

Mut Express® II
Fast Mutagenesis Kit V2

C214



使用说明书

Version 21.1

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	02
06/注意事项	02
07/实验原理与流程概要	03
08/实验流程	04
08-1/引物设计	04
08-2/目标质粒扩增	05
08-3/扩增产物Dpn I 消化	06
08-4/消化产物浓度测定	06
08-5/消化产物用量	06
08-6/重组反应	07
08-7/重组产物转化	07
08-8/重组产物鉴定	08
09/常见问题与解决方案	08

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/产品概述

Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2是基于ClonExpress 同源重组技术，可用于质粒上单/双点突变的定点突变系统。该试剂盒整合了Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase扩增模块和ClonExpress快速克隆模块。Phanta Max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，其卓越的长片段扩增能力，广泛适用于小于20 kb的任何质粒扩增。ClonExpress快速克隆系统利用高效的同源重组反应替代了传统的退火成环反应。使用Mut Express II定点突变试剂盒进行定点突变时，引物设计更加灵活，模板用量极低，有利于原始甲基化模板的彻底降解。高度优化的重组反应缓冲液及增强的重组酶Exnase II，显著提高重组环化的效率与对杂质的耐受度，如扩增产物特异，其Dpn I 消化产物可不进行DNA纯化而直接用于重组反应。

02/产品组分

组 分	C214-01 (10 rxns)	C214-02 (25 rxns)
2 × Max Buffer	1.25 ml	1.25 ml
dNTP Mix (10 mM each)	20 µl	50 µl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	20 µl	50 µl
Dpn I (10 U/µl)	20 µl	50 µl
5 × CE II Buffer	40 µl	100 µl
Exnase II	20 µl	50 µl

03/保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

▲使用过程中避免反复冻融。

04/适用范围

◇突变：1-2个位点突变（相距50 bp以内的多个碱基可计为1个突变位点）

◇微片段插入：在载体上任意位置插入不超过50 bp的特定序列

◇删除：对载体上特定序列进行删除

▲使用本试剂盒对质粒进行定点突变时，请使用甲基化酶无缺陷的宿主菌（如XL10、DH5α、JM109）扩增原始质粒！

05/自备材料

原始质粒、突变引物；

感受态细胞：克隆菌株制备的化学感受态细胞；

DH5α Competent Cell (Vazyme #C502) 常规克隆，适用于<15 kb质粒；

XL10 Competent Cell (Vazyme #C503) 大片段克隆，适用于>10 kb质粒；

Fast-T1 Competent Cell (Vazyme #C505) 快速克隆；

其他材料：ddH₂O、PCR管、PCR仪等。

06/注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

07/实验原理与流程概要

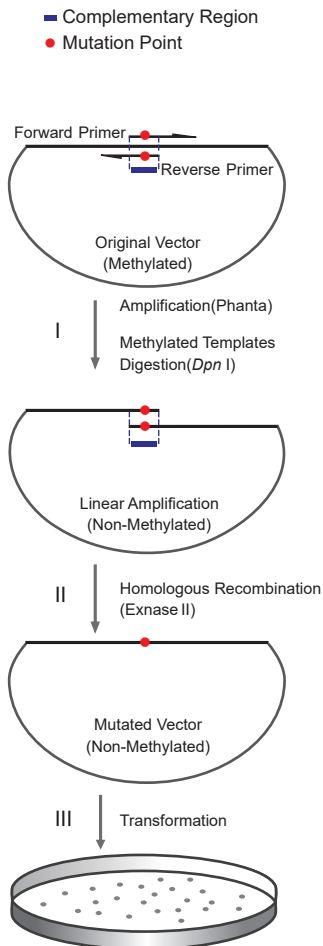


Fig 1A. 单碱基(或连续多碱基)突变流程图

- I. 扩增引入突变：设计部分反向互补的引物，对原始质粒进行反向扩增，使用 *Dpn* I 消化扩增产物。
- II. 重组反应：取一定量的扩增产物，在 *Exnase* II 催化下，37°C 反应 30 min 即可完成重组反应。
- III. 转化感受态细胞：重组产物直接进行转化，平板上会形成数百个单克隆供后期阳性筛选。

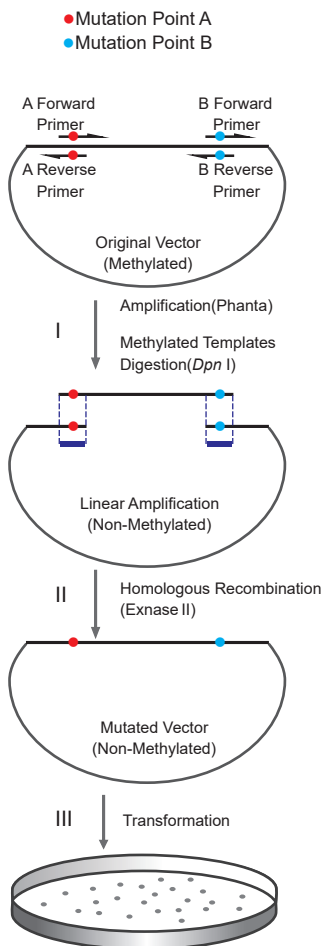


Fig 1B. 不连续双碱基突变流程图

- I. 扩增引入突变：在 A、B 两个突变位点分别设计部分反向互补的引物。将两对引物交叉使用，AF+BR 扩增得到 AB 段，BF+AR 扩增得到 BA 段，使用 *Dpn* I 消化扩增产物。
- II. 重组反应：将 AB 段和 BA 段按比例混合，在 *Exnase* II 催化下，37°C 反应 30 min 即可完成重组反应，实现两线性化 DNA 的体外环化。
- III. 转化感受态细胞：重组产物直接进行转化，平板上会形成数百个单克隆供后期阳性筛选。

08/实验流程

08-1/引物设计

1. 单碱基(或连续多碱基)定点突变引物设计

向质粒引入单碱基或相距50 bp以内的多个碱基定点突变，只需设计一对引物将质粒进行反向PCR扩增即可。

引物设计方式为：**5' - 15 - 21 bp反向互补区域 + 至少15 bp的非互补区域 - 3'**

- ▲ 反向互补区域GC含量40% - 60%为佳，避免选择有重复序列的区域，待突变位点至引物3'端Tm值>60℃为佳，待突变位点至引物5'端区域内碱基不应参与计算；
- ▲ 待突变位点可置于互补区域内(需要两条引物上均引入点突变)，也可置于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。

推荐登陆诺唯赞官网下载引物设计软件CE Design (<http://www.vazyme.com>)，自动生成扩增引物。

若手动设计，可参照以下实例：

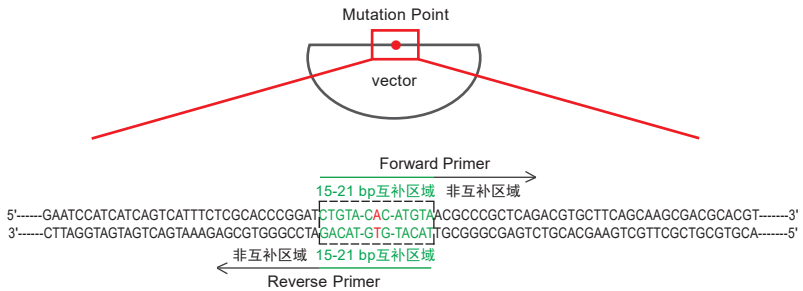


Fig 2. 单碱基(或连续多碱基)定点突变引物设计示意图

2. 不连续双碱基定点突变引物设计(两突变位点相距超过50 bp)

向质粒上相距较远的两个不连续位点引入定点突变，只需在每个待突变位点处各设计一对反向互补或部分反向互补的引物将质粒分为两段进行扩增即可。

- ▲ 该方法也适用于解决单位点突变时由于质粒过大或局部高级结构无法扩增的问题，可在距待突变位点较远处增设一个“B”位点(不引入突变)将质粒分段扩增，然后按双碱基定点突变方案进行重组即可。

引物设计方式为：**5' - 15 - 21 bp反向互补区域 + 适当长度的非互补区域(可无) - 3'**

- ▲ 反向互补区域GC含量40% - 60%为佳，避免选择有重复序列的区域，待突变位点至引物3'端Tm值>60℃为佳，待突变位点至引物5'端区域内碱基不应参与计算；
- ▲ 待突变位点可置于互补区域内(需要两条引物上均引入点突变)，也可置于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。

推荐登陆诺唯赞官网下载引物设计软件CE Design (<http://www.vazyme.com>)，自动生成扩增引物。若手动设计，可参照以下实例：

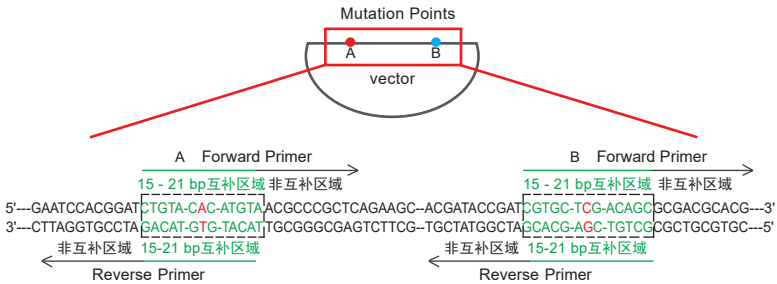


Fig 3. 不连续双碱基定点突变引物设计示意图

08-2/目标质粒扩增

使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase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℃。推荐反应体系如下：

组分	体积
ddH ₂ O	Up to 50 μl
2 × Max Buffer	25 μl
dNTP Mix (10 mM each) ^a	1 μl
模板DNA ^b	Optional
引物1 (10 μM) ^c	2 μl
引物2 (10 μM) ^d	2 μl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase ^d	1 μl

- 请勿使用dUTP和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；
- 若进行目标质粒的分段扩增，使用位点A正向扩增引物和位点B反向扩增引物扩增AB段；使用位点B正向扩增引物和位点A反向扩增引物扩增BA段；
- 推荐酶的终浓度为1 U/50 μl反应。可将Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase在0.5 - 2 U/50 μl之间进行优化，但不要超过2 U/50 μl，尤其当扩增子长度大于5 kb时。

推荐PCR反应条件如下：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	30 sec	1
变性	95℃	15 sec	} 30°
退火 ^a	60 ~ 72℃	15 sec	
延伸 ^b	72℃	30 - 60 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	1

- Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase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Tm值即可。如需要，可设置不同温度梯度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；
- 延长延伸时间有助于提高扩增产量；
- 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 。如扩增效率良好，推荐扩增循环数应 ≤ 30 。

反应结束后取少量扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。如目标质粒正确扩增，则可进行下步实验。

08-3/扩增产物Dpn I 消化

因08-2/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，必须在重组环化之前进行Dpn I消化，去除甲基化模板质粒。推荐反应体系如下：

组分	体积
Dpn I	1 μ l
扩增产物	40 - 50 μ l

轻轻吸打混匀后，短暂离心收集至管底，置于37°C恒温反应1 - 2 h。

- ▲ 如08-2步骤扩增特异，产物条带单一，Dpn I消化产物无需纯化，可直接用于后续重组反应，但消化产物加入总体积不应超过重组反应体积的1/5。如扩增不特异，Dpn I消化结束后应胶回收纯化目标扩增产物。

08-4/消化产物浓度测定

浓度测定：

若消化产物已通过高质量的试剂盒进行胶回收纯化，且经电泳检测无明显杂带或Smear残留时，可使用Onedrop等基于吸光值的仪器进行浓度测定，但只有当A260/A280在1.8 - 2.0之间时浓度值可信。推荐使用Nanodrop、Onedrop、Qubit、PicoGreen等进行浓度测定。

08-5/消化产物用量

1. 单碱基(或连续多碱基)定点突变消化产物用量

Exnase II单碱基定点突变重组反应体系最适摩尔比为0.03 pmol。摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

$$\text{Dpn I 消化产物最适使用量} = [0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$$

2. 不连续双碱基定点突变消化产物用量

Exnase II不连续双碱基定点突变重组反应两段消化产物最适摩尔比为1 : 2，其中较长片段0.03 pmol，较短片段0.06 pmol。这些摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

$$\text{较长片段Dpn I 消化产物使用量} = [0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$$

$$\text{较短片段Dpn I 消化产物使用量} = [0.04 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng (0.06 pmol)}$$

例如，AB段长度为1 kb，BA段长度为5 kb。则Dpn I消化产物最适使用量为：AB段 $0.04 \times 1,000 = 40 \text{ ng}$ ；BA段 $0.02 \times 5,000 = 100 \text{ ng}$ 。

- a. DNA量太多或者太少都将降低环化效率，尤其在进行双碱基突变时，请尽量严格按照推荐量配制反应体系。
- b. *Dpn* I 消化产物使用量应在20 - 200 ng之间。当使用上述公式计算DNA最适使用量超出这个范围时，直接选择最低/最高使用量即可。
- c. *Dpn* I 消化产物不纯化直接用于重组反应时，加入总体积不应超过反应体积的1/5，即4 μ l。

08-6/重组反应

Mut Express独特的引物设计方案(参见08-1/引物设计)使得扩增消化产物在Exnase II催化下，可将待突变位点进行高效重组，实现线性DNA的体外环化。

1a. 对于单碱基(或连续多碱基)定点突变，于冰上配制以下反应体系：

组分	重组反应	阴性对照 ^a
<i>Dpn</i> I 消化产物	50 - 400 ng	50 - 400 ng
5 × CE II Buffer	4 μ l	0 μ l
Exnase II	2 μ l	0 μ l
ddH ₂ O	Up to 20 μ l	Up to 20 μ l

1b. 对于不连续双碱基定点突变，于冰上配制以下反应体系：

组分	重组反应	阴性对照 ^a
AB段 <i>Dpn</i> I 消化产物 ^b	X μ l	X μ l
BA段 <i>Dpn</i> I 消化产物 ^b	Y μ l	Y μ l
5 × CE II Buffer	4 μ l	0 μ l
Exnase II	2 μ l	0 μ l
ddH ₂ O	Up to 20 μ l	Up to 20 μ l

- a. 扩增模板量过高或*Dpn* I 消化不完全易造成较高的假阳性背景，因此推荐设置阴性对照。
 - b. X/Y根据AB、BA段相对大小按公式计算得到具体用量。
2. 使用移液器轻轻吸打混匀(请勿振荡混匀)，短暂离心将反应液收集至管底。
 3. 37°C，30 min；降至4°C或立即置于冰上冷却。
 - ▲ 推荐在PCR仪等温控比较精确的仪器上进行反应。重组效率在反应30 min左右达到最高，反应时间不足或太长都将会降低克隆效率。
 - ▲ 重组产物可于-20°C存放一周，待需要时解冻转化即可。

08-7/重组产物转化

1. 在冰上解冻克隆感受态细胞(如：DH5 α Competent Cell, Vazyme #C502)。
2. 取10 μ l重组产物加入到100 μ l感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置30 min。
 - ▲ 重组产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的1/10；
3. 42°C水浴热激45 sec后，立即置于冰上冷却2 - 3 min。
4. 加入900 μ l SOC或LB液体培养基(不添加抗生素)，37°C摇菌1 h(转速200 - 250 rpm)。

5. 将相应抗性的LB固体培养基平板在37°C培养箱中预热。
6. 5,000 rpm (2400 × g)离心5 min, 弃掉900 μl上清。用剩余培养基将菌体重悬, 用无菌涂布棒在含有正确抗性的平板上轻轻涂匀。
7. 37°C培养箱中倒置培养12 - 16 h。

08-8/重组产物鉴定

过夜培养后, 若重组反应转化平板上的克隆数目显著高于阴性对照, 可挑取若干个单克隆接种至含有适当抗生素的LB液体培养基中培养过夜, 提取质粒进行一代测序。

09/常见问题与解决方案

◇ 质粒模板无法正常扩增

- ① 推荐引物设计软件CE Design, 选择相应模块进行设计。
- ② 引物设计有误: 核对引物设计方案。
- ③ 扩增体系配制错误: 重复实验。
- ④ 扩增反应条件不适宜: 调整Mg²⁺浓度、酶量、扩增程序。
模板质粒质量偏差: 长期放置、反复冻融会导致模板质粒断裂、开环或降解, 应使用新鲜制备的质粒作为模板。

◇ 平板上长不出克隆或克隆数目很少

- ① 引物设计不正确: 引物包含15 - 20 bp同源臂, GC含量40% - 60%。
- ② 加入的DNA使用量不足/过量, 或者比例不佳: 尽量按照说明书中推荐的量和比例配制重组反应体系。
- ③ 重组环化反应体系中DNA不纯, 抑制反应: 未纯化DNA使用体积不应超过4 μl(反应体系体积的1/5); 建议将产物进行凝胶回收纯化, 纯化产物溶解在ddH₂O中。
- ④ 感受态细胞效率低: 感受态细胞的转化效率需大于10⁸ cfu/μg。可进行简单检测, 转化0.1 ng质粒, 取1/10进行涂板, 生长1,000个菌斑, 估算转化效率为10⁸ cfu/μg; 重组产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的1/10, 否则会降低转化效率; 选择克隆用感受态细胞(如DH5α/XL10/Fast-T1), 不能选择表达感受态细胞。

◇ 定点突变未正确完成

- ① 引物设计错误: 核对引物设计方案。
- ② 扩增反应所用模板为非甲基化的质粒: *Dpn* I只能识别甲基化DNA, 请务必使用从甲基化酶无缺陷的宿主菌中扩增的质粒作为PCR模板。
- ③ 扩增反应使用过多的模板质粒: 对于大多数质粒, 1 ng模板量已足以使扩增反应正常进行, 过多的质粒模板将会导致*Dpn* I消化不完全, 降低突变成功率。

◇ 非目标位点突变

- ① 模板质粒携带未知位点突变：测序确认模板质粒序列正确性。
- ② 扩增循环数过多：为了防止扩增过程中引入非目标突变，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 。



Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: 400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

Service: service@vazyme.com

