



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2019-11-02

快速定点突变试剂盒

Fast Mutagenesis Kit

(目录号: ZC401)

试剂盒组成	ZC401-1 10次	ZC401-2 20次
2×K-Pfu Mix	250μl	250μl×2
DMT Enzyme	10μl	10μl×2
DMT Competent Cell	10支 (50μl/支)	20支 (50μl/支)
Nuclease-free Water	1ml	1ml×2
Control Plasmid(5ng/μl)	10μl	10μl
Control Plimers(10mM)	10μl	10μl

保存: -20°C至少保存1年, DMT -80°C至少半年。

■ 设计原理

- 设计带有突变位点的引物, 使用2×K-pfu Mix合成大量带有突变位点的突变链。
- 引物设计带有重叠区域, 使扩增产物为环状, 可直接转化。
- 产物中少量的非突变的甲基化质粒模板, 通过DMT酶体外降解和DMT感受态细胞体内降解。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



■ 产品特点

- 2×K-Pfu Mix的高保真度，保证目的突变外无其他突变。
- 2×K-Pfu Mix扩增能力强，速度快，快速获得大量产物。
- 综合使用限制性内切酶（DMT酶）和DMT感受态细胞双重降解非突变的甲基化质粒模板，双重降解保证极高的突变效率。

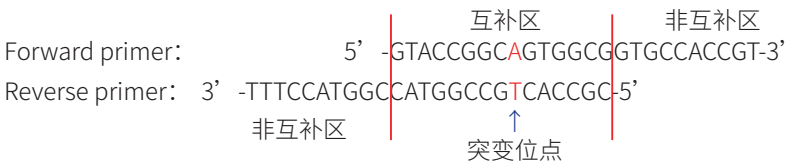
■ 引物设计

引物的5' 端为互补区，3' 端为非互补区。

引物的5' 端互补区含有15-20个碱基，3' 端非互补区含有至少10个碱基。

突变位点位于引物5' 端互补区（正向引物和反向引物均含有突变位点），TM值以突变碱基到3' 末端区域计算（不包括突变碱基，TM值高于55度为佳）。

引物设计举例:



■ 电泳检测

取5-10 μl PCR产物，琼脂糖凝胶电泳检测。若目的条带大小正确（杂带不影响后续实验），则用DMT酶消化后进行转化反应。

PCR产物的消化

取1μl DMT酶加入PCR产物中，混匀，37°C孵育1小时。

转化

- (1) 加入2-5 μl DMT酶消化产物于50 μl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°C水浴热激60秒，立即置于冰上2分钟。
- (3) 加250μl平衡至室温的SOC或LB培养基，180rpm、37°C培养1小时。
- (4) 将适宜抗性的平板在37°C培养箱中预热。
- (5) 取100-200μl菌液均匀地涂在平板上，在37°C培养箱中过夜培养。

注意

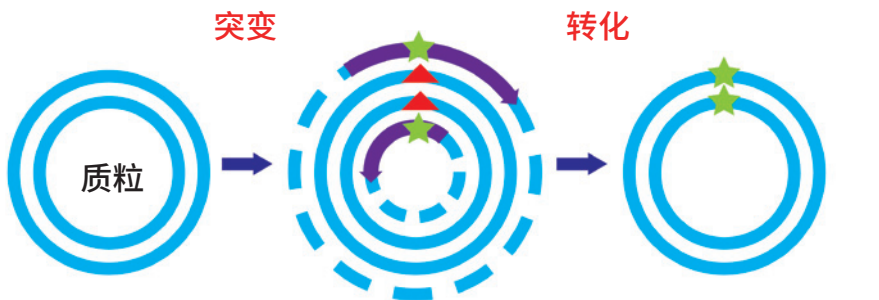
- 如无克隆生长，或克隆数少，用PCR产物纯化试剂盒纯化DMT酶消化产物，然后取2-5 μl 纯化后的产物转化。
- 如用对照质粒模板(4.5 kb)检验突变效率，在含氨苄的平板上涂8 μl 500 mM IPTG, 40 μl 40 mg/ml X-gal, 如突变成功菌落呈蓝色。

PCR

98°C	1-3min	} 20-25 cycles
98°C	10sec	
55°C	10-30sec	
72°C	4-6 kb/min	
72°C	5-10min	

推荐PCR体系与条件

组分	体积	终浓度
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 \times K-Pfu Mix	25 μl	1 \times
Nuclease-free Water	to 50 μl	Not applicable

**1: PCR扩增**

使用包含突变位点的正反向引物，PCR扩增出大量含有突变位点的质粒。

2: 降解非突变质粒模板

使用DMT酶和DMT感受态细胞双重降解非突变质粒模板。

▲=突变前
★=突变后