

M5 Multi Site-Directed Mutagenesis Kit

多位点基因突变试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	10T	MF297-01

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 24 个月。

【产品简介】

定点突变是一种广泛应用的分析蛋白和 DNA 的非常有利的工具。普通的定点突变试剂盒通常是基于反向 PCR 技术，采用高保真耐热 DNA 聚合酶和互补的突变引物向目的基因引入单个碱基或多个邻近碱基的突变、缺失、或插入。当遇到多个位点突变的需求时，利用单点突变试剂盒只能对目标位点逐一引入突变，耗时费力。M5 Multi Site-directed Mutagenesis (MSDM) Kit 突破了传统的定点突变方法，只需要一步 PCR 反应，即可引入多个目标突变，操作简单快捷，突变阳性率高。该试剂盒针对单个目标突变只采用一条磷酸化的突变引物，利用 M5 MSDM Enzyme 的耐热 DNA 聚合酶活性合成与模板互补的带有突变的 DNA 链，然后通过该酶的连接酶活性修复突变 DNA 链之间的缺刻 (nicks)，使其连接成为一条与模板互补的突变单链 DNA。经过多个 PCR 循环反应后，带有多个特定突变的 DNA 链成倍增长，经过 DpnI 限制性内切酶消化不含突变的质粒模板，环化的单链突变 DNA 可直接进行转化，通过 DNA 测序或限制性内切酶消化等方法筛选出目标突变质粒。本试剂盒适用于 ≤6 kb 质粒的多点突变，根据质粒性质不同，最多可引入 5 个独立位点的突变、插入或删除。

【产品组分】

组分名称	10 T
M5 MSDM Enzyme	8 μl
10x M5 MSDM Buffer	100 μl
M5 dNTPs	25 μl
Dpn I (10 U/ml)	12 μl
ddH ₂ O	1 ml

【原理示意图】

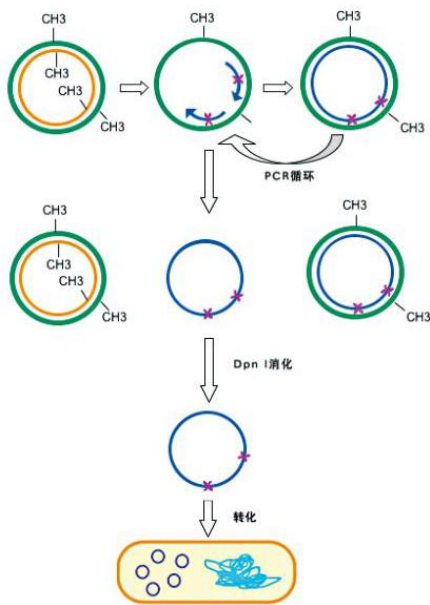


图 1 原理和操作示意图

【操作方法】

1、模板准备：

- A、请使用 6kb 以下的质粒作为模板，如果模板质粒过大，可将所需突变的序列亚克隆到较小的载体中，完成突变后再克隆到目的载体中。
- B、对于非甲基化的质粒（例如大肠杆菌 JM110 或者 SCS110 菌株中提取的质粒），可通过转化 dam+ 的大肠杆菌菌株（如 DH5a, TOP10, JM109, XL1-Blue 等），再抽提获得甲基化的质粒作为 PCR 反应模板。
- C、尽量采用高纯度的模板质粒，浓度调整为 50-100ng/μl。

2、引物设计原则：

- 1)、在所突变的碱基前后需要各保留 15 个与模板互补的碱基；
- 2)、多个突变引物的设计必须以质粒的同一条链为模板，向同一个方向延伸；
- 3)、引物在使用之前必须经过 5'-磷酸化处理，或者直接订购 5'-磷酸化引物；
- 4) 引物的 3'端应包含至少一个 G 或者 C 碱基，尽量避免 3 个以上的重复碱基，以免错配；
- 5) 尽量将引物的 GC 含量控制在 40-60%；
- 6) 请使用经过 PAGE 或者 HPLC 纯化的引物，否则会降低突变阳性率。

3、定点突变反应：

1)、设置 PCR 反应体系：

Template Plasmid (5~10 ng/μl)	1 μl
10x M5 MSDM Buffer	2.5 μl
Phosphorylated primers (10 μM of each)	2 μl
M5 dNTPs	1 μl
ddH ₂ O	补足至 17.5 μl

2)、加入 1 μl M5 MSDM Enzyme 混匀，短暂离心后，置于 PCR 仪中

3)、PCR 循环参数的设置：

95°C 2 min

以下重复 30 个循环

95°C 1 min

55°C* 1 min

65°C 2 min/1 kb**

* 退火温度°C 取决于多个引物中最低的 T_m 值。

** 比如：5kb 质粒延伸时间为 10min。

4、待反应冷却到室温以下后，加入 1μl DpnI，混匀后短暂离心，37°C 温育>1 小时（可以反应过夜）。DpnI 消化完毕后可以直接用于转化，或-20°C 保存备用。

5、转化、培养

- 1) 将感受态细胞置于冰上融解，如需分装，请使用 4°C 预冷的 0.5ml 或者 1.5ml 离心管。
- 2) 取 2-5μl DpnI 消化过的 PCR 反应液加入 50-100μl 感受态细胞中，混匀，冰中放置 10-30 分钟。
- 3) 42°C 加热 45-60 秒后，冰中放置 2 分钟。

4) 加入 800 μ l SOC 或者 LB 培养基, 37°C 振荡培养约 40 分钟。

5) 将转化后的菌液离心浓缩后, 均匀涂布到一块含有适当抗生素的 LB 琼脂平板上, 37°C 温箱倒置培养过夜。

6、鉴定

根据突变的复杂程度, 取适量单个菌落进行测序, 以确认得到的克隆是否含有预期的图标序列。对于插入限制性内切酶位点的突变菌落, 可以直接挑选 10 个左右的单克隆菌落培养, 提取质粒进行酶切鉴定。

【注意事项】

1. 如果转化后无单菌落出现, 请检查 PCR 的条件。
2. 如果电泳没有正确大小的条带出现, 请调整 PCR 的退火温度。
3. 如果不是 PCR 的问题造成, 请检查感受态的转化效率及筛选培养基平板。
4. 原始质粒的加入量需严格控制, 尽量不要超过 10 ng/ μ l;
5. 如出现突变效率低的情况, 请检查模板质粒的加入量。



【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。