随机点突变试剂盒

产品编号	规格
MSM5304-20	20 rxn

保存条件及效期：

−20℃保存，有效期一年；经常使用，可于 4℃保存，有效期三个月。

产品描述：

随机突变是阐述蛋白质结构和功能之间的关系、改进蛋白质性能的重要工具。Mut 随机突变试剂盒基于易错 PCR (error-prone PCR) 技术，利用 Taq DNA polymerase 不具有 3‘→5‘校对功能的特性，在特定的反应缓冲体系中，向扩增的目的基因中引入随机突变密码子。带有随机突变的扩增产物通过双酶切，连接到表达载体中构建文库，然后转化入表达宿主中，进行蛋白活性筛选。如果经一次突变反应不能获得满意的结果，可采用连续易错 PCR (sequential error-prone PCR)策略，即将一次 PCR 扩增得到的有用突变基因作为下一次 PCR 扩增的模板，连续反复地进行随机诱变，使每一次获得的突变累积而产生更有意义的突变。

本试剂盒包含有优化的 2 x Mut Random System、Mut Enhancer 和 ddH2O 三种组分，使用时只需加入适量的 DNA 模板和合成的两条扩增引物，并用水补足体积，即可进行扩增反应，操作简便快速，大大减少了多次加样可能造成的出错和污染机会。2 x Mut Random System 含有优化浓度的 Taq DNA polymerase、dNTPs、反应缓冲液和稳定剂，可最大限度地克服常规易错 PCR 技术中，由于 Taq DNA polymerase 本身的偏爱性造成的以 GC 突变为主的缺点，获得相对均衡的突变谱。碱基突变率可通过适量添加 Mut Enhancer、调整模板 DNA 量和改变 PCR 扩增循环数进行控制。

下表列出以 10 ng 质粒 DNA 为模板，PCR 扩增一条 1 kb DNA 片段(20 个循环)后测序检测得到的突变率结果。需要注意的是，由于不同 DNA 模板的碱基组成不同、长度不一，以及不同引物的扩增效率存在差异，所以即使在相同的 PCR 反应条件下，两组 PCR 产物所得到的突变率也可能不同。因此我们建议根据实验的具体要求，首先进行多个小体系(20 μl)扩增预实验，分别加入不同体积的 Mut Enhancer(如 0 μl、1 μl、5 μl、10 μl 等)，摸索出符合目标突变率的反应条件后，再放大扩增体系。其他影响突变率的因素见【注意事项】。

反应条件	1	2	3	4	5	6
Mut Enhancer (μl)	0	1	2.5	5	10	20
突变碱基的个数/1 kb	0~1	0~3	0~4	1~6	3~10	5~18
平均突变碱基数/1 kb	0.3	1.6	2.3	4.1	6.5	10.2

产品组分:

2 x Mut Random System	0.5 ml
Mut Enhancer	0.1 ml
ddH_2O	1 ml

使用方法：

1．引物设计原则：

1) 正、反向扩增引物各一条，长度约 20~45 个碱基，3 ‘端分别与目标突变 DNA 片段的上下游结合；

2) 尽量将引物的 GC 含量控制在 40~60%；

3) 引物如带有克隆酶切位点，必须添加足够的保护碱基以确保酶切效率；实验证明，引物结合在目标 DNA 片段的酶切位点外侧可提高酶切效率，增加转化的克隆数量。

2．定点突变反应：

(1)PCR 反应体系：

向 PCR 薄壁管中依次加入下列试剂

质粒 DNA 模板(1~10 ng/μl) *	1 μl
2 x Mut Random System	25 μl
正向扩增引物（10 μM）	1 μl
反向扩增引物（10 μM）	1 μl
Mut Enhancer	0~20 μl
ddH_2O 补足体积至	50 μl

(2)PCR 循环参数的设置：

95℃	2 min	
94℃	30 sec	16~25 cycles
50~65℃	1 min	
72℃	1 min/1 kb	
72℃	7 min	

突变率可通过改变起始模板浓度和扩增循环数进行控制。起始模板浓度越高，突变率越低；扩增循环数越高，突变率越高。

3．取 1~5 μl PCR 产物电泳检测条带浓度和特异性。

4．剩余的 PCR 产物电泳，切胶回收目标 DNA 片段。

5．酶切、连接、转化到表达宿主菌株中进行筛选。

注意事项：

1. 由于不同 DNA 模板的碱基组成不同、长度不一，以及不同引物的扩增效率存在差异，所以即使在相同的 PCR 反

应条件下，两组 PCR 产物所得到的突变率也可能不同。因此我们建议根据具体实验要求，首先进行多个小体系(20 μl)扩增预实验，分别加入不同体积的 Mut Enhancer(如 0 μl、1 μl、5 μl、10 μl 等)，通过测序或活性检测等方法，摸索出符合目标突变率的反应条件后，再放大扩增体系。

2. 起始 DNA 模板的浓度对突变率有很大影响，通常可通过提高或降低 DNA 模板的浓度来调整突变率。鉴于不同型号的分光光度计检测的 DNA 浓度存在偏差，DNA 模板最好在酶切线性化后，采用凝胶电泳方法，与已知浓度的线性化双链 DNA 或商品化的 DNA marker 进行对比，确定其浓度。
3. 突变反应产物必须进行切胶回收处理，去除 DNA 模板、PCR 产物上结合的 Taq 酶以及其他杂质。常规的乙醇沉淀、硅胶膜(珠)或玻璃奶吸附等方法，均无法去除结合的 Taq 酶，后者可能遮蔽酶切位点，影响克隆效率。
4. 建立随机突变文库通常需要 10~200 ng/μl (相当于 500 ng ~10 μg/50 μl 体系)的 PCR 产物。如遇产量不足，可通过下列方法提高产量：

(1) 突变率符合需求时，可放大 PCR 体系，或切胶回收 PCR 产物后，采用常规 PCR 反应条件进行扩增；
(2) 突变率低于需求时，提高 PCR 扩增循环数，或切胶回收 PCR 产物后，进行第二轮随机突变反应；
(3) 重新设计扩增引物;
(4) 降低退火温度；
(5) 确保模板质量，采用凝胶电泳方法精确定量。

5. 对于带有克隆酶切位点的 DNA 模板，必须在 PCR 反应结束后，使用 DpnI 完全消化清除甲基化的模板，再切胶回收目标 DNA 片段。对于非甲基化的质粒(例如从大肠杆菌 JM110 或 SCS110 菌株中提取的质粒)，可通过转化 dam + 的大肠杆菌菌株(如 DH5α、TOP10、JM109、XL1-Blue 等)，再抽提获得甲基化的质粒作为 PCR 反应模板。经过双酶切的克隆载体在插入突变 DNA 片段前，应首先通过自身连接检测，确保极低的自连背景。必要时可采用去磷酸化、切胶回收等方法把自连率降至最低，以免影响后续连接反应。