



Protein Biotechnologies

MutMan™ Quick Mutagenesis Kit

货号：PT202



Protein Biotechnologies

MutMan™ Quick Mutagenesis Kit

货号：PT202

## 北京普鲁顿生物科技有限公司 Protein Biotechnology Co., Ltd



Protein Biotechnologies

**Protein Biotechnology Co., Ltd**

免费咨询热线：400-999-4431

网站：www.proteinbiotechnology.com

销售：sales@proteinbiotechnology.com

市场：admin@proteinbiotechnology.com

技术：support@proteinbiotechnology.com

- MutMan™ Quick Mutagenesis Kit
- 目录号 PT202
- 使用手册
- 实验室使用，仅用于体外



## 产品描述

MutMan™ Quick Mutagenesis Kit 是基于 ClonMan™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、ClonMan™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：ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增模块和 ClonMan™快速克隆模块。ProMan™ Super-Fidelity 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。ProMan™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。ProMan™ 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 MutMan™定点突变试剂盒进行 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。ClonMan™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。和上一代产品相比，MutMan™ Quick Mutagenesis Kit 配有专门针对单碱基、不连续双碱基定点突变而优化的重组酶 Recombinase II。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 MutMan™ Quick Mutagenesis Kit 成为 DNA 定点突变首选试剂盒。

## 产品应用

用于简单、快速、高效的 DNA 定点突变。

【注意：如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（如 Top10、DH5α、JM109）扩增原始质粒。】

## 产品组成

组份	PT202 10rxn	PT202 25rxn
ProMan Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	40 μl	100 μl
5 × ProMan Buffer (with 10 mM MgSO <sub>4</sub> )	1.25 ml	1.25 ml
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1.25 ml	1.25 ml
DpnI (10 U/μl)	20 μl	50 μl
Ultrapure dNTP Mix (PCR Grade) 10mM each	40 μl	100 μl
5 × RE II Buffer	40 μl	100 μl
Recombinase II	20 μl	50 μl

## 产品储存

-20°C保存，避免反复冻融。

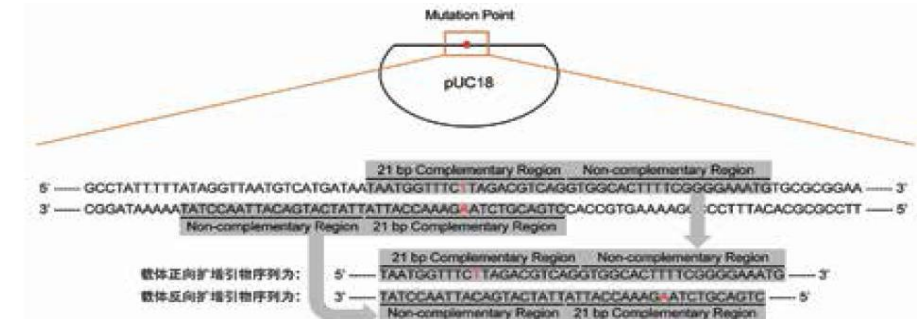


## 实验方案

### 一、单碱基(或连续多碱基)定点突变实验方案

#### 1.1 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' 端包含至少 20 bp 反向互补区域，各引物非互补区域长度至少为 20 bp。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一所示：



图一：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

【注意：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。】

#### 1.2 目标质粒扩增

使用 ProMan Super-Fidelity DNA Polymerase 对目标质粒进行扩增。反应各组分解冻后请充分摇匀，使用完毕后及时放回 -20°C。5 × ProMan 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 ProMan Super-Fidelity 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：

RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 50μl
5 × ProMan Buffer (with 10 mM MgSO <sub>4</sub> )	10 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub> ①	Optional
Ultrapure dNTP Mix (PCR Grade) 10mM each②	1 μl
Template DNA③	Optional
Forward Primer ( 10μm )	2 μl
Reverse Primer ( 10μm )	2 μl
ProMan Super-Fidelity DNA Polymerase④	1 μl

①. 对于大多数 PCR 反应，Mg<sup>2+</sup>最佳终浓度为 1.5-2 mM。体系中已含有终浓度为 2 mM Mg<sup>2+</sup>，如有需要，可用 25 mM MgSO<sub>4</sub>，以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg<sup>2+</sup>浓度梯度。



- ②. 请勿使用 dUTP 和带有尿嘧啶的引物或模板。  
 ③. 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 ≤1 ng。  
 ④. 推荐的酶的终浓度为 1 U/50 μl 反应。可将 ProMan Super-Fidelity 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。

体系配制完成后进行扩增反应, 推荐 PCR 反应条件:

预变性 <sup>①</sup>	95 °C	30 sec	1
变性 <sup>①</sup>	95 °C	5-10 sec	} 30 cycles <sup>④</sup>
退火 <sup>②</sup>	45-72 °C	10-30 sec	
延伸 <sup>③</sup>	72 °C	15 sec/kb	
彻底延伸	72 °C	5-10 min	1

- ①. 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。  
 ②. ProMan Super-Fidelity 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 Tm 值 ±3°C 范围之内即可。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。推荐退火时间设置为 10 sec 即可。  
 ③. 对于大多数扩增反应, 延伸过程可在 72°C 进行。对于超过 15 kb 的扩增片段, 需降低延伸温度至 68°C。延伸时间推荐使用 15 sec/kb。延伸时间太长会导致非特异扩增产物增多, 切勿超过 30 sec/kb。  
 ④. 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, 则可进行下一步实验。

### 1.3 扩增产物 DpnI 消化, 去除甲基化模板质粒

因 1.2 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:

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 小时。如 1.3 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。

### 1.4 进行重组反应

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 Recombinase II 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。

ddH <sub>2</sub> O	to 20 μl
5 × RE II Buffer	4 μl
DpnI 消化产物	50 ~ 400 ng
Recombinase II	2 μl

Recombinase II 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:

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



## 常见问题与解决方案

### 1. 质粒模板无法正常扩增

- 引物设计有误: 核对引物设计方案。
- 扩增体系配制错误: 重复实验。
- 扩增反应条件不优化: 调整 Mg<sup>2+</sup> 浓度、酶量、扩增程序。
- 模板质粒质量偏差: 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。

### 2. 平板上长不出克隆或克隆数目很少

- 感受态效率低: 使用新制备或妥善冻存的感受态细胞, 确保转化效率 > 10<sup>7</sup> cfu/μg。每次可设置一组转化质粒的对照实验, 以检测感受态细胞的转化效率。
- 重组反应体系中 DNA 量不足, 或者比例不佳(双碱基突变): 尽量按照推荐 DNA 的量配制反应体系。请务必预先检测 DpnI 消化产物的浓度。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 实际浓度往往偏差非常大。因此, 我们强烈推荐您通过琼脂糖电泳来测定样品中的 DNA 浓度。
- 重组环化反应体系中 DNA 不纯, 抑制反应: 未纯化 DpnI 消化产物加入重组反应体系内的总体积不应超过 4 μl (反应体系体积 1/5)。尝试对 DpnI 消化产物进行胶回收纯化。重组反应体系中应尽量避免金属络合剂 (如 EDTA) 的带入。因此, 我们推荐您将 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。
- 感受态细胞中加入了过多的反应产物: 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。
- 出现转化抑制效应: 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。

### 3. 定点突变未正确完成

- 引物设计错误: 核对引物设计方案。
- 扩增反应所用模板为非甲基化的质粒: 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。
- 扩增反应使用过多的模板质粒: 对于大多数质粒, 1 ng 模板量已足以使扩增反应正常进行, 过多的质粒模板将会导致 DpnI 消化不完全, 降低突变成功率。

### 4. 非目标位点突变

- 模板质粒携带未知位点突变: 测序确认模板质粒序列正确性。
- 扩增循环数过多: 为了防止扩增过程中引入非目标突变, 扩增循环数不宜超过 35。如果扩增效率良好的话, 推荐扩增循环数应不超过 30。

### 5. 特别提醒

- 在选择引物反向互补区时, 应避免选择有重复序列的区域。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。

**注意事项**

下表列出了使用 Recombinase II 进行 DNA 定点突变时主要注意事项

实验步骤	推荐使用方法	不推荐使用方法
引物反向互补区选择	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	选择带有重复序列,或高 GC、高 AT 区域
引物设计	按本说明书操作设计	引物反向互补区域少于推荐长度或者添加错误
实验方案选择	双位点突变时,如两突变位点相距超过 50 bp,按照不连续双碱基定点突变实验方案进行实验;如两突变位点相距小于 50bp 时,将其视为一个突变位点,按照单碱基(或连续多碱基)定点突变实验方案进行实验	双位点突变时,不考虑两突变位点之间的距离,按照不连续双碱基定点突变实验方案进行实验
质粒 PCR 扩	进行高特异性扩增反	扩增不特异,杂带较多
PCR 模板质粒使用量	在不影响扩增产量的情况下尽可能少的使用模板	质粒模板使用过量
PCR 模板应为甲基化质粒	使用甲基化酶无缺陷的宿主菌(例如 Top10、DH5α、JM109)扩增原始质粒	使用甲基化酶缺陷的宿主菌扩增原始质粒
PCR 模板质粒质量	长期放置、反复冻融会导致模板质粒断裂、开环或降解,因此应使用新鲜制备的质粒作为模板	使用长期放置、反复冻融过的质粒作为模板
DpnI 消化产物纯化	扩增产物不特异时,应进行胶回收纯化	扩增产物不特异时,未进行胶回收纯化
DpnI 消化产物 DNA 定量	琼脂糖电泳检测	吸光度法检测
重组反应体系配制	在冰水浴中配制;根据实际浓度,按照重组反应最适 DNA 量以及比例配制;DpnI 消化产物不纯化直接用于重组反应时,使用总体积不应超过反应体积的 1/5 (4 μl)	在室温下配制;不考虑 DNA 浓度随意配制;DpnI 消化产物不纯化直接用于重组反应时,使用总体积超过 4μl
进行重组反应	在温控比较精确的仪器内 (PCR 仪或水浴锅),37°C 反应 30 min	反应温度偏离 37°C 太多、反应时间不足或者超过 30 min
终止重组反应	反应完成后立即将反应管置于冰水浴中冷却 5 min	反应完成后室温放置
转化	冷却后的反应产物应在 1 hr 内进行转化,转化之前应一直保持冰水浴低温。如需储存,于 -20°C 进行	冷却后的反应产物置于室温长时间放置后进行转化;4°C 长时间储存后进行转化

 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  $0.02 \times 5000 = 100 \text{ ng}$ 。

【注意: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 4μl。】

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)。置于 37°C 反应 30 min。待反应完成后,立即将反应管置于冰水浴中冷却 5 min。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。

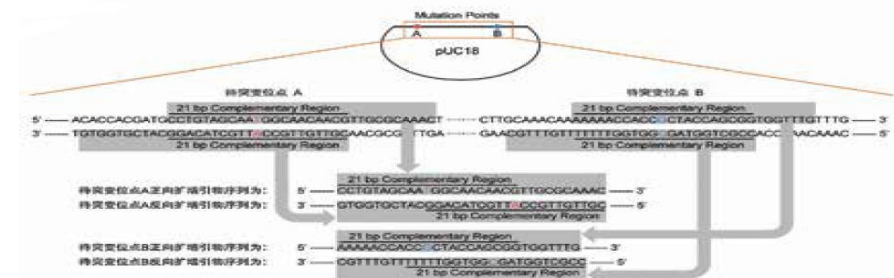
**1.5 反应产物转化、涂板、克隆鉴定**

取 20 μl 冷却反应液,加入到 200 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 秒,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 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。

【注意: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  $\text{CaCl}_2$  法新鲜制备的感受态转化效率通常在  $10^6 \sim 10^7 \text{ cfu}/\mu\text{g}$  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。】

**二、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)**
**2.1 引物设计**

向质粒两个不连续位点引入定点突变,只需设计两对引物将质粒分为两段进行扩增即可。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引物对。每对正反向引物 5' 端包含至少 20 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二所示。



图二: 向质粒引入不连续双碱基定点突变引物设计示意图

【注意: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。】





## 2.2 目标质粒分段扩增

以待突变位点 A、B 为界，将质粒分为 AB 段和 BA 段。使用 ProMan Super-Fidelity 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。

反应各组解冻后请充分摇匀。使用完毕后及时放回-20°C。5 × ProMan 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 ProMan Super-Fidelity 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：

RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 50 μl
5 × ProMan Buffer (with 10 mM MgSO <sub>4</sub> )	10 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub> ®	Optional
Ultrapure dNTP Mix (PCR Grade) 10mM each®	1 μl
Template DNA®	Optional
Forward Primer (10 μm)	2 μl
Reverse Primer (10 μm)	2 μl
ProMan Super-Fidelity DNA Polymerase®	1 μl

①. 对于大多数 PCR 反应，Mg<sup>2+</sup>最佳浓度为 1.5-2 mM。体系中已含有终浓度为 2 mM Mg<sup>2+</sup>，如有需要，可用 25 mM MgSO<sub>4</sub>，以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg<sup>2+</sup>浓度梯度。

②. 请勿使用 dUTP 和带有尿嘧啶的引物或模板。

③. 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 ≤1 ng。

④. 推荐的酶的终浓度为 1 U/50 μl 反应。可将 ProMan Super-Fidelity 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。

体系配制完成后进行扩增反应，推荐 PCR 反应条件：

预变性①	95 °C	30 sec	1
变性①	95 °C	5-10 sec	} 30 cycles④
退火②	45-72 °C	10-30 sec	
延伸③	72 °C	15 sec/kb	
彻底延伸	72 °C	5-10 min	1

①. 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。

②. ProMan Super-Fidelity 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 ±3°C 范围内之即可。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。推荐退火时间设置为 10 sec 即可。

③. 对于大多数扩增反应，延伸过程可在 72°C 进行。对于超过 15 kb 的扩增片段，需降低延伸温度至 68°C。延伸时间推荐使用 15 sec/kb。延伸时间太长会导致非特异扩增产物增多，切勿超过 30 sec/kb。

④. 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 AB 段和 BA 段均正确扩增，则可进行下步实验。



## 2.3 扩增产物 DpnI 消化，去除甲基化模板质粒

因 2.2 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：

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 小时。如 2.3 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。

## 2.4 进行重组反应

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 Recombinase II 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。

RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 20 μl
5 × RE II Buffer	4 μl
AB 段 Dpn I 消化产物	20 ~ 200 ng
BA 段 Dpn I 消化产物	20 ~ 200 ng
Recombinase II	2 μl

Recombinase II 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 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：

$$\text{较长片段 DpnI 消化产物使用量} = [0.02 \times \text{片段碱基数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$$

$$\text{较短片段 DpnI 消化产物使用量} = [0.04 \times \text{片段碱基数}] \text{ ng (0.06 pmol)}$$

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  $0.04 \times 1000 = 40$  ng；BA 段  $0.02 \times 5000 = 100$  ng。

【注意：DNA 量太多或者太少都将降低环化效率。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 20 ng 或者超过 200 ng 时，加入 20 ng 或 200 ng 即可。

DpnI 消化产物不纯化直接用于重组反应时，总使用量不应超过反应体积的 1/5，即 4 μl。】

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）。置于 37°C 反应 30 min。待反应完成后，立即将反应管置于冰水浴中冷却 5 min。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。

## 2.5 反应产物转化、涂板、克隆鉴定

取 20 μl 冷却反应液，加入到 200 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 秒，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 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。

【注意：我们推荐您使用转化效率 > 10<sup>8</sup> cfu/μg 的感受态细胞。如果感受态转化效率 < 10<sup>8</sup> cfu/μg（例如用 CaCl<sub>2</sub> 法新鲜制备的感受态转化效率通常在 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cfu/μg 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。】