



产品描述

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，利用高保真的 ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase 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：< 10kb 甲基化质粒中核苷酸的突变。

产品应用

用于简单、快速、高效的基因突变。

产品组成

组份	PT201 10rxn	PT201 20rxn
ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase	5 µl	10 µl
10× ProMan Pfu Buffer	50 µl	100 µl
Dpn I	5 µl	10 µl
Ultrapure dNTP Mix (PCR Grade) 10mM each	25 µl	50 µl

产品储存

-20°C保存，避免反复冻融。

产品特点

操作简单，一个PCR管中完成所有操作；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；使用Dpn I去除非突变模板，突变效率高达90%。

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25-30bp，3'端延伸区长度大约是10-15bp。
- 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10-15bp，右侧3'端20-25bp。
- 3、计算引物的Tm值，看是否达到78°C，如果Tm值低于78°C，则适当改变引物的长度以使其Tm值≥ 78°C。

定点突变Tm值计算公式： $Tm = 81.5 + 0.41 \times (\%GC) - 675/L - \%mismatch$

注：L：引物碱基数；%GC：引物GC含量百分数；%mismatch：突变位点数/引物长度数的百分数。

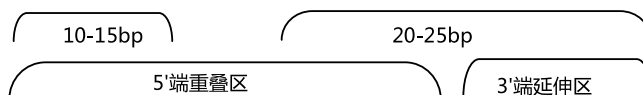
缺失或者插入Tm值计算公式： $Tm = 81.5 + 0.41 \times (\%GC) - 675/L$

注：L：引物碱基数，不包括插入碱基或者缺失碱基数；%GC：引物GC含量百分数

- 4、引物应该选择PAGE或者更高的纯化方式，GC含量应大于40%，3'端为一个或者更多个G/C结尾。
- 5、举例：GCGATT 连续突变前 4 个碱基成为 AAGCTT（引入一个 Hind III 酶切位点）

突变前序列：CTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAG **GCGATT** AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAG

GACCGCTTCCCCCTACACGACGTTT **CGCTAA** TTCAACCCATTGCGGTCCCAAAGGGTC



设计突变引物：GATGTGCTGCAAG **AAGCTT** AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAG

GACCGCTTCCCCCTACACGACGTTT **TCGAA** TTCAACCCATTGC



建议PCR条件(25μl反应体系)

RNase free ddH ₂ O	to 25μl
Template	10-20ng
Forward Primer (10 μM)	1 μl
Reverse Primer (10 μM)	1 μl
Ultrapure dNTP Mix (PCR Grade) 10mM each	1 μl
ProMan Super-Fidelity DNA Polymerase	0.5 μl

注意：如质粒大于4kb，dNTPs使用量为2 μl。

PCR 循环

94 °C	3-5 min	} 20-25 cycles
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	1 kb/2min	
72 °C	10 min	

电泳检测

取5 μl PCR产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。如能看见目的条带, 则已成功大半; 注意即使未见条带或者见到目的条带外还有其它条带, 也可以继续进行后续步骤。

PCR产物的消化

直接加 0.5 μl Dpn I酶于PCR产物中 (约20 μl), 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5-10 μl Dpn I酶消化产物于50 μl-100 μl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100-150 μl, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板, 培养过夜)。

注意：如无克隆生长, 或克隆数少, 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。

实验原理
