

## Hieff Mut<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit 定点突变试剂盒

### 产品信息

产品名称	货号	规格
Hieff Mut <sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit 定点突变试剂盒	11003ES10	10 T

### 产品描述

Hieff Mut<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit是基于Hieff Clone<sup>®</sup>快速克隆技术的定点突变系统。使用本试剂盒，目标质粒扩增产物经DpnI消化、Hieff Clone<sup>®</sup>重组环化后直接进行转化即可完成定点突变。该试剂盒由两个模块组成：Hieff<sup>®</sup> II Pfu DNA Polymerase扩增模块和Hieff Clone<sup>®</sup>快速克隆模块。Hieff<sup>®</sup> II Pfu DNA Polymerase超高的保真度显著降低了扩增过程中引入新突变的可能性，其卓越的长片段扩增能力，广泛适用于长度小于20 kb的任何质粒扩增。Hieff Clone<sup>®</sup>快速克隆系统利用高效的同源重组反应替代传统的退火成环反应。因此使用Hieff Mut<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit进行DNA定点突变时，引物设计更加灵活，且扩增反应不再需要以线性方式进行，极大减少了模板使用量，有利于原始甲基化模板的彻底降解。Hieff Clone<sup>®</sup>技术可以高效完成两个PCR产物的无缝拼接，因此该试剂盒还能以单次扩增的方式对目标质粒上不连续的两个位点同时进行突变。

Hieff Mut<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit中的重组酶Exnase经过优化，专门针对单碱基、不连续双碱基定点突变。此外，如扩增产物特异，其DpnI消化产物可不进行DNA纯化而直接用于重组反应。高度优化的反应缓冲液、快捷的操作流程以及极高的成功率，使得Hieff Mut<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit成为DNA定点突变首选试剂盒。

### 应用范围

#### DNA 定点突变

【注】：如使用本品对质粒进行定点突变，请使用甲基化酶无缺陷的宿主菌（例如Top10、DH5 $\alpha$ 、JM109）扩增原始质粒！

### 产品组成

组分编号	组分名称	产品规格
		11003ES10 (10 T)
11003-A	2×Hieff <sup>®</sup> II PCR buffer	500 $\mu$ L
11003-B	dNTP Mix (10 mM each)	20 $\mu$ L
11003-C	Hieff <sup>®</sup> II Pfu DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L)	20 $\mu$ L
11003-D	Dpn I (10 U/ $\mu$ L)	20 $\mu$ L
11003-E	2×Hieff Clone <sup>®</sup> Enzyme Premix	100 $\mu$ L

### 运输与保存方法

冰袋运输。产品-20 $^{\circ}$ C保存。有效期1年。

## 单碱基（或连续多碱基）定点突变实验方案

### 实验流程概览（图1）

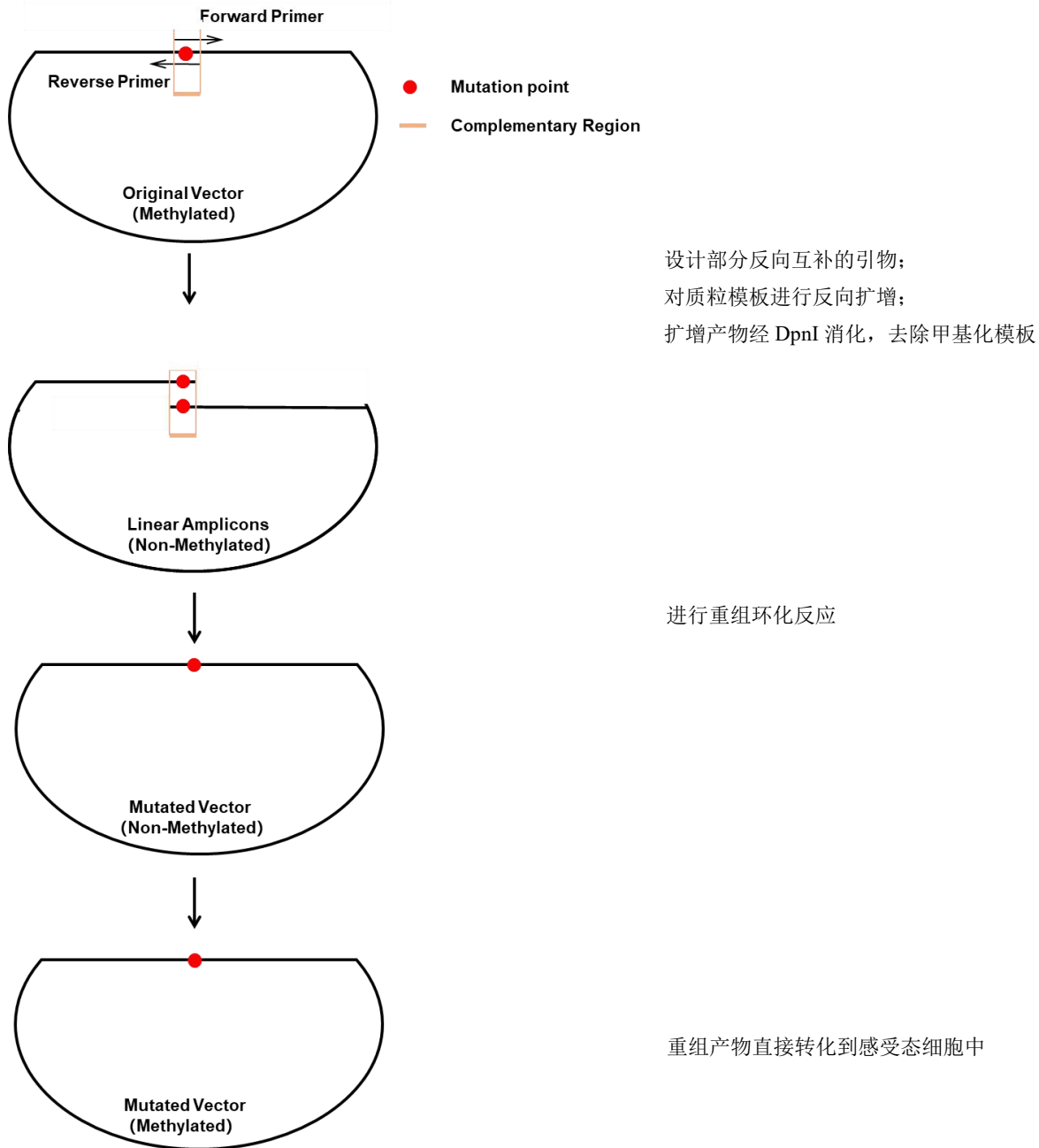


图 1. 使用 Hieff Mut™ Site-Directed Mutagenesis Kit 进行单碱基（或连续多碱基）定点突变实验流程

### 1. 引物设计

向质粒引入单碱基或连续多碱基定点突变，只需设计一对引物将质粒进行反向PCR扩增即可。引物设计基本原则为：正反向扩增引物5'端包含15-21 bp反向互补区域（GC含量40%-60%为佳），各引物非互补区域长度至少为15 bp（待突变位点至引物3'端区域Tm值高于60°C为佳）。所需引入突变可以包含在互补区域内（需要两条引物上均引入点突变），也可以包含在任一条引物的非互补区域（只需在一条引物上引入点突变），请勿将突变位点置于引物末端。以向pUC18引入单碱基突变为例，引物设计具体方案如图2所示。

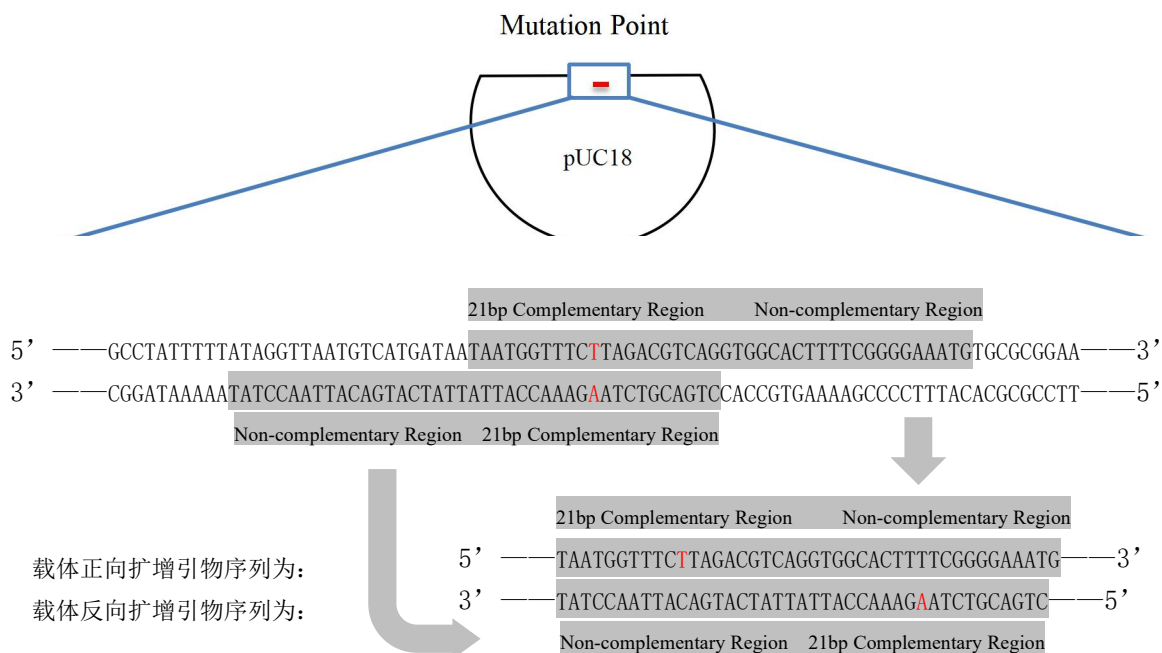


图 2. 向质粒引入单碱基（或连续多碱基）定点突变引物设计示意图

【注】：计算引物Tm值时，应计算待突变位点至引物3'端这一区域内的碱基，调整引物长度使这一段Tm值高于60℃，待突变位点至引物5'端区域内的碱基不应参与计算。

## 2. 目标质粒扩增

### 2.1 配制PCR反应体系

反应各组分解冻后请充分摇匀，使用完毕后及时放回-20℃。2×Hieff® II PCR buffer请勿长时间敞口放置。

为了增加扩增特异性，反应体系配制过程请于冰水浴中进行。为了防止Hieff® II Pfu DNA Polymerase的校对活性降解引物，请将聚合酶最后加入反应体系中。

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 μL
2×Hieff® II PCR buffer	25 μL
dNTP Mix (10 mM each) <sup>a</sup>	1 μL
模板DNA <sup>b</sup>	Optional
引物1 (10 μM)	2 μL
引物2 (10 μM)	2 μL
Hieff® II Pfu DNA Polymerase (1 U/μL) <sup>c</sup>	1 μL

a. 请勿使用dUTP和带有尿嘧啶的引物或模板。

b. 在质粒能正常扩增的前提下，应尽量减少质粒模板使用量，推荐使用≤1 ng新鲜提取的质粒做模板。

c. 推荐的酶的终浓度为1 U/50 μL反应。可将Hieff® II Pfu DNA Polymerase在0.5-2 U/50 μL之间进行优化，但不要超过2 U/50 μL，尤其当扩增子长度大于5 kb时。

### 2.2 PCR扩增反应

推荐PCR反应条件：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	30 sec	1
变性 <sup>a</sup>	95℃	15 sec	
退火 <sup>b</sup>	60℃~72℃	15 sec	30 <sup>d</sup>
延伸 <sup>c</sup>	72℃	30-60 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	1

- 对于大多数质粒，变性温度使用95°C即可。
  - Hieff® II Pfu DNA Polymerase能够促进模板和引物高效退火。一般来说，退火温度设置为引物T<sub>m</sub>值即可。如果需要，可以建立一个温度梯度反应去寻找引物模板结合的最适温度。退火时间太长可能导致扩增产物在胶上呈现弥散状。
  - 对于大多数扩增反应，延伸过程可在72°C进行。长的延伸时间有助于提高扩增产量。
  - 为了防止扩增过程中引入非目标突变，强烈建议扩增循环数≤35。如果扩增效率良好的话，推荐扩增循环数≤30。
- 反应结束后取少量扩增产物进行琼脂糖电泳检测。如目标质粒正确扩增，则可进行下步实验。

### 3. 扩增产物 DpnI 消化，去除甲基化模板质粒

因上述扩增产物中包含原始模板质粒，为防止其在转化后形成假阳性转化子，必须在重组环化之前进行DpnI消化。推荐反应体系如下：

组分	体积
DpnI	1 μL
扩增产物	40~50 μL

轻轻吹打混匀后，将上述反应体系置于37°C恒温反应1~2 h。如产物扩增特异，产物条带单一，DpnI消化产物无需纯化，可直接用于后续重组反应。如扩增不特异，DpnI消化结束后应胶回收纯化目标扩增产物。

## 4. 重组反应

### 4.1 配制重组反应体系

正反向扩增引物5'端包含完全反向互补的一段序列，因此在Exnase催化下扩增产物5'末端和3'末端可以发生同源重组，完成扩增产物环化过程。于冰水浴中，将下列组分依次加到无菌的1.5 mL Eppendorf管或PCR管的管底。如果不慎将液体粘在管壁，请务必通过短暂离心使其沉入管底。体系配制完成后，用移液器上下轻轻吹打几次混匀各组分，避免产生气泡（请勿剧烈震荡或者涡旋混匀）。

组分	体积
2×Hieff Clone® Enzyme Premix	10 μL
DpnI消化产物	50~400 ng
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 μL

单点突变重组反应体系最适DNA使用量为0.03 pmol。该摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

$$\text{DpnI消化产物最适使用量} = [0.02 \times \text{目标质粒碱基对数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$$

例如，向长度为5 kb的目标质粒引入单点突变，DpnI消化产物最适使用量应为： $0.02 \times 5000 = 100 \text{ ng}$ 。

【注】：DNA量太多或者太少都将降低环化效率。请务必通过琼脂糖电泳预先确认DNA浓度，尽量严格按照推荐量配制反应体系。当DpnI消化产物最适使用量计算值不足50 ng或者超过400 ng时，加入50 ng或400 ng即可。DpnI消化产物不纯化直接用于重组反应时，使用量不应超过反应总体积的1/5，即4 μL。

### 4.2 重组反应

- 将上述体系置于50°C反应20 min。
- 待反应完成后，立即将反应管置于冰水浴中冷却。
- 之后，反应产物可直接进行转化；也可储存于-20°C，待需要时解冻转化。

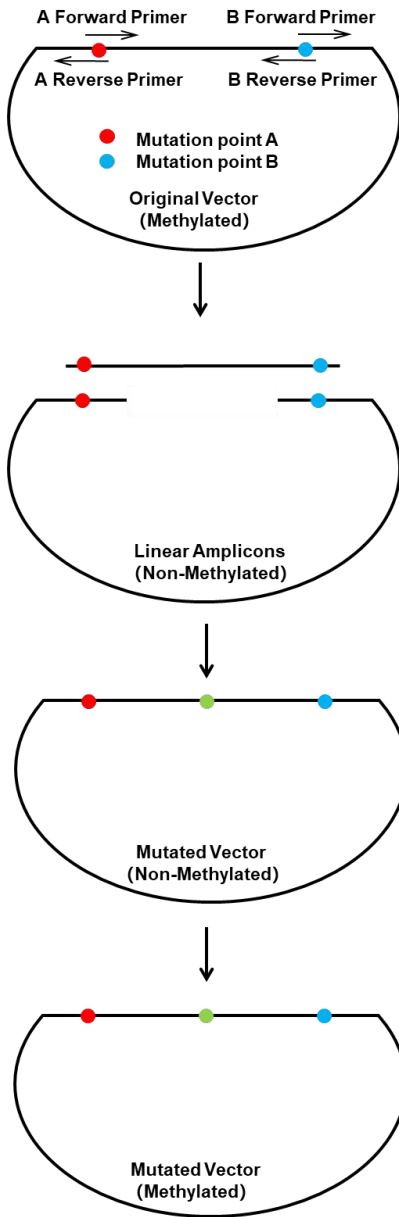
## 5. 反应产物转化、涂板、克隆鉴定

- 取10 μL冷却反应液，加入到100 μL感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置30 min。
- 42°C热激45~90 sec，冰水浴孵育2 min。
- 加入900 μL SOC或LB培养基，37°C孵育10 min充分复苏。
- 37°C，200-250 rpm，摇菌45 min。
- 取100 μL菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。将平板倒置，于37°C过夜培养。

【注】：我们推荐您使用转化效率 $>10^8 \text{ cfu}/\mu\text{g}$ 的感受态细胞。如果感受态转化效率 $<10^8 \text{ cfu}/\mu\text{g}$ （例如用CaCl<sub>2</sub>法新鲜制备的感受态转化效率通常在 $10^6$ - $10^7 \text{ cfu}/\mu\text{g}$ 之间），请将培养菌液在5,000 rpm离心3 min收集菌体，用100 μL LB培养基重悬后全部涂板。

## 不连续双碱基定点突变实验方案 (两突变位点相距超过50 bp)

### 实验流程概览 (图 3)



以待突变位点 A、B 为界，将质粒分为 AB 和 BA 段。  
 在每个待突变位点处设计部分反向互补的引物；  
 以原始质粒为模板，分别扩增 AB 段 (A Forward Primer 和 B Reverse Primer) 和 BA 段 (A Reverse Primer 和 B Forward Primer)；  
 扩增产物经 DpnI 消化，去除甲基化模板

进行重组环化反应

重组产物直接转化到感受态细胞中

图 3. 使用 Hieff Mut™ Site-Directed Mutagenesis Kit 进行不连续双碱基定点突变实验流程

### 1. 引物设计

向质粒两个不连续位点引入不连续双碱基定点突变，需要设计两对引物将质粒分为两段进行扩增。引物设计基本原则为：在每个待突变位点处设计部分反向互补的扩增引物对。每对正反向引物5'端包含15-21 bp反向互补区域。所需引入突变可以包含在互补区域内（需要两条引物上均引入点突变），也可以包含在任一条引物的非互补区域（只需在一条引物上引入点突变），请勿将突变位点置于引物末端。以向pUC18引入双碱基突变为例，引物设计具体方案如图4所示。

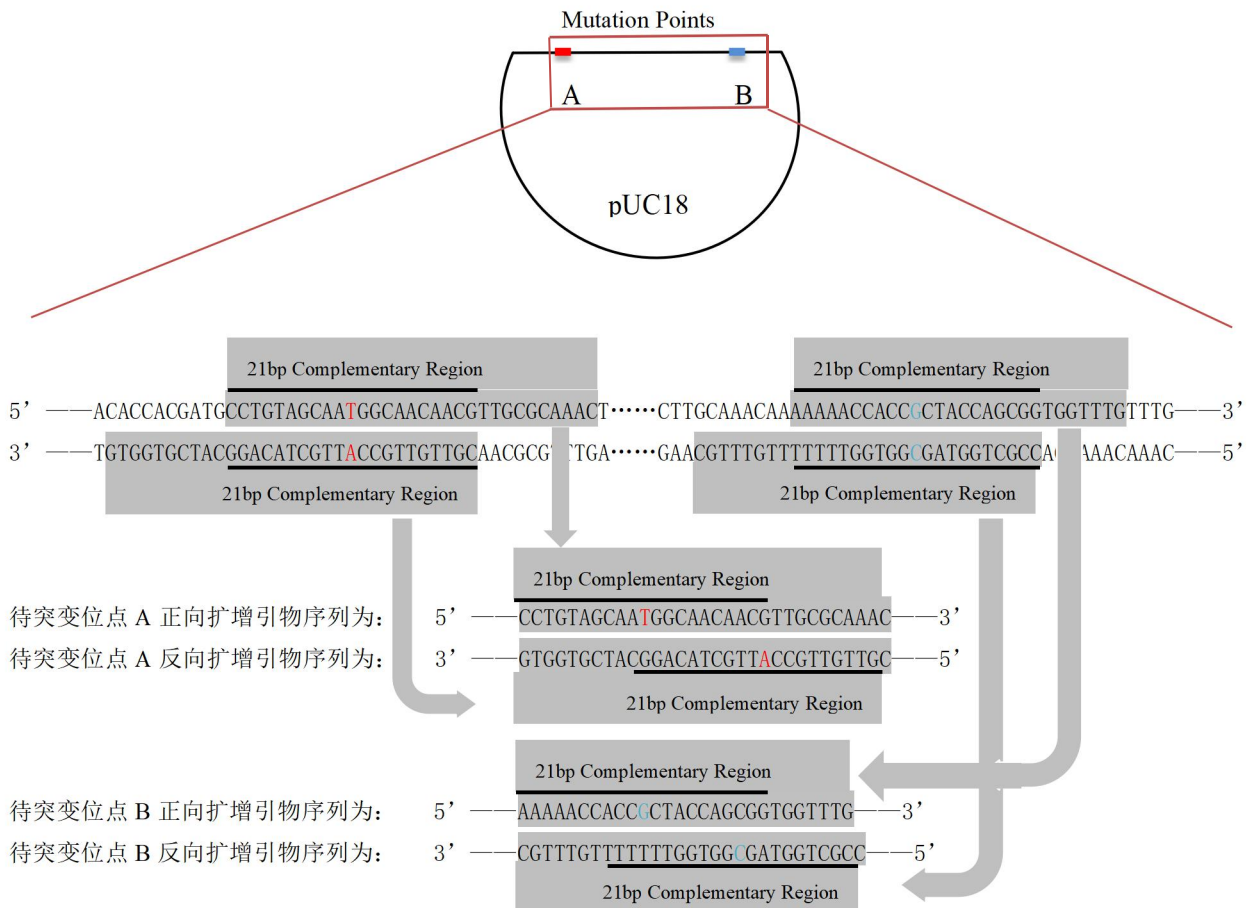


图4. 向质粒引入不连续双碱基定点突变引物设计示意图

【注】：计算引物Tm值时，应计算待突变位点至引物3'端这一区域内的碱基，调整引物长度使这一段Tm值高于60°C，待突变位点至引物5'端区域内的碱基不应参与计算。

## 2. 目标质粒扩增

以待突变位点A、B为界，将质粒分为AB段和BA段。使用Hieff™ II Pfu DNA Polymerase对AB段和BA段分别进行扩增。AB段扩增引物对为：待突变位点A正向扩增引物和待突变位点B反向扩增引物；BA段扩增引物对为：待突变位点B正向扩增引物和待突变位点A反向扩增引物。

### 2.1 配制PCR反应体系

反应各组分解冻后请充分摇匀，使用完毕后及时放回-20°C。2×Hieff® II PCR buffer请勿长时间敞口放置。为了增加扩增特异性，反应体系配制过程请于冰水浴中进行。为了防止Hieff® II Pfu DNA Polymerase的校对活性降解引物，请将聚合酶最后加入反应体系中。推荐反应体系如下：

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 μL
2×Hieff® II PCR buffer	25 μL
dNTP Mix (10 mM each) <sup>a</sup>	1 μL
模板DNA <sup>b</sup>	Optional
引物1 (10 μM)	2 μL
引物2 (10 μM)	2 μL
Hieff® II Pfu DNA Polymerase (1 U/μL) <sup>c</sup>	1 μL

a. 请勿使用dUTP和带有尿嘧啶的引物或模板。

b. 在各片段能正常扩增的前提下，应尽量减少质粒模板使用量，推荐使用≤1 ng新鲜提取的质粒做模板。

c. 推荐的酶的终浓度为1 U/50 μL反应。可将Hieff® II Pfu DNA Polymerase在0.5-2 U/50 μL之间进行优化，但不要超过2 U/50

μL，尤其当扩增子长度大于5 kb时。

## 2.2 PCR扩增反应

推荐PCR反应条件：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性 <sup>a</sup>	95°C	15 sec	30 <sup>d</sup>
退火 <sup>b</sup>	60°C~72°C	15 sec	
延伸 <sup>c</sup>	72°C	30-60 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 min	1

a. 对于大多数质粒，变性温度使用95°C即可。对于超过15 kb的扩增子，变性温度降低至92°C可以提高扩增效率。

b. Hieff® II Pfu DNA Polymerase能够促进模板和引物高效退火。一般来说，退火温度设置为引物T<sub>m</sub>值即可。如果需要，可以建立一个温度梯度反应去寻找引物模板结合的最适温度。退火时间太长可能导致扩增产物在胶上呈现弥散状。

c. 对于大多数扩增反应，延伸过程可在72°C进行。长的延伸时间有助于提高扩增产量。

d. 为了防止扩增过程中引入非目标突变，强烈建议扩增循环数≤35。如果扩增效率良好的话，推荐扩增循环数≤30。

反应结束后取少量扩增产物进行琼脂糖电泳检测。如目标质粒正确扩增，则可进行下步实验。

## 3. 扩增产物 DpnI 消化，去除甲基化模板质粒

因上述扩增产物中包含原始模板质粒，为防止其在转化后形成假阳性转化子，必须在重组环化之前进行 DpnI 消化。

推荐反应体系如下：

组分	体积
DpnI	1 μL
扩增产物	40~50 μL

将上述反应体系置于 37°C 恒温反应 1~2 h。如产物扩增特异，产物条带单一，DpnI 消化产物无需纯化，可直接用于后续重组反应。如扩增不特异，DpnI 消化结束后应胶回收纯化目标扩增产物。

## 4. 重组反应

### 4.1 配制重组反应体系

AB 段和 BA 段扩增产物末端分别包含完全一致的一段序列，因此在 Exnase 催化下两扩增产物末端可以分别发生同源重组，完成环化过程。于冰水浴中，将下列组分依次加到无菌的 1.5 mL Eppendorf 管或 PCR 管的管底。如果不慎将液体粘在管壁，请务必通过短暂离心使其沉入管底。体系配制完成后，用移液器上下轻轻吹打几次混匀各组分，避免产生气泡（请勿剧烈震荡或者涡旋混匀）。

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 μL
2×Hieff Clone® Enzyme Premix	10 μL
AB段DpnI消化产物	20~200 ng
BA段DpnI消化产物	20~200 ng

不连续双点突变重组反应体系最适DNA使用量为：较长片段0.03 pmol，较短片段为0.06 pmol。这些摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

**较长片段DpnI消化产物使用量 = [0.02 × 片段碱基数] ng (0.03 pmol)**

**较短片段DpnI消化产物使用量 = [0.04 × 片段碱基数] ng (0.06 pmol)**

例如，AB段长度为1 kb，BA段长度为5 kb。则DpnI消化产物最适使用量为：AB段0.04 × 1000 = 40 ng；BA段0.02 × 5000 = 100 ng。

**【注】：** DNA量太多或者太少都将降低环化效率。请务必通过琼脂糖电泳预先确认DNA浓度，尽量严格按照推荐量配制反应体系。当DpnI消化产物最适使用量计算值不足20 ng或者超过200 ng时，加入20ng或200 ng即可。DpnI消化产物不纯化直接用于重组反应时，使用量不应超过反应总体积的1/5，即4 μL。

#### 4.2 重组反应

- 1) 将上述体系置于50°C反应 20 min
- 2) 待反应完成后, 立即将反应管置于冰水浴中冷却。
- 3) 之后, 反应产物可直接进行转化; 也可储存于-20°C, 待需要时解冻转化。

#### 5. 反应产物转化、涂板、克隆鉴定

- 1) 取10  $\mu$ L冷却反应液, 加入到100  $\mu$ L感受态细胞中, 轻弹管壁数下混匀, 在冰上放置30 min。
- 2) 42°C热激45~90 sec, 冰水浴孵育2 min。
- 3) 加入900  $\mu$ L SOC或LB培养基, 37°C孵育10 min充分复苏。
- 4) 37°C, 200 -250 rpm, 摇菌45 min。
- 5) 取100  $\mu$ L菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。将平板倒置, 于37°C过夜培养。

【注】: 我们推荐您使用转化效率 $>10^8$  cfu/ $\mu$ g的感受态细胞。如果感受态转化效率 $<10^8$  cfu/ $\mu$ g(例如用CaCl<sub>2</sub>法新鲜制备的感受态转化效率通常在 $10^6$ - $10^7$  cfu/ $\mu$ g之间), 请将培养菌液在5,000 rpm离心3 min收集菌体, 用100  $\mu$ L LB培养基重悬后全部涂板。

#### 注意事项

- 1) 引物设计时5'端反向互补区尽量选择无重复序列, 且GC含量比较均匀的区域。当这一区域内GC含量在40%~60%范围之内时, 重组环化效率将达到最大。如这部分区域GC含量高于70%或者低于30%, 重组环化效率会受到较大影响。
- 2) 当两突变位点相距小于50 bp时, 应将其视为一个突变位点, 将两突变引入同一条/对引物进行实验。
- 3) DpnI只能识别甲基化DNA, 请务必使用从甲基化酶无缺陷的宿主菌中扩增的质粒作为PCR模板。
- 4) 长期放置、反复冻融会导致模板质粒断裂、开环或降解, 应使用新鲜制备的质粒作为模板。
- 5) 质粒PCR扩增结果需高度特异, 杂带较多会影响实验结果。
- 6) 重组反应体系中应尽量避免金属络合剂(如EDTA)的带入。因此, 建议将DNA纯化产物溶解在pH8.0的ddH<sub>2</sub>O中保存(常规胶回收试剂盒中的洗脱液可用pH8.0的ddH<sub>2</sub>O替代), 请勿使用TE进行DNA保存。
- 7) 冷却后的重组反应产物应在1h内进行转化, 且转化前保持在冰水浴中。如需储存, 于-20°C冻存。尽量避免室温较长时间放置或4°C长期储存。
- 8) 反应产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的1/10, 否则会降低转化效率。另外, 当转化的DNA浓度太高时, 会抑制转化反应。将重组反应产物稀释5倍后取1/5进行转化。
- 9) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 10) 本产品仅作科研用途!