

随机突变试剂盒

R1372033

产品组分表

R1372033	Component	20T	Storage
R1372033A	2×Random Mutation PCR Mix	500μl	-20℃.Avoid freeze/thaw cycle.
R1372033B	Mutation Enhancer	400μl	-20℃.Avoid freeze/thaw cycle.
R1372033C	Sterile Water	1ml	-20℃.Avoid freeze/thaw cycle.

产品描述

随机突变是阐述蛋白质结构和功能之间的关系、改进蛋白质性能的重要工具。随机突变试剂盒基于易错 PCR (error-prone PCR) 技术, 利用 Taq DNA polymerase 不具有 3'→5' 校对功能的特性, 在特定的反应缓冲体系中, 向扩增的目的基因中引入随机突变密码子。带有随机突变的扩增产物通过双酶切, 连接到表达载体中构建文库, 然后转化入表达宿主中, 进行蛋白活性筛选。如果经一次突变反应不能获得满意的结果, 可采用连续易错 PCR (sequential error-prone PCR) 策略, 即将一次 PCR 扩增得到的有用突变基因作为下一次 PCR 扩增的模板, 连续反复地进行随机诱变, 使每一次获得的突变累积而产生更有意义的突变。本试剂盒包含有优化的 2x Random System、Enhancer 和 Sterile Water 三种组分, 使用时只需加入适量的 DNA 模板和合成的两条扩增引物, 并用水补足体积, 即可进行扩增反应, 操作简便快速, 大大减少了多次加样可能造成的出错和污染机会。2x Random System 含有优化浓度的 Taq DNA polymerase、dNTPs、反应缓冲液和稳定剂, 可最大限度地克服常规易错 PCR 技术中, 由于 Taq DNA polymerase 本身的偏爱性造成的以 GC 突变为主的缺点, 获得相对均衡的突变谱。碱基突变率可通过适量添加 Enhancer、调整模板 DNA 量和改变 PCR 扩增循环数进行控制。

下表列出以 10ng 质粒 DNA 为模板, PCR 扩增一条 1kb DNA 片段 (20 个循环) 后测序检测得到的突变率结果。需要注意的是, 由于不同 DNA 模板的碱基组成不同、长度不一, 以及不同引物的扩增效率存在差异, 所以即使在相同的 PCR 反应条件下, 两组 PCR 产物所得到的突变率也可能不同。因此我们建议根据实验的具体要求, 首先进行多个小体系 (20 μl) 扩增预实验, 分别加入不同体积的 Enhancer (如 0μl、1μl、5μl、10μl 等), 摸索出符合目标突变率的反应条件后, 再放大扩增体系。其他影响突变率的因素见【注意事项】。

以 50μl PCR 反应体系为例:

反应条件	1	2	3	4	5	6
Enhancer (μl)	0	1	2.5	5	10	20
突变碱基的个数/1kb	0~1	0~3	0~4	1~6	3~10	5~18
平均突变碱基数/1kb	0.3	1.6	2.3	4.1	6.5	10.2

本试剂盒适用于扩增低于 4kb、GC 含量在 70%以下的目标 DNA 片段。

保存条件

-20℃保存，避免反复冻融。

使用方法

1.引物设计原则：

- 1) 正、反向扩增引物各一条，长度约 20-45 个碱基，3'端分别与目标突变 DNA 片段的上下游结合；
- 2) 尽量将引物的 GC 含量控制在 40-60%；
- 3) 引物如带有克隆酶切位点，必须添加足够的保护碱基以确保酶切效率；实验证明，引物结合在目标 DNA 片段的酶切位点外侧可提高酶切效率，增加转化的克隆数量。

2.随机突变反应：

1) PCR 反应体系：

向 PCR 薄壁管中依次加入下列试剂

组分	体积
Template Plasmid (1-10ng/μl)	1μl
2x Random PCR Mix	25μl
正向引物 (10μM)	1μl
反向引物 (10μM)	1μl
Enhancer	0-20μl
Sterile Water 补足至	50μl

注：突变率可通过改变起始模板浓度和扩增循环数进行控制。起始模板浓度越高，突变率越低；扩增循环数越高，突变率越高。

2) 混匀后短暂离心，放入 PCR 仪。

3) PCR 循环参数的设置：

流程	温度	时间	循环数
预变性	95℃	2min	
变性	94℃	30s	
退火	50-65℃	1min	16-25
延伸	72℃	1min/kb	
终延伸	72℃	7min	

3.取 1-5μl PCR 产物电泳检测条带浓度和特异性。

4.剩余的 PCR 产物电泳，切胶回收目标 DNA 片段。

5.酶切、连接、转化到表达宿主菌株中进行筛选。

注意事项

1. 由于不同 DNA 模板的碱基组成不同、长度不一，以及不同引物的扩增效率存在差异，所以即使在相同的 PCR 反应条件下，两组 PCR 产物所得到的突变率也可能不同。因此我们建议根据具体实验要求，首先进行多个小体系（20 μ l）扩增预实验，分别加入不同体积的 Enhancer（如 0 μ l、1 μ l、5 μ l、10 μ l 等），通过测序或活性检测等方法，摸索出符合目标突变率的反应条件后，再放大扩增体系。

2. 起始 DNA 模板的浓度对突变率有很大影响，通常可通过提高或降低 DNA 模板的浓度来调整突变率。鉴于不同型号的分光光度计检测的 DNA 浓度存在偏差，DNA 模板最好在酶切线性化后，采用凝胶电泳方法，与已知浓度的线性化双链 DNA 或商品化的 DNA marker 进行对比，确定其浓度。

3. 突变反应产物必须进行切胶回收处理，去除 DNA 模板、PCR 产物上结合的 Taq 酶以及其他杂质。常规的乙醇沉淀、硅胶膜（珠）或玻璃奶吸附等方法，均无法去除结合的 Taq 酶，后者可能遮蔽酶切位点，影响克隆效率。

4. 建立随机突变文库通常需要 10-200ng/ μ l（相当于 500ng-10 μ g/50 μ l 体系）的 PCR 产物。如遇产量不足，可通过下列方法提高产量：

- 1) 突变率符合需求时，可放大 PCR 体系，或切胶回收 PCR 产物后，采用常规 PCR 反应条件进行扩增；
- 2) 突变率低于需求时，提高 PCR 扩增循环数，或切胶回收 PCR 产物后，进行第二轮随机突变反应；
- 3) 重新设计扩增引物；
- 4) 降低退火温度；
- 5) 确保模板质量，采用凝胶电泳方法精确定量。

5. 对于带有克隆酶切位点的 DNA 模板，必须在 PCR 反应结束后，使用 DpnI 完全消化清除甲基化的模板，再切胶回收目标 DNA 片段。对于非甲基化的质粒（例如从大肠杆菌 JM110 或 SCS110 菌株中提取的质粒），可通过转化 dam⁺ 的大肠杆菌菌株（如 DH5 α 、TOP10、JM109、XL1-Blue 等），再抽提获得甲基化的质粒作为 PCR 反应模板。

6. 经过双酶切的克隆载体在插入突变 DNA 片段前，应首先通过自身连接检测，确保极低的自连背景。必要时可采用去磷酸化、切胶回收等方法把自连率降至最低，以免影响后续连接反应。