

EasyMut gene multisite mutagenesis kit

产品信息:

组分	CL307-01 (20 rxns)
2×Xerox PCR Master Mix	1mlx2
2×Seamless Cloning Mix	100 μl
ddH ₂ O	1 mlx2
NEB10-beta Competent Cell	20 支(100 μl/支)

产品储存: 请按产品指示温度保存各成分

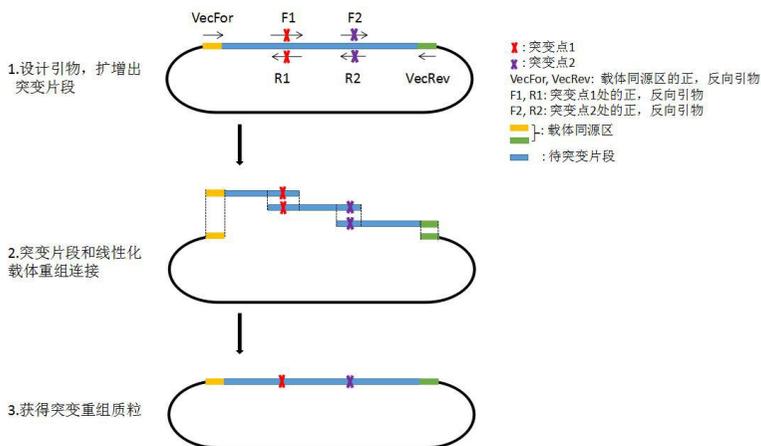
产品介绍:

本产品利用无缝克隆技术来实现基因的定点突变,可用于单点突变和多点突变质粒的构建。本产品无需除去甲基化模板质粒,无需 PCR 扩增出整个质粒,并且引物设计更加简便快速,因此可以更加快速,高效地实现定点突变。

产品特点:

1. 利用 2×Xerox PCR Master Mix 扩增片段,缩短扩增时间(2-4 kb/min),提高保真性;
2. 引物设计更加简单,快速;
3. 省略消化甲基化模板质粒的步骤,更加快速,高效;
4. 无需 PCR 扩增出整个质粒,减少载体的突变。

实验原理:



实验步骤:

一、突变位点的引物设计

1. 突变位点引物设计要求:

- (1) 在每个突变位点处需设计一对引物,且突变位点在重叠区约中部位置。可以先设计正向引物,然后通过反向互补得到反向引物。
- (2) 引物的长度通常为 30-40 个碱基,突变位点两侧的碱基数在 15-20 个左右,GC%含量在 40%-60%为最佳。
- (3) 避免引物末端为重复序列。

2. 引物设计示例:

(1) 单点突变引物设计: 如图 1

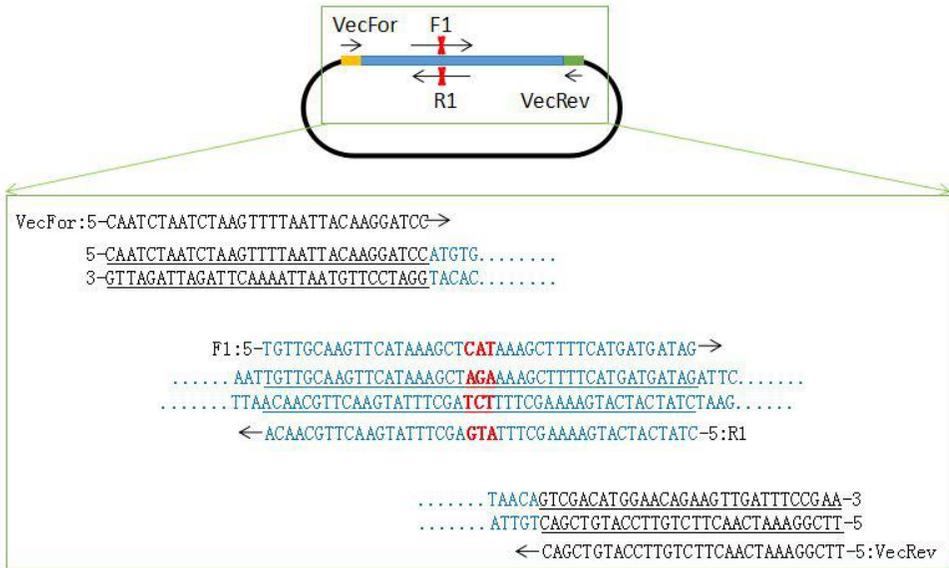


图 1

(2) 多点突变引物设计: 如图 2

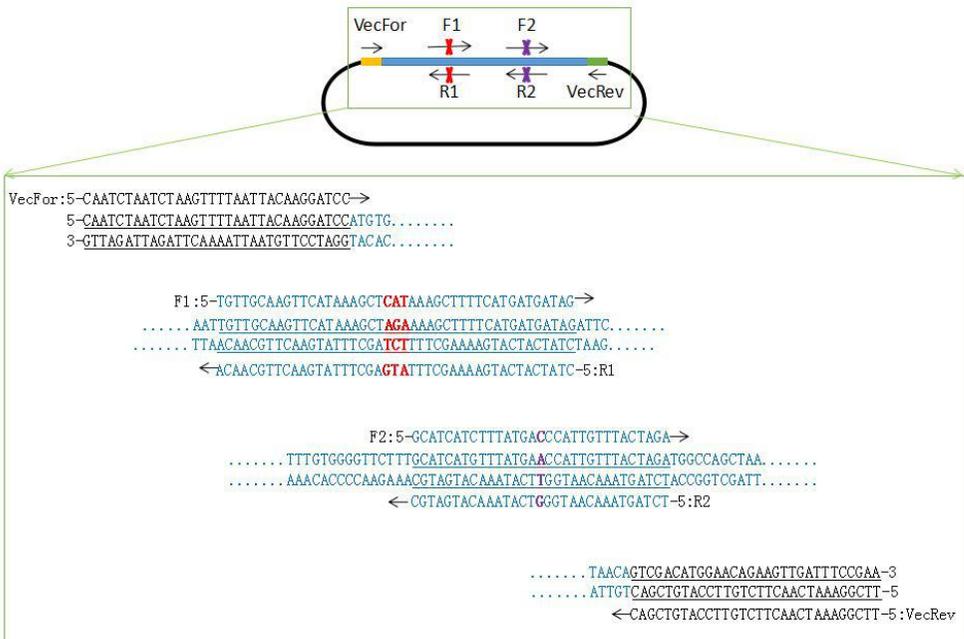


图 2

二、突变片段的制备

1. PCR 扩增

(1) PCR 扩增体系

Component	Volume	Final Concentration
2×Xerox PCR Master Mix	25 μ l	1×
Forward primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
Reverse primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
Plasmid template (10 ng/ μ l)	5 μ l	As required
ddH ₂ O	to 50 μ l	Not applicable

(2) PCR 扩增条件

Cycle step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	98°C	2 min	1
Denaturation	98°C	10 sec	25-30
Annealing	55°C-60°C	10 sec	
Extension	72°C	10-30 sec/kb	
Final extension	72°C	5 min	1
	4°C	Hold	1

注意：为了获得更高保真性的扩增产物，采用高浓度模板和少量 PCR 循环数组组合的扩增方法。

2. 纯化片段

(1) 电泳检测：取 10 μ l PCR 产物，根据片段大小选择合适浓度的琼脂糖凝胶电泳检测。

(2) 如果扩增片段单一，建议用 PCR 产物纯化回收试剂盒纯化片段；如果有非特异扩增，建议使用琼脂糖凝胶纯化回收试剂回收片段。

三、线性化载体的制备

可以通过酶切或 PCR 扩增的方法来制备线性化载体，且最好使用**空载体质粒**进行酶切或 PCR 扩增。

1. 酶切获得线性化载体

利用单酶切或双酶切对空载体进行线性化处理，一般双酶切比单酶切线性化效果好。载体的完全线性化是无缝连接成功的关键。单酶切或双酶切方式制备的线性化载体无需进行末端脱磷酸化处理。通过电泳方法判定载体线性化是否完全时，一定要用未酶切的质粒做对照一起电泳。酶切完成后建议采用胶回收方法纯化线性化载体。

2. PCR 扩增制备线性化载体

以空载体质粒为模板，设计一对引物用高保真 DNA 聚合酶（如 Xerox）扩增，制备用于重组的线性化载体。为防止残留环状载体质粒对克隆阳性率的影响，可以采用胶回收方法或者 Dpn I 消化结合胶回收的方法纯化线性化载体。

四、突变片段与线性化载体的重组连接

连接体系：

Component	Volume	Final Concentration
2×Seamless Cloning Mix	5 μ l	1×
Amplified fragment 1	1 μ l	50-100 ng
Amplified fragment 2	1 μ l	50-100 ng
.....
Amplified fragment N	1 μ l	50-100 ng
Linearized vector	1 μ l	50-100 ng
ddH ₂ O	to 10 μ l	Not applicable

轻轻混合，50℃反应 15 min（2-3 个片段，15 min；4 个片段以上，60 min），反应完成后，将离心管放在冰上数秒。

连接产物可直接用于转化或放于-20℃保存。

五、转化

1. 从-80℃冰箱中拿出感受态细胞，放于冰上溶解；
2. 取 5-10 μ l 连接产物加入到刚化冻的 50 μ l 或 100 μ l 感受态细胞中，轻轻混匀；
3. 冰上静置 20-30 min；
4. 42℃，热击 90 sec；
5. 冰上放置 2 min；
6. 加入 900 μ l 无抗性的 LB 液体培养基，200 rpm，37℃，培养 60 min；
7. 4000 rpm 离心 1 min，弃掉部分上清，保留 100-200 μ l，用吸头吹打悬浮菌体，取 100 μ l 菌液涂在相应抗性板上，37℃倒置培养过夜。

六、阳性克隆鉴定

1. 菌落 PCR 方法；
2. 限制性酶切分析方法；
3. DNA 测序方法

常见问题及解决方法：

1. 转化后没有克隆或克隆数少

（1）感受态细胞效率降低，请用 pUC19 检测一下感受态细胞的效率，确保转化效率在 10⁸ cfu/ μ g 以上。

（2）PCR 扩增的突变片段产物进行胶回收纯化，确定其条带的大小和单一性。

2. 转化后菌落有很多空载体质粒

这种情况主要是由于线性化载体制备不好造成的。鉴定一下质粒的质量，保证质粒完全酶切。如果内切酶无效也会产生这种现象。

3. 测序没有信号

（1）检查送测序的质粒和原始质粒酶切后是否大小完全一致。

（2）用测序引物对原始质粒测序，验证测序引物的有效性。