



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 010-82598075 82597807

Fax: 010-82597807

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

# Site-directed Gene Mutagenesis Kit 基因定点突变试剂盒

说明书版本 631051-1

(货号: RF301 20次)

## 一、产品简介:

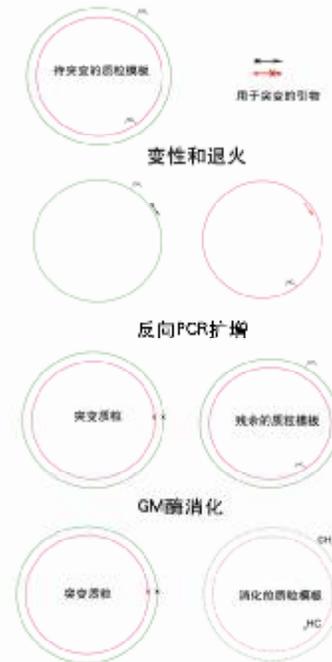
本产品采用高保真的 pfu 酶, 通过反向 PCR 法 (Inverse PCR) 进行定点突变。以环状 DNA (如质粒) 为模板, 以反方向设计的两条引物对质粒进行完整的 PCR, pfu DNA 聚合酶合成突变链; 随后使用 GM 酶消化 PCR 产物, 降解非突变型质粒模板 (甲基化质粒模板), 随后进行转化感受态细胞, 有效地筛选出突变克隆 (图一)。

本产品特征:

1. 采用部分重叠引物设计(图二), 使 PCR 呈指数扩增, 扩增产物凝胶电泳可见; 扩增产物为环状, 易于转化。
2. 突变的真实性: 可以得到高达 95% 的突变体。而且, 由于采用 pfu 高保真聚合酶, PCR 过程中的第二位点突变 (目标突变以外的突变) 的可能性极小。

## 二、保存条件:

-20℃保存, 有效期一年



图一 基因定点突变原理图

## 三、产品组成:

内容	RTF3101-01 (5次)	RTF3101-02 (20次)
pfu DNA 聚合酶 (2.5 U/μl)	20 U	100 U
2×pfu PCR buffer (含 Mg <sup>2+</sup> )	0.1 ml	0.5 ml
10mM dNTP	15 μl	50 μl
GM 酶 (5 U/μl)	6 μl	22 μl
pTGWB(Control plasmid,10ng/μl)	5 μl	25 μl
Control Primer(RV+FW,5 μM each)	5 μl	25 μl
DH5α 化学感受态细胞 (100μl/支)	5 支	20 支
Water(RNase-free,DNase-free)	1ml	1ml

## 四、使用说明

### 1. 引物设计(图二):

- (1) 共需设计两条部分序列重叠的引物。引物包含 5' 端重叠区和 3' 端延伸区。
- (2) 引物长度: 两条引物的长度大约 30-45 个核苷酸, 5' 端重叠区包含 15-20 个碱基, 3' 端延伸区包含至少 10 个碱基。
- (3) 突变引物: 突变点位于两条引物上; 正向引物的突变点位于重叠区下游, 紧邻重叠区; 反向引物的突变点位于 5' 端。
- (4) 引物 GC 含量: 在可能的情况下, 尽量把引物的 GC 含量控制在 40%-60%。

注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。

技术咨询电话: 400-699-0631

- (5) 在可能的情况下,尽量使引物不要产生非常稳定的二级结构和引物二聚体。二级结构和二聚体可以通过一些软件进行分析,如 Oligo。
- (6) 最好使用经过 PAGE 纯化的引物或更高纯度的引物。



图二 引物设计举例:

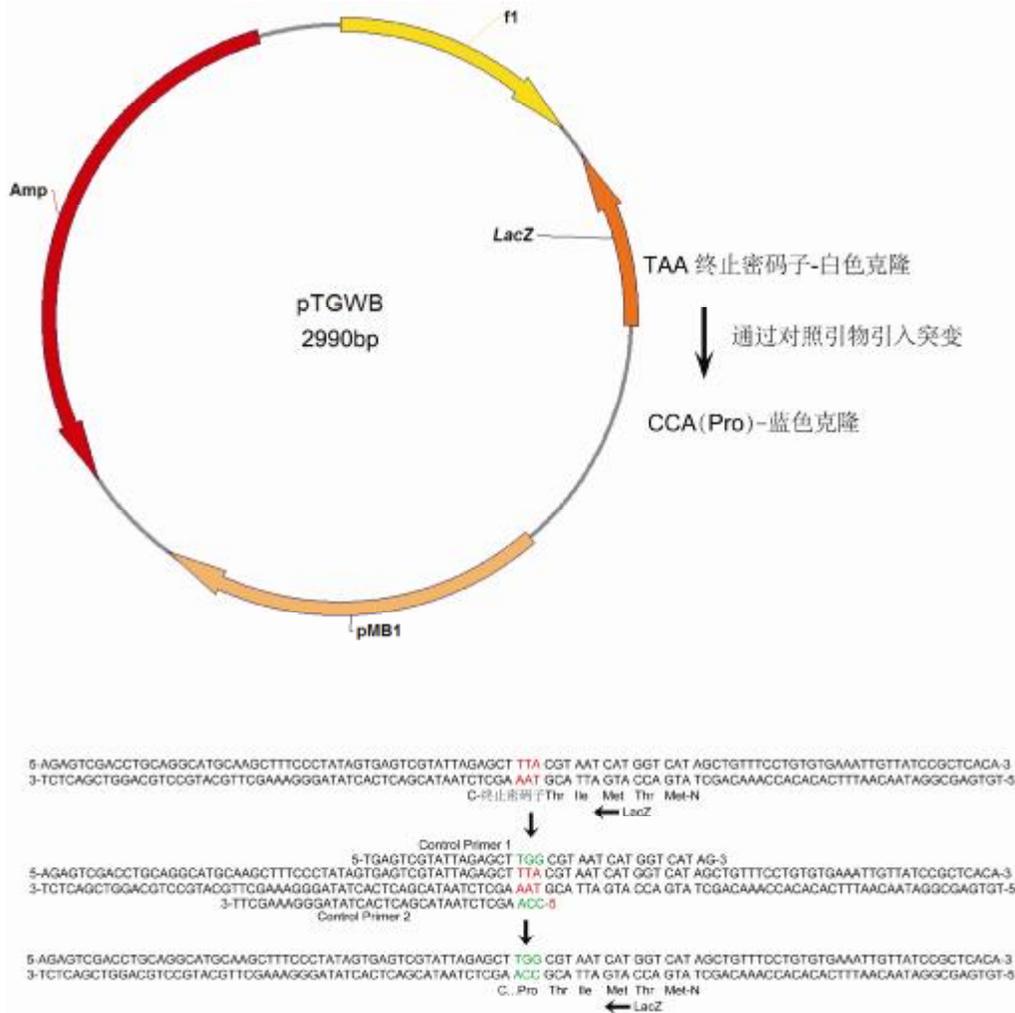
2. 待突变模板质粒的选择:

必需使用从 *dam*<sup>+</sup> 的大肠杆菌(这类菌中质粒可以被甲基化)中抽提得到的质粒用于基因定点突变, 如 DH5 $\alpha$ 、JM109 等。

选择 GC 含量在 40-55% 的待突变模板质粒, 并且每一个 50bp 左右的局部 GC 含量最好也不超过 70%。如果 GC 含量过高, 请先把目的基因克隆到其它合适的载体上, 再进行基因定点突变反应。另外目的基因 GC 含量最好也在 40-55% 的范围, 并且每一个 50bp 左右的局部 GC 含量最好也不超过 70%。如果目的基因 GC 含量过高, 而突变位点不在高 GC 含量区域, 可以先把该基因的不含高 GC 含量的一个区域克隆出来, 进行定点突变, 然后再把突变后的片断克隆回原基因中。如果必需使用高 GC 含量的质粒模板, 或者有局部高 GC 含量的质粒模板, 请另外使用专门用于高 GC 含量模板的 PCR 反应试剂。

3. 对照质粒:

本试剂盒中含有对照质粒 (pTGWB), 其 *LacZ* 基因已经突变, 第 6 个氨基酸密码子突变为 TAA (终止密码子) (图三)。当被转化入大肠杆菌后, 在 X-Gal 板上形成白色菌落。利用试剂盒添附的对照引物进行突变反应后, 该密码子可从 TAA (终止密码子) 恢复为 CCA (Pro), 转化后可在 X-Gal 板上产生蓝色菌落, 这样就可以简单地确认突变反应是否正确进行。根据本实验操作步骤进行该突变反应, 通常可获得 80% 以上的蓝色菌落。



注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。  
 技术咨询电话: 400-699-0631

图三 对照质粒突变示意图

4. 基因定点突变反应:

PCR 反应体系

	标准反应	对照
待突变的质粒	1-10 ng*	-
对照质粒 (10 ng/μl)	-	1-10 ng
对照引物 (RV+FW, 5 μM each)	-	2 μl
正向突变引物 (10 μM)	1 μl	-
反向突变引物 (10 μM)	1 μl	-
10× pfu PCR buffer	5 μl	5 μl
10mM dNTP	1 μl	1 μl
pfu DNA 聚合酶	1 μl	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 μl	up to 50 μl

\*: 待突变的质粒不要加入太多, 10ng 足矣。太多的质粒会导致后续的 GM 酶消化不完全。

PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	94℃	5 min	1
变性	94℃	30 sec	30
退火	55℃	30 sec	
延伸	72℃	2 min/kb*	
最后延伸	72℃	10 min	1

\* 延伸时间已 2 min/kb 表示, 如果突变质粒长度为 4kb, 则延伸时间为 8 分钟。

5. 电泳检测:

取 5 μl PCR 产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

注意: 即使观察到多条扩增条带, 如果目的条带大小正确, 可继续用 GM 酶消化及转化反应。

6. GM 酶消化反应:

PCR 产物中 (约 50 μl) 加入 1 μl GM 酶, 混匀, 37℃ 孵育 1 h。消化完毕后可以直接用于转化, 或者 -20℃ 保存备用。

7. 转化:

- 加入 5-10 μl GM 酶消化产物于 100 μl 感受态细胞中 (在感受态细胞刚刚解冻时加入连接产物), 轻弹混匀, 冰浴 20 分钟。
- 42℃ 准确热激 90 秒, 立即置于冰上 2 min。
- 加 250 μl 平衡至室温的 LB 或 SOC 培养基, 120 转, 37℃ 培养 40 分钟。
- 取 200 μl 菌液铺板, 37℃ 培养过夜。

8. 结果:

通常会得到 50 个以下的克隆。如果发现克隆有上千个, 那么肯定是有哪里出了问题。挑取 4-8 个菌落, 小抽质粒, 用内切酶处理后电泳, 根据酶切结果确认是否突变。然后对必要片段测序以确定序列。

对于对照实验, 如用 10<sup>9</sup> 的感受态细胞转化, 可得到 50-100 个菌落。如果操作恰当, 蓝色菌落 (突变体) 应占 80% 以上。

五、常见问题分析

现象	可能原因	解决方案
得不到克隆或克隆数很少	反向 PCR 扩增不佳	进行预实验对引物和 PCR 条件进行确认和优化, 以得到特异性条带; 或凝胶回收 PCR 产物进行后续实验。
	目的片段扩增量少	增加反向 PCR 的循环数。
	感受态细胞转化率低	感受态细胞的转化率至少需要 10 <sup>9</sup> 。

注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。  
技术咨询电话: 400-699-0631

克隆数太多（远远超出预计数量）	质粒 DNA 模板未甲基化	使用 dam <sup>+</sup> 菌株来源的质粒做模板
	LB 培养板上抗生素失效或浓度不足	重新制备 LB 平板（抗生素平板在 4℃ 下通常可保存 1 个月）
对照反应中，产生的菌落都是白色或大多数是白色	IPTG/X-Gal 浓度低	确认 LB 板的 IPTG/X-Gal 是否有效，同时确认抗生素是否有效。
	使用的大肠杆菌菌株不能进行蓝白筛选	换用 DH5α, JM109 等可进行蓝白筛选的菌株。
得不到目标突变体（产生的质粒比原模板质粒小）	反向 PCR 扩增不佳（质粒小很可能是引物错配造成）	进行预实验对引物和 PCR 条件进行确认和优化，以得到特异性条带；或凝胶回收 PCR 产物进行后续实验
得不到目标突变体（产生的质粒没有发生突变）	反向 PCR 扩增不佳	进行预实验对引物和 PCR 条件进行确认和优化，以得到特异性条带；或凝胶回收 PCR 产物进行后续实验。
	质粒 DNA 模板未甲基化。	使用 dam <sup>+</sup> 菌株来源的质粒做模板