

MutUFO[®] Fast Mutagenesis Kit

UFO 快速突变试剂盒

C201



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品优点	1
产品组成	1
储存条件	2
产品应用	2
实验方案	2
注意事项	6
常见问题与解决方案	7

产品简介

MutUFO[®] Fast Mutagenesis Kit 是基于 CloneUFO[®]快速克隆技术的定点突变系统。使用本试剂盒，目标质粒扩增产物经胶回收或 DpnI 消化、CloneUFO[®]重组环化后直接进行转化即可完成定点突变。该试剂盒由两个模块组成：2 × Proofast[®] Max Master Mix 扩增模块和 CloneUFO[®] 快速克隆模块。

2 × Proofast[®] Max Master Mix 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，由于模板使用量极低，有利于原始甲基化模板的彻底降解。其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。

CloneUFO[®] 快速克隆系统利用高效的同源重组反应，使得 MutUFO[®] 定点突变试剂盒进行 DNA 定点突变时，线性化 PCR 产物能够高效环化，利于转化宿主，提高突变效率。

产品特点

- 2 × Proofast[®] Max Master Mix 高保真度提供突变率最低的高保真 PCR，Mix 预混液方便扩增操作
- 2 × Proofast[®] Max Master Mix 卓越的长片段扩增能力，有效扩增 20 kb 以内的任何质粒
- 模板使用量极低，有利于原始甲基化模板的彻底降解
- CloneUFO[®]快速克隆系统高效环化 PCR 产物
- DpnI 消除原始模板污染，消化后产物可直接用于重组反应
- 可对目标质粒上单个位点或两个不连续位点 (相距超过 50 bp) 同时进行定点突变

产品组成

组分	C201 (20 rxns)
2 × Proofast [®] Max Master Mix	500 µl
DpnI (10 U/µl)	40 µl
UvsXase [®]	40 µl
5 × UFO Buffer	100 µl

储存条件

本产品应置于-20℃储存。

产品应用

DNA 定点突变

实验方案



1. 引物设计

向质粒引入单碱基或连接多碱基定点突变，只需设计一对引物将质粒进行反向 PCR 扩增即可。引物设计原则为：正反向扩增引物 5'端包含 15 ~ 21 bp 反向互补区域 (GC 含量 40% ~ 60% 为佳)，各引物非互补区域长度至少为 15 bp (待突变位点至引物 3'端区域 T_m 值高于 60°C 为佳)。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 引入单碱基突变为例，引物设计具体方案如下图所示。



Fig. 1 向质粒引入单碱基或连续多碱基定点突变引物设计示意图

注意：计算引物 T_m 值时，应计算待突变位点至引物 3'端这一区域内的碱基，调整引物长度使这一段 T_m 值高于 60°C，待突变位点至引物 5'端区域内的碱基不应参与计算。

2. 目标质粒扩增

使用 2 × Proofast[®] Max Master Mix 对目标质粒进行扩增。反应各组分解冻后请充分摇匀，使用完毕后及时放回 -20°C。推荐反应体系如下：

组分	用量
ddH ₂ O	to 50 μl
2 × Proofast [®] Max Master Mix	25 μl
模板DNA*	optional
引物1 (10 μM)	2 μl
引物2 (10 μM)	2 μl

* 请勿使用带有尿嘧啶的引物或模板；在质粒能正常扩增的前提下，应尽量减少使用量，推荐使用 ≤ 1 ng 新鲜提取的质粒作模板。

体系配制完成后进行扩增反应，推荐 PCR 反应条件：

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	95°C	30 sec	Stage 1	Reps: 1
变性	95°C	15 sec		
退火*1	60°C ~ 72°C	15 sec	Stage 2	Reps: 30*2
延伸	72°C	30 ~ 60 sec/kb		
彻底延伸	72°C	5 ~ 10 min	Stage 3	Reps: 1

*1 2 × Proofast[®] Max Master Mix 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。

*2 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。

3. 扩增产物 DpnI 消化，去除甲基化模板质粒

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，必须在进行重组环化之前进行 DpnI 消化。

推荐反应体系如下：

组分	用量
DpnI	1 μ l
扩增产物	40 ~ 50 μ l

轻轻吹打混匀后，将上述反应体系置于 37°C 恒温反应 1 ~ 2 h。

注意：如果扩增产物进行琼脂糖电泳检测条带不单一，扩增不特异，DpnI 消化后应进行胶回收。

4. 进行重组反应

直接使用扩增产物进行重组反应时，加样体积不应超过重组反应总体积的 1/5；

(1) 最适 DpnI 消化产物最适使用量计算：

UvsXase[®] 单点突变重组反应体系最适 DNA 使用量为 0.03 pmol。该摩尔数对应的 DNA 质量可以由以下公式粗略计算获得：

$$0.03 \text{ pmol 对应 DpnI 消化产物使用量} = (0.03 \times 0.325 \times 2 \times \text{载体碱基对数}) \text{ ng}$$

例如，向长度为 6 kb 的目标质粒引入单点突变，DpnI 消化产物最适使用量应为： $0.03 \times 0.325 \times 2 \times 6000 = 117 \text{ ng}$ ；其式中 325 为四种核苷酸的分子量平均值；2 表示双链。

注意：DNA 量太多或者太少都将降低环化效率。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 消化产物量最适使用量计算值不足 50 ng 或者超过 400 ng 时，反应时加入 50 ng 或 400 ng 即可。DpnI 消化产物不纯化直接用于重组反应时，使用量不应超过反应总体积的 1/5，即 4 μ l。

(2) 于冰水浴中配制如下反应体系：

组分	用量
ddH ₂ O	to 20 μ l
5 × UFO Buffer	4 μ l
DpnI 消化物	50 ~ 400 ng
UvsXase [®]	2 μ l

* 如果不慎将液体粘在管壁，可通过短暂离心使其沉入管底；直接使用扩增产物进行重组反应时，加样体积不应超过重组反应总体积的 1/5。

(3) 重组反应：

体系配制完成后，用移液器轻轻吹打，混匀各组分。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

(1) 在冰上解冻克隆感受态细胞（如：DH5 α 、BL21、TOP10）。

(2) 取 10 μ l 重组产物加入到 100 μ l 感受态细胞中，枪头轻轻旋转 5 圈混匀，冰上静置 30 min。

- (3) 42°C水浴热激 90 sec, 立即置于冰水上冷却 2 ~ 3 min。
- (4) 加入 800 μ l SOC 或 LB 培养基 (不添加抗生素), 37°C 200 rpm 孵育 1 h。
- (5) 4,000 rpm 离心 5 min, 弃掉 800 μ l 上清。用剩余培养基重悬菌体后全部涂板, 平板正放 5 min 固定涂布菌液。
- (6) 37°C培养箱中倒置培养 12 ~ 16 h。

注意事项

下表列出了使用 MutUFO[®]进行 DNA 定点突变时主要注意事项：

实验步骤	推荐操作	不推荐操作
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	按照 Fig. 1 进行设计	引物反向互补区域少于推荐长度或者添加错误
质粒 PCR 扩增	进行高特异性扩增反应	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 $^{\circ}$ C 反应 30 min	反应温度偏离 37 $^{\circ}$ 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 h 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 长时间储存后进行转化

常见问题与解决方案

1. 转化后没有克隆或克隆数极少：

- (1) 感受态细菌效率不够高，请检测一下感受态细胞的效率，确保转化效率在 10^7 以上，当然高一些更好。
- (2) 把 DpnI 消化后的产物用常规的乙醇沉淀方法进行沉淀，然后溶解在较小的体积中。这样就可以把所有的产物全部用于转化。
- (3) 优化基因定点突变中的 PCR 参数。可以把最初的 95°C 变性时间延长为 5 min，循环中 95°C 变性的时间延长至 1 min，把循环中的 68°C 的延伸时间改为 1 min/kb 至 2 min/kb，退火可以改为 $60 \sim 55^{\circ}\text{C}$ 或 $65 \sim 55^{\circ}\text{C}$ 等的 touch down，退火时间也可以适当延长。
- (4) 引物设计有问题。通过突变反应中的 PCR 没有很好地扩增出预期的突变质粒。
- (5) 如果使用矿物油 (mineral oil)，在转化时如果把矿物油带入感受态菌，会严重影响转化效率。

2. 有克隆，但没有或很难检测到预期的突变克隆：

- (1) DpnI 消化效果不佳。一种可能是加入 DpnI 后，由于该酶在甘油中，会迅速下沉，如果没有混匀就会严重影响 DpnI 的消化作用。另一种可能是 DpnI 由于保存不当或保存时间过长等原因导致活性下降，这时可以适当延长消化的时间至 1 ~ 2 h。
- (2) 使用的待突变的模板质粒量过多，导致 DpnI 消化时不完全。我们这里推荐的模板质粒用量 $0.5 \mu\text{g}$ ，已经是模板质粒用量的上限，不能再使用更多的模板质粒了。
- (3) 尽量避免多次反复冻融 dNTP。可以把 dNTP 适当分装后再使用。

3. 有突变克隆，但突变位点不是预期的位点：

- (1) 引物设计不佳，并且 PCR 反应中退火温度过低，导致引物退火到错误的地方。
- (2) 引物质量较差，没有经过 PAGE 纯化。这样引物中通常会含有比设计的引物要短的特异性较差的引物，容易导致非预期的突变。



0 2 5 - 8 5 6 5 3 5 2 5

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园 D 6 幢 710 室