点突变快速克隆试剂盒

Point Mutation Rapid Cloning Kit

产品编号	状态	规格
E403E04-10	液体	10 reactions / 25 reactions

产品组成

2×PM PCR Premix	250 μL / 625 μL
DpnI	10 μL / 25 μL
使用说明书	1 份

产品应用

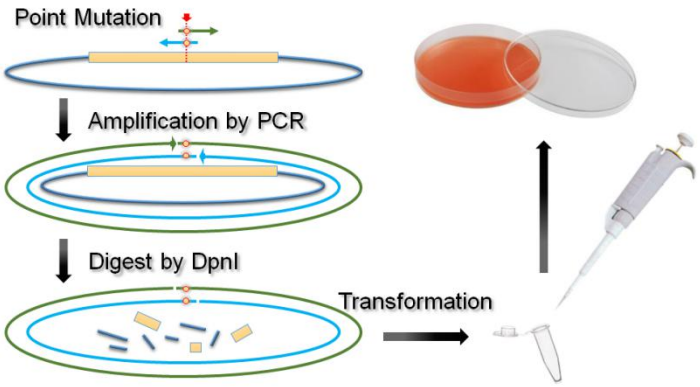
点突变

保存

-20°C 保存，有效期1年

避免稀释保存

实验流程



1. 引物设计：

   1.1 在引物序列中导入目的突变点

   1.2 使正反向引物 5`端之间互补序列>15bp

2. PCR 扩增质粒

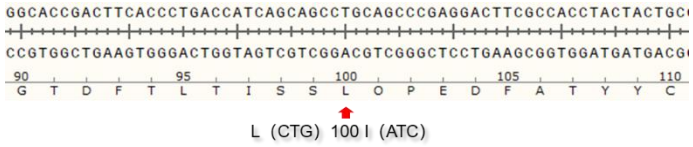
3. 加入 DpnI* 消化反应液中的模板 DNA

4. 将反应液与感受态混合，进行转化

*** DpnI：**DpnI 为限制性内切酶，识别序列为经甲基化的 GATC，GATC 在几乎所有质粒中多次出现。来源于菌体提取的模版 DNA，由于在菌体中经 dam 酶甲基化修饰，将被 DpnI 消化。而 PCR 反应合成的片段由于未经甲基化修饰，无法被识别消化而得以保留。

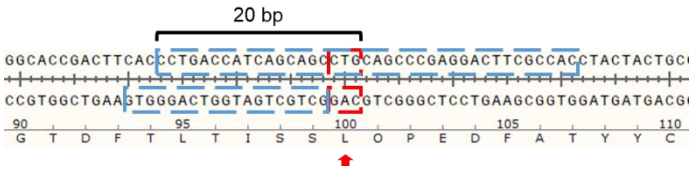
应用实例

实验一



1. 实验目的：

将原基因 100 位氨基酸 L 突变为 I



2. 引物设计

1. 突变点下游（3`）设计足够碱基，使引物在 PCR 过程中可以与模板顺利退火
2. 添加目的突变碱基（红框内序列）*
3. 两引物 5`设计 15-25 bp 互补序列（如图为 20 bp）

获得引物序列：

Forward：5`-CCCTGACCATCAGCAGCATCCAGCCCGAGGACTTCGCCAC-3`

Reverse：5`-GATGCTGCTGATGGTCAGGGTG-3`

3. PCR 扩增载体（~5000 bp）

PCR 体系

载体：	20 ng
引物（each）：	10 pmol
2×PCR Premix：	10 μL

	ddH2O：	upto	50 μL

PCR 程序

	95 ℃	3 min
20 Cycles	95 ℃	15 sec
	58 ℃	15 sec
	72 ℃	60 sec
	72 ℃	3 min
	4 ℃	∞

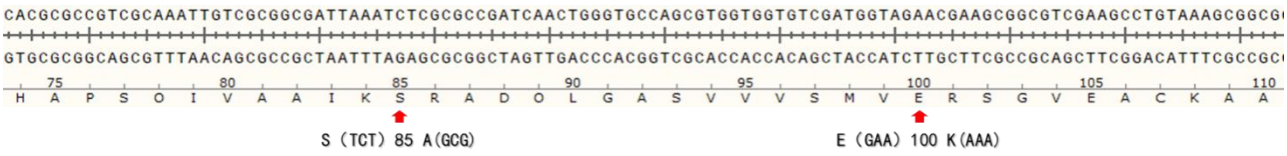
4. DpnI 处理 PCR 产物

向每 50 μL PCR 产物中加入 1μL DpnI，37°C 孵育 1 小时

5. 取 10 μL 转化，涂板

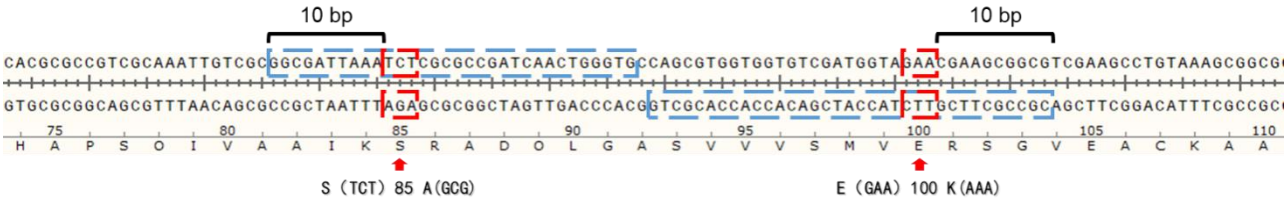
* **引物设计**时在保证引物 3`可顺利退火前提下，可在同一引物上导入多个突变。

实验二



1. 实验目的：

将原基因 85 位氨基酸 S 突变为 A，同时 100 位氨基酸 E 突变为 K



2. 引物设计

1. 突变点下游（3`）设计足够碱基，使引物在 PCR 过程中可以与模板顺利退火
2. 添加目的突变碱基（红框内序列）
3. 突变点上游（5`）设计>10 bp 可退火序列（如图为 10 bp）

获得引物序列：

Forward：5`-GGCGATTAAAGCGCGCGCCGATCAACTGGGTG-3`

Reverse：5`-CGCCGCTTCGTTTTACCATCGACACCACCACGCTG-3`

3. PCR 扩增载体（~5000 bp）

细节同实验一

4. DpnI 处理 PCR 产物

细节同实验一

5. 取 10 μL 转化，涂板

提示

- DpnI 可直接加入到 PCR 反应液中消化模板，该缓冲体系不影响 DpnI 活性。
- 模板用量过高或 DpnI 消化时间过短可能导致消化不完全，建议模板<200 ng，消化时间>45min。
- 本试剂盒使用高效高保真聚合酶，伸长反应速度可达 10 sec/Kb，适合扩增 10Kb 及以下片段。
- PCR 程序中循环数过多，会导致非目的突变产生，建议设置在 25 循环以下。
- 在保证引物 3`可顺利退火前提下，可在同一引物上导入多个突变。
- 在两引物上分别导入不同突变时，引物间距离应小于质粒全长的一半。
- 在两引物上分别导入不同突变时，全突变阳性率降低至 50~80%，克隆筛选时需适当增加样品量。
- DpnI 对细菌生长具有轻微抑制作用，转化时反应液与感受态比例不宜超过 1：5（v/v）。