

Fast Mutagenesis System

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FM111

版本号: Version 2.0

保存: DMT Chemically Competent Cell -70℃保存六个月, 其它-20℃保存两年。

产品说明

本产品以甲基化的质粒为模板, 采用部分重叠引物 (均含突变点) 设计, 使用2×*TransStart*[®] *FastPfu* Fly PCR SuperMix扩增, 扩增产物用DMT限制性内切酶消化甲基化质粒模板后, 转化具有降解甲基化质粒模板的感受态细胞。本产品具有突变效率高, 操作简便的优点。

特点

- 由于采用部分重叠引物 (均含突变点) 设计, 使PCR呈指数扩增, 扩增产物凝胶电泳可见, 扩增产物为环状, 易于转化;
- 使用2×*TransStart*[®] *FastPfu* Fly PCR SuperMix扩增, 缩短了扩增时间, 同时提高了扩增的保真性;
- 利用体外限制性内切酶和体内感受态细胞降解甲基化质粒模板, 突变效率更高, 对照突变效率高达90%。

试剂盒组成

Component	FM111-01 (10 rxns)	FM111-02 (20 rxns)
2× <i>TransStart</i> [®] <i>FastPfu</i> Fly PCR SuperMix	250 μl	500 μl
DMT Enzyme (10 units/μl)	10 μl	20 μl
DMT Competent Cell	10支 (50 μl/支)	20支 (50 μl/支)
Nuclease-free Water	1 ml	1 ml
SControl Plasmid (5 ng/μl)	10 μl	20 μl
SControl Primers (10 μM)	10 μl	20 μl

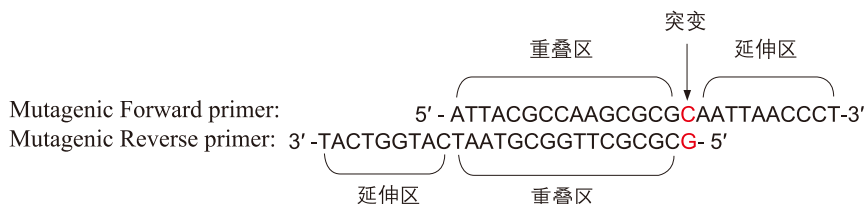
设计原理

- 引物与模板链退火, 2×*TransStart*[®] *FastPfu* Fly PCR SuperMix合成突变链。
- DMT酶体外降解非突变型质粒模板 (甲基化质粒模板) 和DMT感受态细胞体内降解非突变型质粒模板 (甲基化质粒模板), 从而有效地筛选突变克隆。

引物设计

- 引物包含5'端重叠区和3'端延伸区。
- 引物长度: 除突变位点之外, 两条引物的长度大约25-30个核苷酸, 5'端重叠区包含15-20个碱基, 3'端延伸区包含至少10个碱基。
- 突变引物: 突变位点位于两条引物上, 分别位于: 正向突变引物重叠区下游、紧邻重叠区, 反向突变引物5'端。
- 退火温度的计算不包括突变碱基。

引物设计举例



推荐PCR体系与条件

Component	Volume	Final Concentration
Plasmid	1-10 ng	as required
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
2 $\times$ TransStart [®] FastPfu Fly PCR SuperMix	25 μ l	1 $\times$
Nuclease-free Water	to 50 μ l	Not applicable

PCR

94 $^{\circ}$ C	2-5 min	} 20-25 cycles
94 $^{\circ}$ C	20 sec	
55 $^{\circ}$ C	20 sec	
72 $^{\circ}$ C	6 kb/min	
72 $^{\circ}$ C	10 min	

电泳检测

取10 μ l PCR产物，1%琼脂糖凝胶电泳检测。

注意

即使观察到多条扩增条带，如果目的条带大小正确，可继续用DMT消化及转化反应。

PCR产物的消化

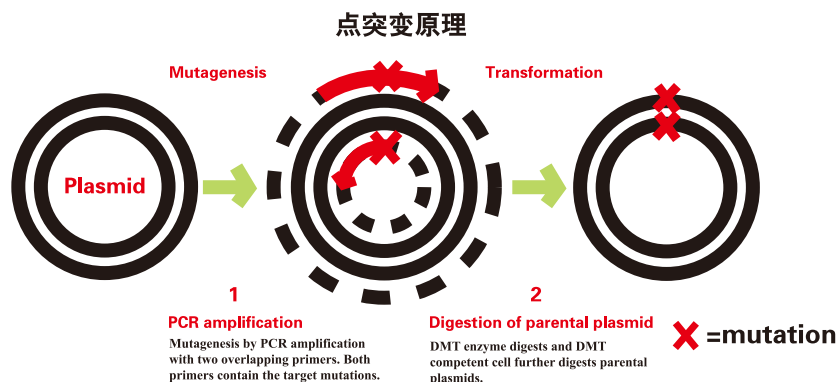
加1 μ l DMT酶于PCR产物中，混匀，37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

转化

- (1) 加入2-5 μ l DMT酶消化产物于50 μ l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 $^{\circ}$ C水浴热激45秒，立即置于冰上2分钟。
- (3) 加250 μ l平衡至室温的SOC或LB培养基，200 rpm、37 $^{\circ}$ C培养1小时。
- (4) 将适宜抗性的平板在37 $^{\circ}$ C培养箱中预热。
- (5) 取100-200 μ l菌液均匀地涂在平板上，在37 $^{\circ}$ 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 μ l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 μ l 500 mM IPTG，40 μ l 40 mg/ml X-gal，如突变成功菌落呈蓝色。



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

