

Fast MultiSite Mutagenesis System

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FM201

版本号: Version 2.0

保存: DMT Chemically Competent Cell -70℃保存六个月; 其它-20℃ 保存一年。

产品说明

本产品通过在重叠区域引入突变位点的方法, 利用TransStart® FastPfu Fly PCR SuperMix 扩增, 制备包含突变的PCR 片段; 利用特殊的重组酶和同源重组原理, 将不多于6个片段无缝拼接, 从而实现多点突变。

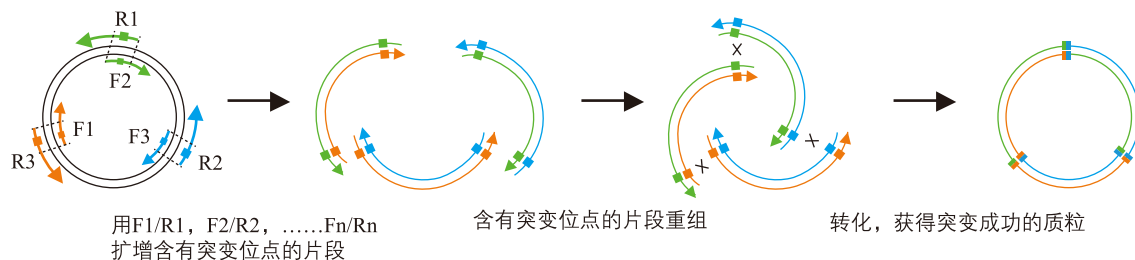
特点

- 快速: 扩增使用快速、超高保真2×TransStart® FastPfu Fly PCR SuperMix; 重组反应仅需15分钟。
- 灵活: 可在载体任意位置实现单点或多点、连续或不连续突变。
- 高效: 突变效率可达90%以上。

试剂盒组成

Component	FM201-01 (10 rxns)
2×TransStart® FastPfu Fly PCR SuperMix	1 ml
DMT Enzyme (10 units/μl)	30 μl
2×Assembly Mix	50 μl
DMT Competent Cell	10支 (50 μl/支)
Nuclease-free Water	1 ml

实验原理图



多点突变片段的制备

(1) 引物设计

引物包含5'端重叠区和3'端延伸区, 突变位点位于重叠区内, 如图1所示。

引物长度: 除突变点之外, 两条引物的长度大约25-40个核苷酸, 5'端重叠区包含15-25个碱基, 3'端延伸区包含至少10个碱基。

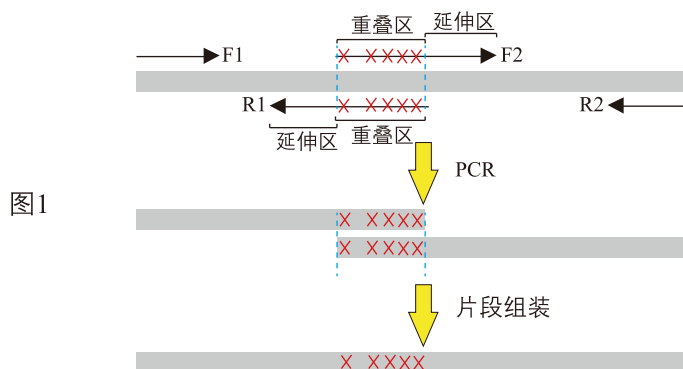


图1



(2) 突变片段的制备

A: 突变位点位于一对引物上: 如图2所示。

B: 突变位点位于多对引物上: F1/R1, F2/R2, ……Fn/Rn进行扩增, 如图3所示。

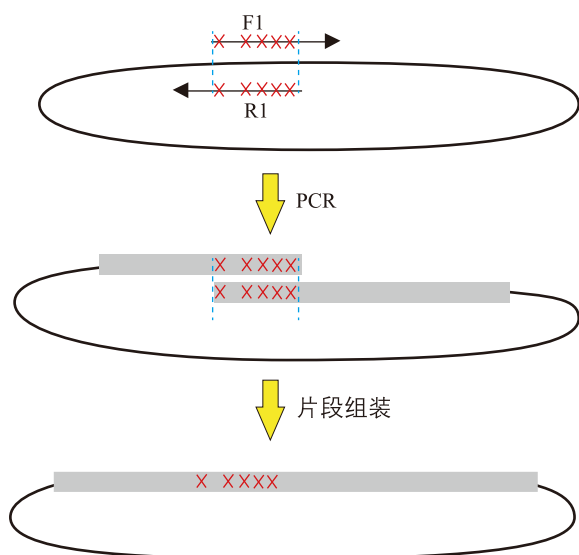


图2

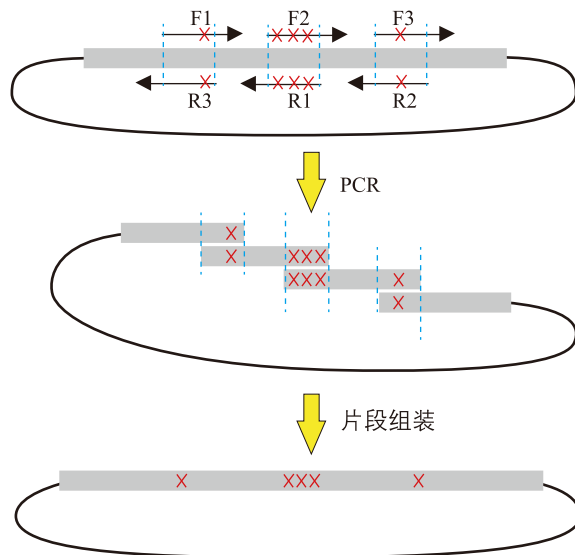


图3

推荐PCR体系与条件

Component	Volume	Final Concentration
Plasmid	1-10 ng	as required
Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM
2×TransStart® FastPfu Fly PCR SuperMix	25 μl	1×
Nuclease-free Water	to 50 μl	Not applicable

PCR

95°C	3 min	} 25 cycles*2
95°C	20 sec	
55°C-65°C*1	20 sec	
72°C	6 kb/min	
72°C	5-10 min	

注:

*1、退火温度根据引物合成报告初步确定, 或用梯度PCR的方法确定。

*2、通常建议PCR进行25个循环, 但是如果扩增产物较弱或模板量过低, 则建议30个循环。

电泳检测

取10 μl PCR产物, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

(3) DMT消化PCR产物

加1 μl DMT酶于50 μl PCR产物中, 混匀, 37°C孵育1小时。



(4) 纯化片段

如果扩增片段单一，建议用PCR产物纯化试剂盒纯化片段；如果有非特异扩增，建议用凝胶回收试剂盒回收片段。

突变片段组装

Component	Volume
2×Assembly Mix	5 µl
Amplified fragment A	x µl*
Amplified fragment B	y µl*
.....	
Amplified fragment N	z µl*
Nuclease-free Water	to 10 µl

*建议添加量20-150 ng之间

轻轻混合，50℃反应15分钟。反应结束后，将离心管置于冰上冷却数秒。

连接产物直接用于转化或保存于-20℃。

转化

(1) 加克隆产物于50 µl DMT感受态细胞中 (在感受态细胞刚刚解冻时加入连接产物)，轻弹混匀，冰浴20-30分钟。

(2) 42℃水浴热激45秒，立即置于冰上2分钟。

(3) 加250 µl平衡至室温的SOC或LB培养基，200 rpm、37℃培养1小时。

(4) 将适宜抗性的平板在37℃培养箱中预热。

(5) 取100-200 µl菌液均匀地涂在平板上，在37℃培养箱中过夜培养。

阳性克隆检测

用载体上合适的引物测序，进行序列分析。

注意事项

- 质粒模板品质高，否则影响突变片段的扩增。
- 纯化或回收的PCR产物品质较差时，突变率会显著降低。
- 菌落少时，建议转化时适当增加连接产物的量或者增加转化后菌液涂布量。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202109

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com.cn

