCAGTATGTAGACGACTTACTTATTGC-3'

Primer #2: 5' -GCAATAAGTAAGTCGTCTACATACTGAAGG-3'

② 引物 GC 含量为 40%，L 为 30，将这两个数值带入 T_m 值计算公式，得到其 $T_m=75.5$ ($T_m=0.41 \times 40 \times 675/30 + 81.5$)。通过计算可以看出其 T_m 低于 78°C ，这样的引物是不合适的，所以必须调整引物长度。

③ 重新调整引物长度。

Primer #1: 5' -CCTCTTCAGTATGTAGACGACTTACTTATTGCGG-3'

Primer #2: 5' -CCGCAATAAGTAAGTCGTCTACATACTGAAGGAGG-3'

在引物两端加 5mer (斜体下划线处)，这样引物的 GC 含量为 45.7%，L 值为 35，将这两个数值带入 T_m 值计算公式，得到其 T_m 为 80.952 ($T_m=0.41 \times 47.5 \times 675/35 + 81.5$)，这样的引物就可以用于突变实验了。

实验前注意事项

- 试剂盒提供了优化的实验方案，按步骤操作诱导目的基因突变率几乎可达 100%。
- 白色菌落的形成与突变效率是不同的，在实验过程中重要的是出现白色单菌落而不是菌落出现的数量。如果出现白色菌落则证明在目的基因上已经发生了突变。有时由于 Mutazyme™处理步骤的失误，残留的模板质粒也能形成白色菌落。但如果您操作无误，这种情况一般不会发生。
- 白色菌落的数量与突变率是没有直接关系的，而与 PCR 反应条件和感受态细胞转化效率有关。
- 如果突变没有出现在目的核苷酸上时，请检测合成引物的纯度。
- 当 PCR 反应完成后，Mutazyme™酶的用量就会影响到实验结果。若模板过量会产生阴性结果，因此 Mutazyme™和质粒模板的用量必须适当。
- 试剂盒适用于 15kb 甚至大于 15kb 的模板突变，但是当所用的质粒模板大于 10kb 时，白色菌落数量会减少，不过这与突变效率没有关系。

定点突变操作步骤

[A] 诱导突变基因 (PCR 反应) 以待突变的质粒为模板，用设计的引物及 Muta-direct™酶进行 PCR 扩增反应，诱导目的基因突变。

- 设计点突变引物。

[注]参考引物设计指导

- 准备模板质粒 DNA

[注]用 *dam*⁺ 型菌株 (例如 DH5 α 菌株) 作为宿主菌。在 *end*⁻ 型菌株中常有克隆数低的现象，但是对突变效率没有影响。提取质粒 DNA 时我们建议您使用本公司的质粒提纯试剂盒。

- [选项]对照反应体系 (50 μl 反应体系)

10 $\times$ Reaction Buffer	5 μl
pUC18 control plasmid (10ng/ μl , total 20ng)	2 μl

Control primer mix (20pmol/μl)	2 μl
dNTP mixture (each 2.5mM)	2 μl
ddH ₂ O	38 μl
Muta-direct™ Enzyme	1 μl
● 样品反应体系 (50 μl 反应体系)	
10×Reaction Buffer	5 μl
Sample plasmid (10ng/μl, total 20ng)	2 μl
Sample primer (F) (10pmol/μl)	1 μl
Sample primer (R) (10pmol/μl)	1 μl
dNTP mixture (each 2.5mM)	2 μl
ddH ₂ O	38 μl
Muta-direct™ Enzyme	1 μl
● PCR 反应条件	

[注]按如下参数设置 PCR 扩增条件。

Cycles	Temperature	Reaction Time
1cycle	95°C	30sec
15cycle	95°C	30sec
	55°C	1min
	72°C	1min per plasmid Kb

- PCR 扩增反应完成后冰育 5 分钟，然后置于室温（避免反复冻融）。

[注] 按下列提供的 PCR 条件进行扩增，控制 PCR 循环数。注意当突变点位点超过 4 个时会发生突变率降低的现象。

Mutation	Cycles
1~2Nucleotide	15cycles
3Nucleotides	18cycles

[B] 突变质粒选择

PCR 反应结束后使用 Mutazyme™酶消化甲基化质粒从而选择突变质粒 DNA。

1. 准备 PCR 反应产物。
2. 加入 1 μl (10U/μl) Mutazyme™酶 37°C 温育 1 小时。

[注]当质粒 DNA 用量过多时 Mutazyme™酶可能发生与样品反应不完全的现象。因此我们建议为了保证突变率请严格遵照实验步骤进行操作。如果突变率低，可以适当延长反应时间或增加 Mutazyme™酶用量。

[C]转化

反应完毕后在质粒 DNA 上会产生缺口，当把这个质粒 DNA 转入 *E. coli* 中时请选择 *dam*⁻型菌株，例如 DH5 α。

1. 将 10 μl 样品加到 50 μl 感受态细胞里，然后放置在冰上 30 分钟。
2. 接下来可以参照一般的转化步骤进行。

序列分析

通常当 LB 平板上出白色菌落则表明发生了突变。

为了证实这一结果，我们建议对白色单菌落进行测序分析。

突变实例

以 GGC→GAC 为例

[突变反应体系]

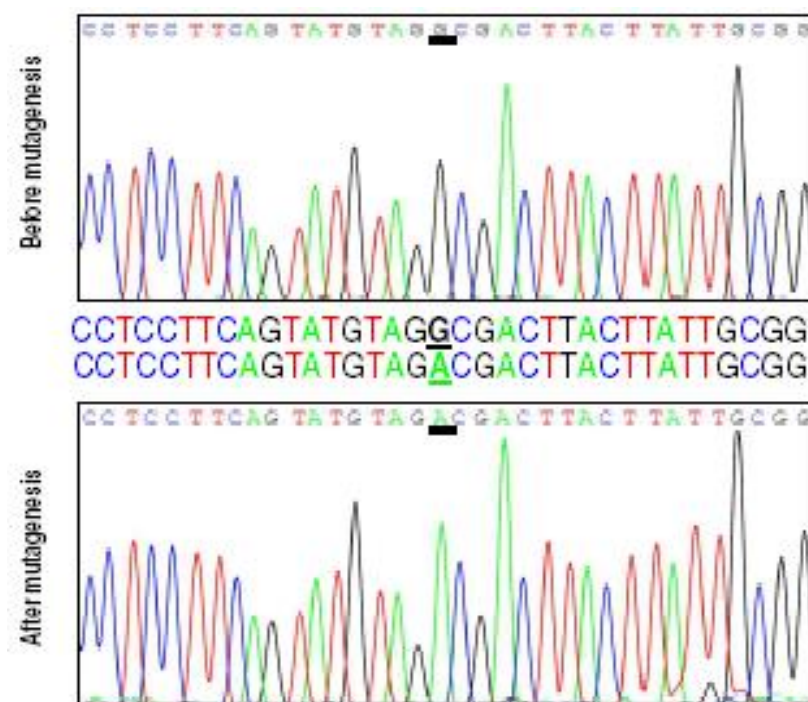
10×Reaction Buffer	5μl
Sample plasmid (6.3Kb, 10ng/μl, total 20ng)	2μl
Sample primer (F) (10pmol/μl)	1μl
Sample primer (R) (10pmol/μl)	1μl
dNTP mixture (2.5mM each)	2μl
dH ₂ O	38μl
Muta-direct™ Enzyme	1μl

[PCR 条件]

Cycles	Temperature	Reaction Time
1cycle	95°C	30sec
15cycle	95°C	30sec
	55°C	1min
	72°C	1min per plasmid Kb

[序列分析]

突变质粒测序结果



常见问题	解决方案
无单菌落出现	通过电泳检测 PCR 反应体系
	如果是 PCR 反应的问题可以通过调节退火温度进行解决
	检测感受态细胞的转化效率
突变率低	Mutazyme™酶处理不当
	增加 Mutazyme™酶用量或延长反应时间
	检查模板质粒用量
	质粒用量过多会引起突变率降低
错误突变	检测合成引物的质量