



Protein Biotechnologies

MutMan™ MultiS Quick Mutagenesis Kit

货号：PT203



Protein Biotechnologies

MutMan™ MultiS Quick Mutagenesis Kit

货号：PT203

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™ MultiS Quick Mutagenesis Kit
- 目录号 PT203
- 使用手册
- 实验室使用，仅用于体外



Protein Biotechnologies

产品描述

MutMan™ MultiS 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，可一次性向目标质粒上三至五个不连续位点同时引入定点突变。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™ 快速克隆系统利用同源重组反应高效完成扩增产物的体外环化。因此使用 MutMan™ MultiS 定点突变试剂盒进行 DNA 多点突变时，引物设计非常灵活，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。MutMan™ MultiS Quick Mutagenesis Kit 中配有专门针对多碱基定点突变而优化的重组酶 Recombinase II MultiS。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™ MultiS Quick Mutagenesis Kit 成为 DNA 多点突变首选试剂盒。

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	PT203 10rxn	PT203 25rxn
ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	100 μl	250 μl
5 × ProMan Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	1.25 ml	1.25 ml
25 mM MgSO ₄	1.25 ml	1.25 ml
DpnI (10 U/μl)	50 μl	125 μl
Ultrapure dNTP Mix (PCR Grade) 10mM each	100 μl	250 μl
5 × RE II MultiS Buffer	40 μl	100 μl
Recombinase II MultiS	20 μl	50 μl

产品储存

-20°C保存，避免反复冻融。



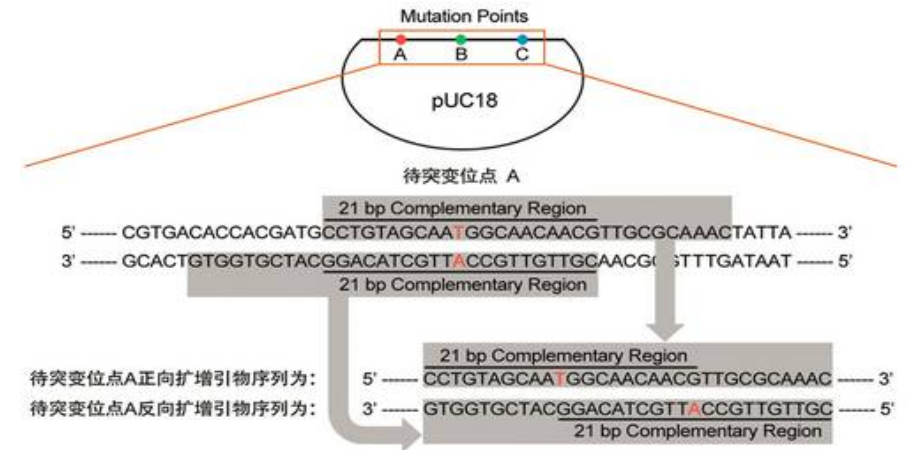
Protein Biotechnologies

实验方案

不连续多碱基 (相距超过 50 bp) 定点突变

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 引入三碱基突变为例, 引物设计具体方案如图一所示:



图一: 向质粒引入不连续多碱基定点突变引物设计示意图

【注意: 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 和 CA 段。使用 ProMan Super-Fidelity 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。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 ₂ O	to 50µl
5 × ProMan Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 µl
25 mM MgSO ₄ ④	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, Mg²⁺最佳终浓度为 1.5-2 mM。体系中已含有终浓度为 2 mM Mg²⁺, 如有需要, 可用 25 mM MgSO₄, 以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg²⁺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_m 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 AB、BC 和 CA 段均正确扩增, 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 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. 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 消化结束后应回收纯化目标扩增产物。





4. 进行重组反应

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 Recombinase II MultiS 催化下三扩增产物末端可以分别发生同源重组，完成环化。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 ₂ O	to 20μl
5 × RE II MultiS Buffer	4 μl
AB 段 Dpn I 消化产物	x ng
BA 段 Dpn I 消化产物	x ng
BC 段 Dpn I 消化产物	x ng
Recombinase II MultiS	2 μl

Recombinase II MultiS 多点突变重组反应体系最适 DNA 使用量为每片段 0.03 pmol，对应的 DNA 质量可由以下公式粗略计算获得：

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

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 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，使用总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。

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 > 10⁸ cfu/μg 的感受态细胞。如果感受态转化效率 < 10⁸ cfu/μg（例如用 CaCl₂ 法新鲜制备的感受态转化效率通常在 10⁶-10⁷ 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。】



注意事项

下表列出了使用 Recombinase II MultiS 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	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	不考虑两突变位点之间的距离
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、DH5 α 、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 μ l)	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 4 μ l
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



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 Mg²⁺ 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 > 10⁷ cfu/ μ g。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 μ l (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 ddH₂O 中保存 (常规胶回收试剂盒中的洗脱液可用 pH8.0 的 ddH₂O 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。