



08-03

KOD -Plus- Mutagenesis Kit

(Code No. SMK-101)

使用说明书

研究用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

[1]	简介.....	1
[2]	本试剂盒反向PCR突变的流程.....	2
[3]	制品内容.....	2
[3]	制品内容.....	3
[4]	注意事项.....	3
	(1) 模板用的质粒DNA	3
	(2) PCR引物的设计和要求	4
	(3) PCR条件	5
	(4) PCR过程中的第二位点突变 (目标突变以外的突变)	5
	(5) 对照质粒.....	5
[5]	操作说明.....	7
	(1) 反向PCR	7
	(2) 用Dpn I对模板质粒DNA进行消化	8
	(3) PCR产物自身环化	8
	(4) 转化.....	8
	(5) 突变体的确认.....	9
[6]	疑难解答.....	10
[7]	参考资料.....	10
	(1) 相关培养基和试剂的组成.....	10
	(2) 相关产品	11

【 注意 】

本产品为研究用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。
在使用本产品时，请严格遵守实验室的一般注意事项，安全操作。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as the patented 5' Nuclease Process claims in US Patents Nos. 5,210,015 and 5,487,972), no right to perform any patented method, and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[1] 简介

本产品采用高保真的KOD -Plus-酶，通过反向PCR法（Inverse PCR）进行定点突变。

反向PCR法是以环状DNA（如质粒）为模板，以反方向设计的两条引物对质粒进行完整的PCR。这样，通过引物设计导入突变或插入序列，或者在目标缺失序列两侧开始设计引物，从而在PCR产物上产生碱基突变或插入/删除序列，然后将PCR产物自身连接，转化后产生突变后的质粒。

本产品特征：

1. 突变域大

由于采用反向PCR法，不但可以实现几个碱基的替换、插入或缺失，还能进行几十个碱基的插入（Tag导入）和数百碱基的缺失。而且，也可以用任一种氨基酸替换特定部位的氨基酸进行饱和突变（Saturation Mutagenesis）

2. 突变的真实性

可以得到高达95%的突变体。而且，由于采用KOD -Plus-，并通过优化条件将PCR循环数降至最低，PCR过程中的第二位点突变（目标突变以外的突变）的可能性极小。对于10kb以上的质粒也可成功进行突变。

3. 操作简单*

使用本试剂盒不需使用磷酸化引物。PCR产物自身环化时，磷酸化反应和连接反应同时进行，包括转化在内一共只需简单的三个步骤。（图1）

*专利申请中

[2] 本试剂盒反向 PCR 突变的流程

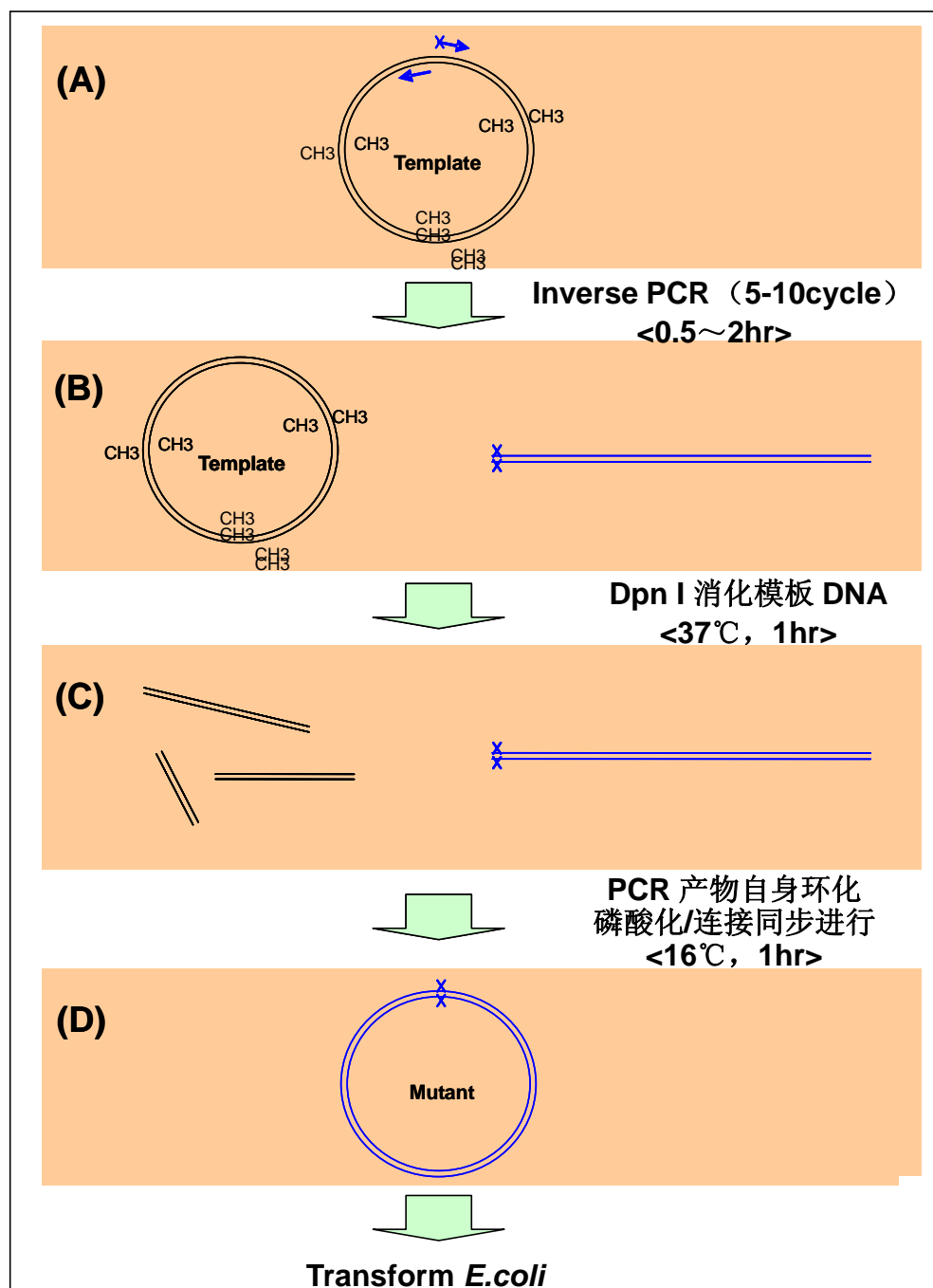


图 1. 本试剂盒用反向 PCR 进行突变的流程

- (A) 质粒 DNA 模板进行甲基化，在引物上导入突变位点，进行反向 PCR。
- (B) 利用 Dpn I 内切酶对甲基化的质粒 DNA 模板降解。
- (C) T4 多聚磷酸激酶和连接酶同时对 PCR 产物磷酸化反应和连接，自身环化。
- (D) 最后 PCR 产物形成环状质粒，进行转化。

[3] 制品内容

(-20℃保存)

名称	(20 回用* ¹⁾)
KOD -Plus- (1U/μl)	25μl
10x Buffer for iPCR	125μl
2mM dNTPs	125μl
Dpn I(10U/μl)	50μl
T4 Polynucleotide Kinase(5U/μl)	50μl
Ligation high	250μl
Control Plasmid pAK119M (50ng/μl)	10μl
Control Primer #1 (10 pmol/μl)	10μl
Control Primer #2 (10 pmol/μl)	10μl

*¹⁾ 本试剂盒可进行 20 个反应，其中包括 5 个阳性对照反应。

<其它需要的试剂>

- ·LB 琼脂培养基;
- ·50mg/ml 氨苄青霉素或 20mg/ml 卡那霉素;
- ·4% X-Gal 和 100mM IPTG; (需要蓝白斑筛选时)
- ·感受态细胞。

[4] 注意事项

(1) 模板用的质粒 DNA

在本试剂盒中，作为模板的质粒DNA必须在转化前用Dpn I酶切，以提高突变子的得率。Dpn I可专一性识别G^{m6}ATC序列，只能作用于甲基化或半甲基化的DNA，因此，作为模板的质粒DNA必须经甲基化处理。甲基化可甲基化酶作用而产生，常用的大肠杆菌菌株JM109或DH5a都含有甲基化酶，经这些菌株扩增产生的质粒都是甲基化质粒。如果由JM110或SCS110等甲基化缺失的菌株产生的质粒，则不会被甲基化，必须通过甲基化酶另外处理或再用JM109等菌株扩增，才能作为模板使用。

（2）PCR 引物的设计和要求

①关于设计

设计引物时应该遵循常规引物设计的原则，把突变设计入引物。突变部位（模板和引物不互补）应设计在5'端或靠近5'端，引物3'端与模板至少有20个碱基（最好25碱基以上）。如果在设计突变时引入或删除限制性酶切位点，会方便突变体的筛选。

使用本试剂盒，PCR产物自身环化时，磷酸化和连接反应同时进行，所以引物不必事先磷酸化。

注1) 本试剂盒采用KOD -Plus-, 3'→5'外切酶活性很强。如果突变部位靠近3'端，KOD -Plus-的校读活性可能会修复突变，得不到突变体。

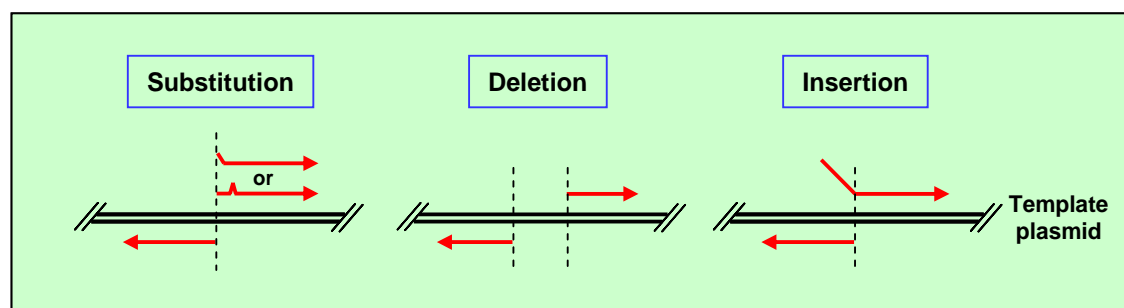


图 2. 引物上碱基替换、缺失和插入的设计示例

- 碱基替换：突变设计在 5'端或靠近 5'端，引物 3'端与模板至少有 20 个碱基（最好 25 碱基以上）。
- 缺失：在缺失序列的外侧开始设计引物，如果只需缺失几个碱基，也可参照碱基替换方式设计。
- 插入：在一条引物的 5'端引入插入序列，其 3'端至少保留 20 个碱基（最好 25 碱基以上）和模板互补。

②对引物的要求

反向PCR中，引物的纯度，尤其是引物的长度对成功率有很大影响。例如，引物中混入了部分5'端短缺的引物，最终自身连接的产物可能会缺失这几个碱基。所以，推荐使用HPLC纯化的引物，尤其当5'端存在重复碱基时。如果引物超过40mer，建议使用PAGE级引物。。

(3) PCR 条件

用反向PCR方法进行突变时，非特异性扩增对获得突变体有极大影响。本试剂盒添附了反向PCR专用Buffer，并对二步PCR循环条件进行了优化，可有效控制非特异性扩增。当然，模板DNA及引物的纯度，以及引物与模板的配对性，都可能引起非特异性扩增，因此，建议在进行反向PCR前，预先用常规PCR确认非特异性情况。PCR预实验可设10-20循环，然后用琼脂糖凝胶检测，如无杂带，可参考此条件进行反向PCR，循环数应低于预实验循环数。

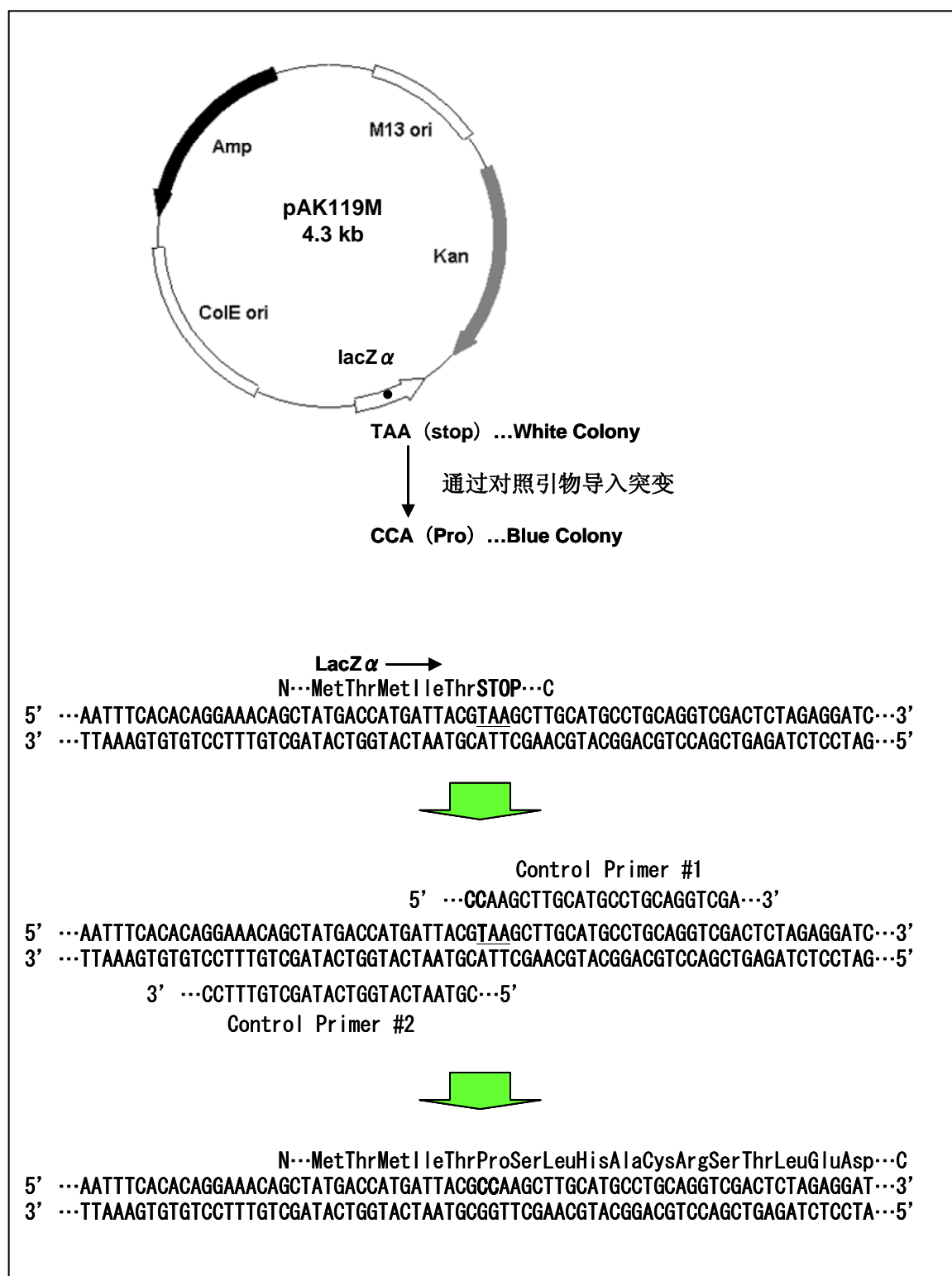
(4) PCR 过程中的第二位点突变（目标突变以外的突变）

本试剂盒采用了保真度极高的KOD -Plus-酶，PCR的循环数也尽可能减少，通常不会产生第二位点突变。但是即使其发生概率极低，第二位点突变也不可能完全避免，而且引物合成时也有可能摄入错误的碱基。因此，在突变体用于后续实验之前，请对突变体进行测序，以确认其序列。

(5) 对照质粒

本试剂盒中含有对照质粒（pAK119M），其LacZ基因已经突变，第6个氨基酸密码子突变为TAA（终止密码子）。当被转化入大肠杆菌后，在X-Gal板上形成白色菌落。利用试剂盒添附的对照引物进行突变反应后，该密码子可从TAA（终止密码子）恢复为CCA（Pro），转化后可在X-Gal板上产生蓝色菌落（图三），这样就可以简单地确认突变反应是否正确进行。根据本实验操作步骤进行该突变反应，通常可获得80%以上的蓝色菌落。

该对照质粒含氨苄青霉素和卡那霉素两种抗性。




[5] 操作说明

(1) 反向 PCR

- ① 将引物都稀释为10pmol/ul，模板质粒DNA浓度调整至50ng/ul。
- ② 按以下配比配制PCR反应液。

灭菌蒸馏水	35ul
10×Buffer for iPCR	5ul
2 mM dNTPs	5ul
引物 1 (10 pmol/ul)	1.5ul
引物 2 (10 pmol/ul)	1.5ul
Plasmid DNA (50ng/ul)	1ul
KOD -Plus-	1ul
Total Volume	50ul

- ③ 按以下条件进行PCR。


94°C	2 min		Y(4~10)循环*2
98°C	10 sec		
68°C	X min *1		
4°C	Hold		

注1) 延伸时间可按1min/kb来设定。例如质粒全长为5kb，延伸时间可定为5min。

注2) 循环数可按1循环/kb来设定。然而，因为最终得到的菌落数取决于所用感受态细胞的转化效率，建议将反应液分成两份，分别使用不同的循环数（例如，如果预实验PCR的循环数为10~20个循环，可分别用5个循环和10个循环。

注3) 用试剂盒添附的对照质粒和对照引物实验时，X = 4.5min，Y = 5，即延伸时间为4.5min，循环数设为5。

注4) 如果按上述条件操作，结果不理想，可尝试3步法扩增：

94°C	2 min		Y(4~10)循环
98°C	10 sec		
(Tm-5) °C	30 sec		
68°C	X min		
4°C	Hold		

（2）用 Dpn I 对模板质粒 DNA 进行消化

① PCR反应结束后，在PCR反应液（总量50ul）中加入2ul Dpn I，轻轻混匀。

注）如果PCR是分成2份做的，每管各加1ul Dpn I。

② Spin down，37℃反应1小时。

注）可用PCR仪作温浴设备，很方便。

（备注）Dpn I反应结束后，可取5ul消化液进行琼脂糖凝胶电泳，以确认PCR产物。有时因为循环数较少（5个循环或更少），可能观察不到条带，即便如此，也可继续实验，多数情况下也能得到突变克隆。

（3）PCR 产物自身环化

① 取出T4 Polynucleotide Kinase和Ligation high，冰浴融解。融解后，将Ligation high轻轻搅拌均匀，spin down。

② 取一个新的PCR管，如下配制反应液：

Dpn I 处理后 PCR 产物	2ul
灭菌蒸馏水	7ul
Ligation high	5ul
T4 Polynucleotide Kinase	1ul
<hr/>	
Total Volume	15ul

③ 轻轻搅拌均匀，spin down。

④ 16℃反应1小时。

注）可用PCR仪作温浴设备，很方便。

⑤ 取部分反应液转化大肠杆菌。

（4）转化

建议使用商品化感受态细胞，具体操作方法请参考相应说明书。以下按东洋纺公司生产的感受态细胞为例说明。

① 取出感受态细胞（100ul），冰浴融解。

注）溶解后，如果分成小份进行实验，相应地减少各试剂用量。

② 取上述自身环化产物10ul，加入感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴放置30min。

注) 建议用pBR322等载体同时转化另一管感受态细胞, 作为阳性对照并测定转化效率。
例如, 感受态细胞的转化效率为 1×10^9 cfu/ug pBR322, 1pg pBR322转化后, 取100ul培养液突变, 得到的菌落应为100个。

- ③ 42°C, 30Sec热休克, 冰浴放置2min。
- ④ 加入SOC培养基900ul, 37°C振荡培养1小时。
- ⑤ 取适量涂布于适当的抗生素LB平板。

注) 建议多涂几块平板, 每块板10-200ul。

注) 对于本试剂盒中的对照实验, 可涂布氨苄青霉素和卡那霉素板, 并加入IPTG/X-Gal。

- ⑥ 37°C培养过夜 (约16小时)

注) 对于对照实验, 如用 1×10^9 的感受态细胞转化, 取100ul涂布时, 可得到数百个菌落。如果操作恰当, 蓝色菌落 (突变体) 应占80%以上。

(5) 突变体的确认

挑取4-8个菌落, 小抽质粒, 用内切酶处理后电泳, 根据酶切图片确认是否突变。然后对必要片段测序以确定序列。

当然也可以不通过酶切鉴定, 直接用测序进行确认。

注) 如果分成两份分别以不同循环进行PCR, 建议挑取循环数较少所对应的菌落进行鉴定。

[6] 疑难解答

问题	原因	对策
得不到克隆或克隆数很少	反向 PCR 扩增不佳	进行预实验对引物和 PCR 条件进行确认和优化，以得到特异性条带。或凝胶回收 PCR 产物进行后续实验。
	目的片段扩增量少	增加反向 PCR 的循环数。
	感受态细胞转化率低	感受态细胞的转化率至少需要 10^8 。
克隆数太多（远远超出预计数量）	质粒DNA模板未甲基化。	可用甲基化酶处理或转化甲基化菌株扩增模板质粒。（参见[4]注意事项）
	LB培养板上抗生素失效或浓度不足	重新制备LB平板（抗生素平板在4℃下通常可保存1个月）。
得不到目标突变体（产生的质粒比原模板质粒小）	反向 PCR 扩增不佳(质粒小很可能是引物错配造成)	进行预实验对引物和 PCR 条件进行确认和优化，以得到特异性条带。或凝胶回收 PCR 产物进行后续实验。
得不到目标突变体（产生的质粒没有发生突变）	反向 PCR 扩增不佳	进行预实验对引物和 PCR 条件进行确认和优化，以得到特异性条带。或凝胶回收 PCR 产物进行后续实验。
	质粒DNA模板未甲基化。	可用甲基化酶处理或转化甲基化菌株扩增模板质粒。（参见[4]注意事项）
对照反应中，产生的菌落都是白色或大多数是白色	IPTG/X-Gal 浓度低	确认LB板的IPTG/X-Gal是否有效，同时确认抗生素是否有效。
	使用的大肠杆菌菌株不能进行蓝白筛选	换用DH5 α ，JM109等可进行蓝白筛选的菌株。

[7] 参考资料

(1) 相关培养基和试剂的组成

·LB培养基（1L）

10g蛋白胨、5g 酵母提取物、10g NaCl溶解后定容至1l，用NaOH溶液调节至pH7.2。

·LB/Ap板

1l LB液体培养基中加入15g Agar，高压灭菌。待冷却至50℃左右时，加入氨苄青霉素至终浓度100ug/ml，摇匀铺板，凝固后待用。

·LB/Kan板

1l LB液体培养基中加入15g Agar，高压灭菌。待冷却至50℃左右时，加入卡那霉素至终

浓度20ug/ml, 摇匀铺板, 凝固后待用。

·100mM IPTG (10ml)

0.24g IPTG用蒸馏水溶解, 定容至10ml。过滤除菌, 分装后-20℃保存。

·4% X-gal (10mL)

0.4g X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)用N,N-二甲基-甲酰胺(DMF)溶解, 定容至10ml, 分装。-20℃避光保存。

·LB/Ap (Kan) /IPTG/X-gal平板

取100mM IPTG和4% X-gal各20ul涂布LB/Ap (Kan) 板, 干燥后待用。

(2) 相关产品

品 名	内 容	Code No.
KOD -Plus- <高保真 PCR 酶>	200U	KOD-201
Dpn I	1,000U	DPN-101
T4 Polynucleotide Kinase	1,500U x 1 本	PNK-111
Ligation high <简捷、高效的连接试剂盒>	50 回用	LGK-101
MagExtractor -Plasmid- <利用磁硅珠抽提质粒>	100 回用	NPK-301
MagExtractor -PCR & Gel Clean up- <利用磁硅珠纯化 DNA 片段>	100 回用	NPK-601
Magical Trapper <磁性台架>	1 台	MGS-101

[制造・销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室

邮编：200122

交货期限・订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容・技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

3

代理商资料：