

Code No. R401

研究用

---

**TaKaRa**

TaKaRa MutanBEST Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒原理	1
● 操作方法	2
I. PCR 反应	2
II. Blunting Kination 反应	2
III. Ligation 反应	2
IV. 结果	3
● 注意事项	3

## ● 制品说明

本制品是利用PCR技术进行定点突变操作的试剂盒。其原理是利用导入变异点的引物进行PCR反应后，对PCR产物进行末端平滑化及5'磷酸(P)化处理，再用高效连接试剂Ligation Solution I进行自身连接(环化反应)，然后转化、提取突变体DNA。

本试剂盒的原理十分简单，但Taq酶在PCR过程中的错配率限制了这一技术的应用。现在，Takara的Pyrobest DNA Polymerase使这一技术得到了很好地发挥。Pyrobest DNA Polymerase不仅具有较高的保真性(Fidelity)，并且和TaKaRa Taq具有同样的扩增效率。与其他突变试剂盒相比，本试剂盒的主要特点是操作方便、简单，只需一天时间便可完成整个操作，并且不受载体、宿主菌的限制。

## ● 制品内容 (20次量)

Pyrobest DNA Polymerase (5 U/μl)	15 μl
10×Pyrobest Buffer II	200 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	180 μl
10×Blunting Kination Buffer	50 μl
Blunting Kination Enzyme Mix	25 μl
Ligation Solution I	150 μl

## ● 保存: -20°C

## ● 试剂盒原理

试剂盒原理见图1，全套操作约需5小时，简单说明如下。

1. 设计一对5'端邻接，3'端方向相反的引物用以导入变异点。
2. 进行PCR扩增(使用高保真DNA聚合酶Pyrobest DNA Polymerase)。
3. PCR片段的末端平滑化及5'末端磷酸化反应(在同一反应体系内进行，反应只需10分钟)。
4. 自身连接反应(使用本试剂盒中的DNA高效连接液Ligation Solution I，连接反应只需30分钟~1小时)。
5. 质粒DNA转化，挑选变异体。

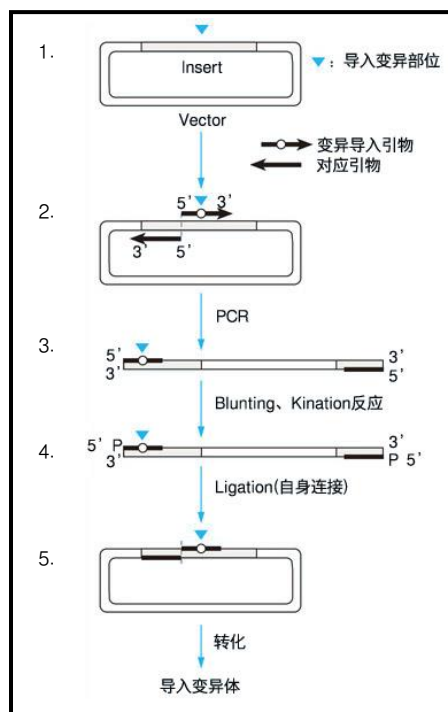


图 1. TaKaRa MutanBEST Kit 原理图

## ● 操作方法

### I) PCR 反应

1. 设计合成变异导入 Primer 和对应的 PCR 用 Primer。对应 PCR 用 Primer 的 5' 端碱基的互补碱基必须和变异导入 Primer 的 5' 端碱基相邻接 (见图 1)。
2. 配制下列组成的 PCR 反应液, 全量 50  $\mu$ l。

试剂名称	使用量
<i>Pyrobest</i> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
10 $\times$ <i>Pyrobest</i> Buffer II	5 $\mu$ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer 1 (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer 2 (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Template	0.01~1 ng
灭菌水	up to 50 $\mu$ l

3. 按下列反应条件进行 PCR 反应。  
94°C, 30 sec }  
55°C, 30 sec } 30 Cycles  
72°C, 5 min }
4. 对 PCR 反应液进行 1% Agarose 凝胶电泳。
5. 切胶回收目的 DNA 片段 (DNA Fragment)。

### II) Blunting Kination 反应

1. 在微量离心管中配制下列反应液。

试剂名称	使用量
DNA Fragment	约 1 pmol
10 $\times$ Blunting Kination Buffer	2 $\mu$ l
Blunting Kination Enzyme Mix	1 $\mu$ l
灭菌水	up to 20 $\mu$ l

2. 37°C 反应 10 分钟。
3. 70°C 反应 10 分钟。

### III) Ligation 反应

1. 取约 0.25 pmol (5  $\mu$ l) 上记 3. 的溶液于新的微量离心管中。
  2. 加入 5  $\mu$ l 的 Ligation Solution I, 均匀混合。
  3. 16°C 反应 1 小时。
  4. 反应液全量转化至 100  $\mu$ l 的感受态细胞中。
- \*用电穿孔法转化时, 先用乙醇沉淀等方法置换连接液后再进行转化。

## IV) 结果

1. 在 pUC118 载体中插入约 2,000 bp 的 DNA 片段,在 DNA 片段的大约中间部位对 3 个碱基进行突变。
2. 实验结果如下, 使用的 JM109 Competent Cell 的转化效率为  $7.0 \times 10^8 / \mu\text{g}$  pUC118。

Insert DNA 链长 (bp)	白色 Colony 数/ $\mu\text{g}$ DNA
2,000	$9.8 \times 10^4$

### ● 注意事项

1. 当载体与插入的 DNA 片段的总长度小于 5 kb 时, 使用本试剂盒较为合适; 如果载体与插入 DNA 片段长度太长时, 不推荐使用本试剂盒。
2. PCR 反应后的 DNA 片段应进行切胶回收纯化, 然后再进行自身连接反应, 这样可以提高突变成功率。
3. Ligation Solution I 请于冰中融解, 使用前混匀。应避免多次反复冻融。
4. 连接转化效率低时, 请试用下述方法进行改进。
  - ① 确认感受态细胞的转化效率。
  - ② 延长连接反应时间至过夜反应。

#### 注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品, 或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站[www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

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。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>