

M5 SuperLong Gene Site-Directed Mutagenesis Kit 超长基因点突变试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 SuperLong Gene Site-Directed Mutagenesis Kit	10T	MF296-01

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 24 个月。

【产品概述】

本试剂盒采用反向 PCR (Inverse PCR) 技术,对含有目标基因的双链环状质粒进行扩增,直接导入突变序列,从而实现单个或多个邻近碱基的突变 (mutation)、缺失(deletion)、或插入(insertion)。该技术的原理如右图所示。首先以甲基化的质粒 DNA 为模板,使用人工合成含有目的突变碱基的引物进行扩增反应,然后用 DpnI 限制性内切酶消化不含突变的质粒模板,再进行转化和筛选。

本试剂盒采用保真性能和扩增效率俱佳的 SuperMut XL Enzyme,能够快速扩增 15 kb 以下的质粒 DNA (15~30 sec/1 kb),最大限度地保持扩增质粒的保真性,大大缩短反应时间。该方法操作简单快捷,突变阳性率高,对引物设计的要求相对宽松、灵活。严格按说明书操作,6 个以下连续碱基的突变率可达 90%以上,最多可实现 21 个连续碱基的插入或删除。

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。

本试剂盒提供一个 4.5 kb、含有突变的 *lacZ* 基因的对照质粒(Control Plasmid)。质粒转化大肠杆菌后在含 Amp、IPTG 和 X-gal 的琼脂平板上呈白色菌落;采用试剂盒提供的 Control Primers 成功进行突变反应后,菌落呈现蓝色,可据此检测突变效率。

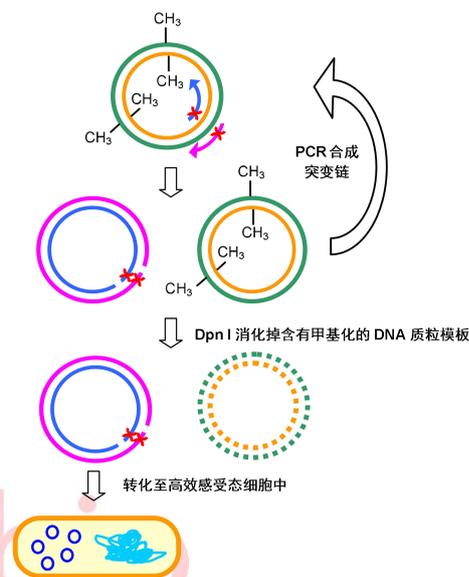


图 1. SuperMut 超长基因定点突变试剂盒原理和操作流程示意图

【产品组分】

SuperMut XL Enzyme*	8 μl
5 x SuperMut XL Reaction Buffer [†]	100 μl
High-GC Additive*	30 μl
dNTPs*	25 μl
Dpn I (10 U/μl)*	12 μl
Control Plasmid (5 ng/μl)*	10 μl
Control Primers (10 μM of each)*	10 μl
ddH ₂ O	1 ml

* 使用前请先短暂离心; [†] 使用前请完全解冻并充分混匀

【操作步骤】

1. 引物设计原则:

- (1) 正、反向突变引物各一条,长度约 25~45 个碱基,分别包含带有突变点的互补区和 3' 端延伸区(见下图);
- (2) 突变点分别位于正、反向引物的互补区,互补区应包含至少 15 个碱基;
- (3) 引物突变点的 3' 端应包含 10~15 个与质粒模板互补的碱基;

5. 鉴定:

- (1) 以 18 个循环的定点突变反应为例(循环数增加, 克隆数量相应增加, 但可能增加非预期突变率), 使用转化效率在 10^8 cfu/ μ g DNA 的感受态细胞通常可得到数十个克隆。
- (2) 根据突变序列的长度, 取 3~5 个单个菌落进行测序, 以确认得到的克隆是否含有预期的突变序列。对于插入限制性内切酶位点的突变菌落, 可直接挑选 5~10 个单克隆菌落培养, 提取质粒进行酶切鉴定。
- (3) 对照点突变反应可根据下列公式计算突变率, 以判断试剂盒中的组分是否失效: 突变百分率=蓝斑数÷菌落总数 \times 100%

【点突变常见问题分析】

问题	可能原因	解决方法
没有或极少量菌落	转化失败	使用转化效率高于 10^8 cfu/ μ g DNA 的感受态细胞
		取 10 μ l PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测(EB 或其他高灵敏度方法染色), 即使有其他杂带, 只要可见一条大小与线形状态下的模板质粒相同的条带, 则提示有目标质粒, 可重新取 2~5 μ l DpnI 消化后的 PCR 产物进行转化
		如果使用了矿物油, 应尽量使用尖、细的枪头, 伸入到矿物油下方吸取反应液
	PCR 反应失败	如电泳检测未见目的条带, 则表示 PCR 产量不足, 应重新设置反应, 并适当增加循环次数; 建议设立对照反应
		使用高纯度的质粒 DNA 作为模板, 电泳检测质粒完整性和浓度
		可将 95 $^{\circ}$ C 预变性时间延长为 2 min, 退火时间延长至 50~60 sec
抗生素用错或浓度过高	使用适当浓度的抗生素琼脂糖平板	
突变阳性率过低	Dpn I 消化效果不佳	加入 Dpn I 后应混匀并短暂离心; 适当延长消化时间
	模板质粒用量过多	建议使用 1~10 ng 模板
	引物降解失效	适量分装, -20 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融
突变位点与预期不符	引物设计不理想	重新设计引物; 提高退火温度
	合成的引物质量较差或纯度不够	仅通过脱盐处理的引物突变效率偏低; 请选择可信赖的引物供应商, 使用 PAGE 或 HPLC 纯化级别的引物
菌落过多	Dpn I 消化不完全	加入 Dpn I 后应混匀并短暂离心; 适当延长消化时间
	未加抗生素或抗生素浓度过低	使用适当浓度的抗生素琼脂糖平板

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。