

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

### 产品信息

产品名称	货号	规格
Hieff Mut <sup>TM</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis Kit 多点突变试剂盒	11004ES10	10 T

### 产品描述

Hieff Mut<sup>TM</sup> Multi 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，可一次性向目标质粒上三至五个不连续位点（相距超过50 bp）同时引入定点突变。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> Multi Site-Directed Mutagenesis Kit进行DNA定点突变时，引物设计更加灵活，且扩增反应以指数方式进行，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 Mut<sup>TM</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis Kit中的重组酶Exnase MultiS经过优化，专门针对多碱基进行定点突变。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> Multi Site-Directed Mutagenesis Kit成为DNA多点突变首选试剂盒。

### 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

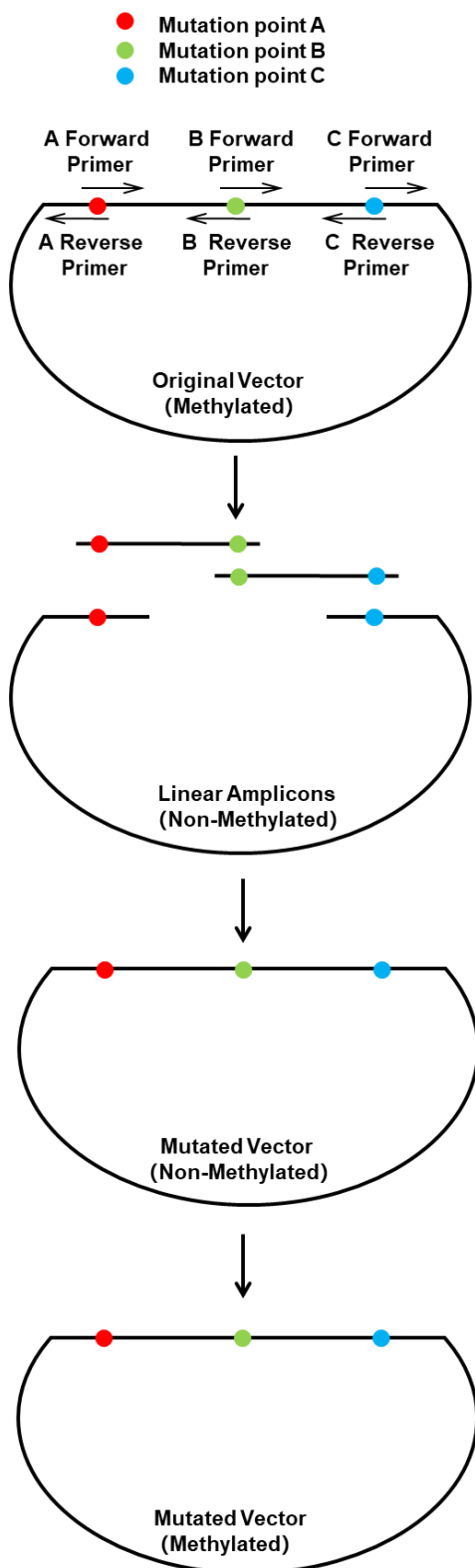
组分编号	组分名称	产品规格
		11004ES10 (10 T)
11004-A	2×Hieff <sup>®</sup> II PCR buffer	1.25 mL
11004-B	dNTP Mix (10 mM each)	50 $\mu$ L
11004-C	Hieff <sup>®</sup> II Pfu DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L
11004-D	Dpn I (10 U/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L
11004-E	2× Hieff Clone <sup>®</sup> MultiS Enzyme Premix	100 $\mu$ L

### 运输与保存方法

冰袋运输。产品-20 $^{\circ}$ C保存。有效期1年。

## 不连续多碱基（相距超过 50 bp）定点突变实验流程（以不连续三碱基为例）

实验流程概览（图 1）



以待突变位点 A、B、C 为界，将质粒分为 AB、BC 和 CA 三段。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)、BC 段 (B Forward Primer 和 C Reverse Primer) 和 CA 段 (C Forward Primer 和 A Reverse 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 1. 使用 Hieff Mut™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit 进行不连续三碱基定点突变实验流程

## 1. 引物设计

向质粒三个不连续位点引入定点突变，只需设计三对引物将质粒分段扩增即可。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（GC含量40%-60%为佳），各引物待突变位点至引物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引入三碱基突为例，引物设计具体方案如图2所示。

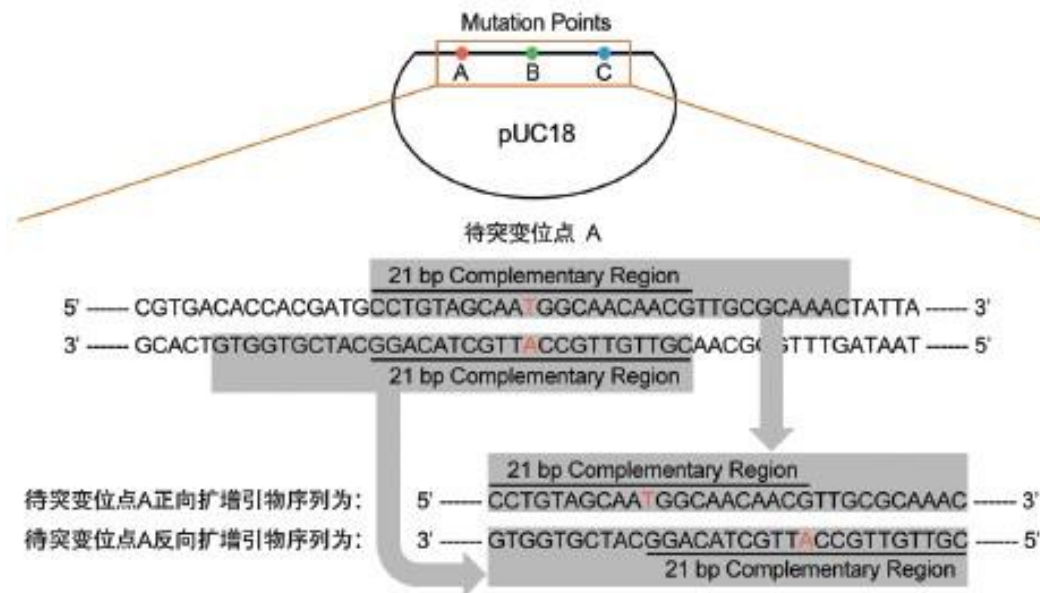


图2. 向质粒引入不连续多碱基定点突变引物设计示意图

【注】：待突变位点B、C处的正反向扩增引物设计与位点A处的引物设计方式一致。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，待突变位点至引物5'端区域内的碱基不应参与计算。

## 2. 目标质粒分段扩增

以待突变位点A、B、C为界，将质粒分为AB、BC段和CA段。使用Hieff® II Pfu DNA Polymerase对各段分别进行扩增。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；BC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C反向扩增引物；CA段扩增引物对为：待突变位点C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≤1 ng。待扩增质粒长期放置、反复冻融会导致模板质粒断裂、开环或降解，因此推荐使用新鲜制备的质粒作为模板。

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	
退火 <sup>b</sup>	60°C~72°C	15 sec	30 <sup>d</sup>
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。

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，推荐扩增循环数应≤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，必须在进行重组环化之前进行 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

质粒AB、BC和CA段扩增产物末端分别包含相对应的完全一致的一段序列，因此在Exnase MultiS催化下三扩增产物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，将下列组分依次加入到无菌的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
AB段DpnI消化产物	x ng
BC段DpnI消化产物	x ng
CA段DpnI消化产物	x ng
2× Hieff Clone® MultiS Enzyme Premix	10 μL

Exnase MultiS 多点突变重组反应体系最适DNA使用量为每片段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:

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

例如，AB段长度为1 kb，BC段长度为2 kb，CA段长度为5 kb。则DpnI消化产物最适使用量为：AB段 $0.02 \times 1000 = 20 \text{ ng}$ ；BC段 $0.02 \times 2000 = 40 \text{ ng}$ ；CA段 $0.02 \times 5000 = 100 \text{ ng}$ 。

【注】：DNA量太多或者太少都将降低环化效率。常用的吸光度测量法极易受DNA纯度、DNA稀释液pH等因素影响，测定值和DNA实际浓度往往偏差较大。因此，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10 ng或者超过200 ng时，加入10 ng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 20-50 min。

2) 待反应完成后，立即将反应管置于冰水浴中冷却5 min。

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  $\mu\text{L}$ 冷却反应液，加入到100  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$  SOC或LB培养基，37°C孵育10 min充分复苏。
- 4) 37°C摇菌45 min。
- 5) 取100  $\mu\text{L}$ 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/ $\mu\text{g}$ 的感受态细胞。如果感受态转化效率 $<10^8$  cfu/ $\mu\text{g}$  (例如用 $\text{CaCl}_2$ 法新鲜制备的感受态转化效率通常在 $10^6$ - $10^7$  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  $\mu\text{L}$  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50bp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) 质粒PCR扩增结果需高度特异，杂带较多会影响实验结果。
- 5) 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。
- 6) 冷却后的反应产物应在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。
- 7) 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。
- 8) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 9) 本产品仅作科研用途！