

# Mut Express<sup>®</sup> MultiS

## Fast Mutagenesis Kit V2



**Vazyme Biotech Co., Ltd**

网站/Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

技术支持/Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

技术服务/Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Vazyme biotech co., ltd.

---

**使用说明书**

Version 4.1

# 目录 Catalog

产品概要

产品组成

贮藏与保质期

不连续多碱基(相距超过50 bp)定点突变实验方案

注意事项

常见问题与解决方案

## 1/产品概要

Mut Express® MultiS Fast Mutagenesis Kit V2是基于ClonExpress®快速克隆技术的定点突变系统。使用本试剂盒，可一次性向目标质粒上三至五个不连续位点同时引入定点突变。该试剂盒由两个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，广泛适用于长度小于20 kb的任何质粒扩增。ClonExpress®快速克隆系统利用高效同源重组反应替代了传统的退火成环反应。因此，使用Mut Express® MultiS 定点突变试剂盒进行DNA定点突变时，引物设计更加灵活，且扩增反应不再以线性方式进行，模板使用量极低，有利于原始甲基化模板的彻底降解。试剂盒中配有专门针对多碱基定点突变而优化的重组酶Exnase® MultiS，且如扩增产物特异，DpnI消化产物可不进行DNA纯化而直接用于重组反应。高度优化的反应缓冲液、快捷的操作流程以及惊人的定点突变效率，使得Mut Express® MultiS Fast Mutagenesis Kit V2成为DNA多点突变首选试剂盒。

### 产品优点

- Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase高保真度提供突变率最低的高保真PCR
- Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase卓越的长片段扩增能力，广泛适用于20 kb以内的任何质粒扩增
- 扩增以指数方式进行，模板使用量极低，有利于原始甲基化模板的彻底降解
- DpnI消除原始模板污染
- ClonExpress®快速克隆系统高效环化PCR产物
- 扩增产物经DpnI消化后可直接用于重组反应
- 可一步实现目标质粒上三至五个不连续位点(相距超过50 bp)的定点突变

### 应用范围

DNA定点突变

注意：如使用本品对质粒进行定点突变，请使用甲基化酶无缺陷的宿主菌(例如Top10、DH5α、JM109)扩增原始质粒！

### 版本升级说明

- 扩增模块由Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase升级为Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase，扩增能力更强、模板兼容性更广且高GC片段扩增成功率显著提高。
- 优化了引物设计方式：由“每对正反向引物5'端包含至少20 bp反向互补区域”修改为“每对正反向引物5'端包含15-21 bp反向互补区域(GC含量40% - 60%为佳)，各引物待突变位点至3'端区域Tm值高于60°C为佳”。

## 2/产品组成

组 分	C215-01 (10 rxn)	C215-02 (25 rxn)
2 × Max Buffer	1.25 ml	3 × 1.25 ml
dNTP Mix (10 mM each)	50 μl	125 μl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	50 μl	125 μl
DpnI (10 U/μl)	50 μl	125 μl
5 × CE MultiS Buffer	40 μl	100 μl
Exnase MultiS	20 μl	50 μl

## 3/贮藏与保质期

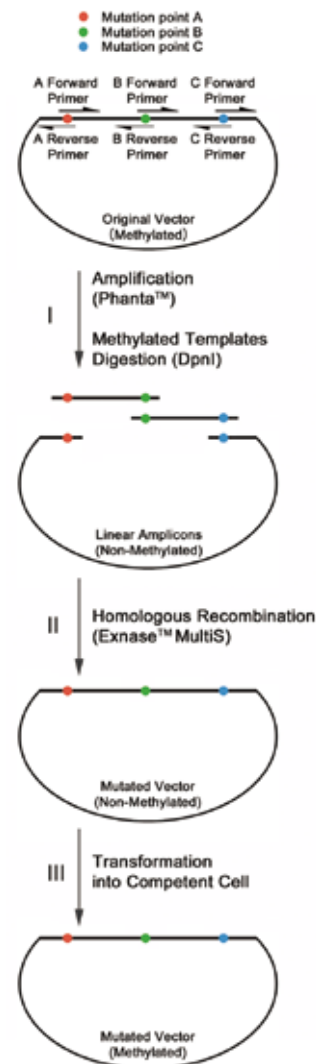
本产品应置于-20℃储存。保质期为一年。

## 4/不连续多碱基(相距超过50 bp)定点突变实验方案

不连续三至五碱基(相距超过50 bp)定点突变实验方案类似，以不连续三碱基定点突变为例，详细实验流程如下：

### 4.1 实验流程概览 (图一)

- 1). 引物设计(参见4.2);
- 2). 目标质粒分段扩增(图一, I, 参见4.3);
- 3). 扩增产物DpnI消化, 去除甲基化模板质粒(图一, I, 参见4.4);
- 4). 进行重组反应(图一, II, 参见4.5);
- 5). 反应产物转化、涂板、克隆鉴定(图一, III, 参见4.6)。

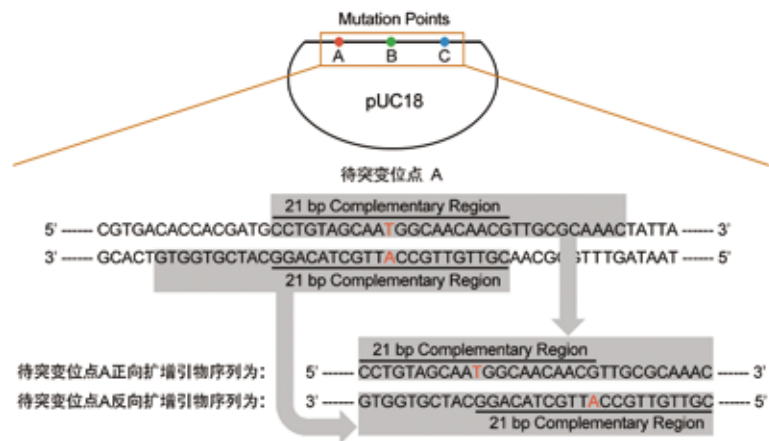


图一：使用Mut Express® MultiS进行不连续三碱基定点突变实验流程

以待突变位点A、B、C为界，将质粒分为AB、BC和CA三段。在每个待突变位点处设计部分反向互补的引物。以原始质粒为模板，分别扩增AB段(A Forward Primer 和B Reverse Primer)、BC段(B Forward Primer 和C Reverse Primer)和CA段(C Forward Primer 和A Reverse Primer) (图一, I)。扩增产物经DpnI消化(图一, I)后，进行重组环化(图一, II)。重组产物直接进行转化即可完成定点突变(图一, III)。

## 4.2 引物设计

向质粒三个不连续位点引入定点突变，只需设计三对引物将质粒分段扩增即可。引物设计基本原则为：**在每个待突变位点处设计部分反向互补的扩增引物对。每对正反向引物5'端包含15-21 bp反向互补区域(GC含量40% - 60%为佳)，各引物待突变位点至3'端区域Tm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引入三碱基突变为例，引物设计具体方案如图二所示。



图二：向质粒引入不连续多碱基定点突变引物设计示意图

注意：待突变位点B、C处的正反向扩增引物设计方式与位点A处的引物设计方式一致。计算引物Tm值时，应计算待突变位点至引物3'端这一区域内的碱基，待突变位点至引物5'端区域内的碱基不应参与计算。

## 4.3 目标质粒分段扩增

以待突变位点A、B、C为界，将质粒分为AB、BC和CA段。

使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 对各段分别进行扩增。AB段扩增引物对为：待突变位点A正向扩增引物和待突变位点B反向扩增引物；BC段扩增引物对为：待突变位点B正向扩增引物和待突变位点C反向扩增引物；CA段扩增引物对为：待突变位点C正向扩增引物和待突变位点A反向扩增引物。

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°C。推荐反应体系如下：

ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 μl
2 × Max Buffer	25 μl
dNTP Mix (10 mM each) <sup>a</sup>	1 μl
模板DNA <sup>b</sup>	Optional
引物1 (10 μM)	2 μl
引物2 (10 μM)	2 μl
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase <sup>c</sup>	1 μl

a. 请勿使用dUTP和带有尿嘧啶的引物或模板。

b. 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。

c. 推荐的酶的终浓度为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。

体系配制完成后进行扩增反应，推荐PCR反应条件：

温度	时间	循环数
95°C	30 sec	1
95°C	15 sec	30 <sup>d</sup>
60°C~72°C	15 sec	
72°C	30-60 sec/kb	
72°C	5 min	1

a. 对于大多数质粒，变性温度使用95°C即可。

b. 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。

c. 长的延伸时间有助于扩增产量提高。

d. 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。

反应结束后取少量扩增产物进行琼脂糖电泳检测。如目标质粒正确扩增，则可进行下一步实验。

## 4.4 扩增产物DpnI消化，去除甲基化模板质粒

因4.3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：

DpnI	1 μl
扩增产物	40~50 μl

将上述反应体系置于37°C恒温反应1~2小时。如4.3扩增特异，产物条带单一，DpnI消化产物无需纯化，可直接用于后续重组反应。如扩增不特异，DpnI消化结束后应胶回收纯化目标扩增产物。

#### 4.5 进行重组反应

质粒AB、BC和CA段扩增产物末端分别包含相对应的完全一致的一段序列，因此在Exnase MultiS催化下三扩增产物末端可以分别发生同源重组，完成环化。于冰水浴中，将下列组分依次加到无菌的1.5 ml Eppendorf管或PCR管的管底。如果不慎将液体粘在管壁，请务必通过短暂离心使其沉入管底。

ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu$ l
5 $\times$ CE MultiS Buffer	4 $\mu$ l
AB段DpnI消化产物	x ng
BC段DpnI消化产物	x ng
CA段DpnI消化产物	x ng
Exnase MultiS	2 $\mu$ l

Exnase MultiS 多点突变重组反应体系最适DNA使用量为每片段0.03 pmol，对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

$$\text{DpnI消化产物用量} = [0.02 \times \text{片段碱基数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$$

例如，AB段长度为1 kb，BC段长度为2 kb，CA段长度为5 kb。则DpnI消化产物最适使用量为：AB段 $0.02 \times 1000 = 20$  ng；BC段 $0.02 \times 2000 = 40$  ng；CA段 $0.02 \times 5000 = 100$  ng。

**注意：**DNA量太多或者太少都将降低环化效率。因此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消化产物最适使用量计算值不足10 ng或超过200 ng时，加入10 ng或200 ng即可。DpnI消化产物不纯化直接用于重组反应时，使用总量不应超过反应总体积的1/5，即4  $\mu$ l。

体系配制完成后，用移液器上下轻轻吹打几次混匀各组分，避免产生气泡(请勿剧烈震荡或者涡旋混匀)。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。

#### 4.6 反应产物转化、涂板、克隆鉴定

取20  $\mu$ l冷却反应液，加入到200  $\mu$ l感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置30 min。42°C热激45~90秒，冰水浴孵育2 min。加入900  $\mu$ l SOC或LB培养基，37°C孵育10 min充分复苏。37°C摇菌45 min。取100  $\mu$ l菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。将平板倒置，于37°C过夜培养。

**注意：**我们推荐您使用转化效率 $>10^8$  cfu/ $\mu$ g的感受态细胞。如果感受态转化效率 $<10^8$  cfu/ $\mu$ g (例如用CaCl<sub>2</sub>法新鲜制备的感受态转化效率通常在 $10^6$ - $10^7$  cfu/ $\mu$ g之间)，请将培养菌液在5000 rpm离心3 min收集菌体，用100  $\mu$ l LB培养基重悬后全部涂板。

## 5/注意事项

下表列出了使用Mut Express® MultiS 进行DNA定点突变时主要注意事项(表一)：

实验步骤	推荐这样做	不应该这样做
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	按照图二所示进行设计	引物反向互补区域少于推荐长度或者添加错误
实验方案选择	当两突变位点相距小于50bp时，应将其视为一个突变位点，将两突变引入同一条/对引物进行实验	不考虑两突变位点之间的距离
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 $\alpha$ 、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 $\mu$ 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 $\mu$ 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°C反应30 min	反应温度偏离37°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 hr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°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°C长时间储存后进行转化

表一：使用Mut Express® MultiS 进行DNA定点突变时主要注意事项

## 6/常见问题与解决方案

### 1 质粒各段无法正常扩增

- 引物设计有误：核对引物设计方案。
- 扩增体系配制错误：重复实验。
- 扩增反应条件不优化：调整Mg<sup>2+</sup>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。

## 2 平板上长不出克隆或克隆数目很少

a).感受态效率低：使用新制备或妥善冻存的感受态细胞，确保转化效率 $>10^7$ cfu/ $\mu$ g。每次可设置一组转化质粒的对照实验，以检测感受态细胞的转化效率。

b).重组反应体系中DNA量不足，或者比例不佳：尽量按照推荐DNA的量配制反应体系。请务必预先检测DpnI消化产物的浓度。常用的吸光度测量法极易受DNA纯度、DNA稀释液pH等因素影响，测定值和DNA实际浓度往往偏差非常大。因此，我们强烈推荐您通过琼脂糖电泳来测定样品中的DNA浓度。

c).重组环化反应体系中DNA不纯，抑制反应：未纯化DpnI消化产物加入重组反应体系内的总体积不应超过4  $\mu$ l(反应体系体积1/5)。尝试对DpnI消化产物进行胶回收纯化。重组反应体系中应尽量避免金属络合剂(如EDTA)的带入。因此，我们推荐您将DNA纯化产物溶解在pH8.0的ddH<sub>2</sub>O中保存(常规胶回收试剂盒中的洗脱液可用pH8.0的ddH<sub>2</sub>O替代)，请勿使用TE进行DNA保存。

d).感受态细胞中加入了过多的反应产物：反应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。

e).出现转化抑制效应：当转化的DNA浓度太高时，会抑制转化反应。将重组反应产物稀释5倍后取1/5进行转化。

## 3 定点突变未正确完成

a).引物设计错误：核对引物设计方案。

b).扩增反应所用模板为非甲基化的质粒：DpnI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。

c).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DpnI消化不完全，降低突变成功率。

## 4 非目标位点突变

a).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。

b).扩增循环数过多：为了防止扩增过程中引入非目标突变，扩增循环数不宜超过 35。如果扩增效率良好的话，推荐扩增循环数应不超过30。

## 5 特别提醒！

在选择引物反向互补区时，应避免选择有重复序列的区域。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。如这部分区域GC含量高于70%或者低于30%，重组环化效率会受到较大影响。