

Fast Mutagenesis System

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FM111

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

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。

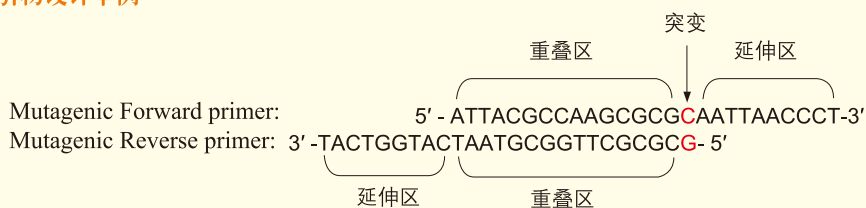
特点

- 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。
- 采用部分重叠引物设计, 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。
- 同类型产品只利用体外限制性内切酶或体内感受态细胞降解非突变型质粒模板。本试剂盒综合了上述两种方法, 能更有效地降解甲基化的质粒模板, 突变效率更高, 对照突变效率高达90%。

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 μM)	1 μl	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM
2× <i>TransStart</i> [®] <i>FastPfu</i> Fly PCR SuperMix	25 μl	1×
Nuclease-free Water	to 50 μl	Not applicable



PCR

94°C	2-5 min	} 20-25 cycles
94°C	20 sec	
55°C	20 sec	
72°C	2-6 kb/min	
72°C	10 min	

电泳检测

取10 μl 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 μl DMT酶于PCR产物中，混匀，37°C孵育1小时。

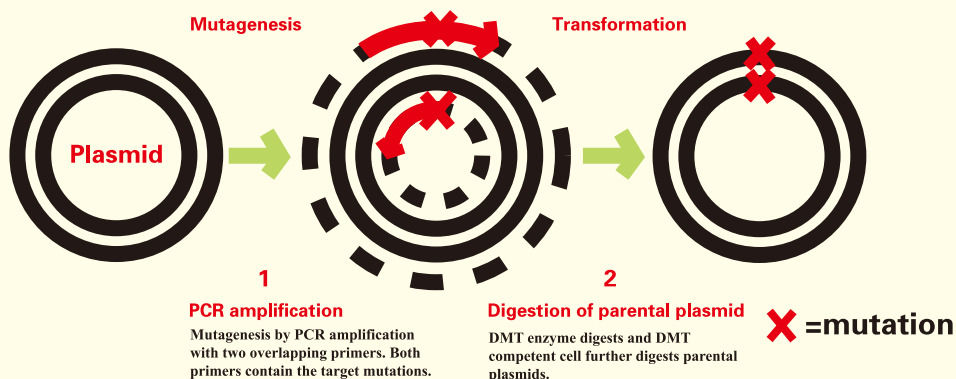
转化

- (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°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100-200 μl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。

点突变原理



本产品仅供研究，不用于临床诊断。

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

