

Code No. R407

研究用

---

**TaKaRa**

Multipoints Mutagenesis Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 本 Kit 以外必备试剂和仪器	2
● 引物设计说明	2
● 试剂盒原理	3
● 使用 Control Plasmid 时的实验例	3
● 多位点定点突变实验操作方法	8
● 实验例	11
● Q&A	11
● 参考文献	11

## ● 制品说明

本试剂盒是利用一对设计特殊的锚定引物 (Anchor Primer) 及几条定点突变引物对DNA多个不同位点同时进行定点突变的试剂盒。锚定引物“尾巴”上的特异性序列是与大多数基因都不相匹配的, 因此保证了PCR扩增的特异性。本试剂盒的主要原理是: 设计合成同一方向的锚定引物及定点突变引物, 将锚定引物及定点突变引物用T4 Polynucleotide Kinase磷酸化后与模板质粒DNA进行退火, 再使用T4 DNA Polymerase和T4 DNA Ligase进行延伸和连接形成突变单链, 然后使用锚定引物“尾巴”上的特异性引物 (ETail F/ETail R) 和高保真DNA聚合酶PrimeSTAR对突变单链进行PCR扩增, 再将获得的双链PCR产物克隆回原载体中, 即可达到实验目的, 获得目的突变体。

本试剂盒操作快速简单, 只需一天时间便可以完成整个突变操作。本试剂盒尤其适用于插入片段长度在1.0 kb以下的高位点基因突变实验, 对于1.0 kb以上的DNA片段的高位点基因突变, 由于引物退火的不完全、PCR扩增中可能引入新的突变点等原因, 可能降低实验成功率。本公司曾经使用本试剂盒, 成功进行了1.5 kb DNA片段的高位点基因突变实验。

本试剂盒中的Anchor F1和Anchor R1引物可供克隆于pUC系列载体或pBluescript系列载体中的DNA片段的高位点基因突变实验, 使用方便。使用试剂盒中的Control Plasmid及各种Control实验用引物可进行Control实验。

## ● 制品内容 (20次量)

T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ $\mu$ l)	40 $\mu$ l
10 $\times$ Reaction Buffer*1	40 $\mu$ l
ATP (10 mM)	48 $\mu$ l
10 $\times$ Annealing Buffer	40 $\mu$ l
10 $\times$ Extension Buffer	60 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (60 U/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
T4 DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
5 $\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	200 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	80 $\mu$ l
Control Plasmid (50 fmol/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
Control Primer Mix (12.5 pmol/ $\mu$ l each)	20 $\mu$ l
Control Anchor F (8 pmol/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Anchor F1 (8 pmol/ $\mu$ l) *2	20 $\mu$ l
Anchor R1 (8 pmol/ $\mu$ l) *2	25 $\mu$ l
ETail F (10 pmol/ $\mu$ l)	25 $\mu$ l
ETail R (10 pmol/ $\mu$ l)	25 $\mu$ l
Ligation Solution I	100 $\mu$ l

\*1 10 $\times$ Reaction Buffer 于-20 $^{\circ}$ C保存时会有白色浑浊出现, 溶解后不影响反应。

\*2 Anchor F1 与 Anchor R1 是基于 pUC 系列载体、pBluescript 系列载体设计的锚定引物。Anchor F1 的 3' 端和 Anchor R1 的 5' 端与上述系列载体的多克隆位点两侧序列完全一致; Anchor F1 的 5' 端与 ETail F 序列完全相同, Anchor R1 的 3' 端与 ETail R 序列完全互补。当要突变的 DNA 片段克隆于上述系列载体中时, 锚定引物可以直接使用 Anchor F1 和 Anchor R1。

## ● 保存: -20 $^{\circ}$ C

## ● 本 Kit 以外必备试剂和仪器

- PCR 扩增仪。
- 水浴锅。
- 小型离心机。
- 各种移液枪。
- 各种型号的 Microtube、Tip 等。
- TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762)。
- TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 (Code No. 9761)。
- *Nde* I、*Hind* III (用于 Control 实验)。
- JM109 Competent Cell。
- 灭菌水。

## ● 引物设计说明

1. Kit 中的 Anchor F1 与 Anchor R1 是基于 pUC 系列载体、pBluescript 系列载体设计的锚定引物。当要突变的 DNA 片段克隆于上述系列载体中时，锚定引物可以直接使用 Anchor F1 和 Anchor R1。
2. 当要突变的 DNA 片段克隆于其他载体中时，则需要设计锚定引物。上游锚定引物 Anchor F 的 3' 端和下游锚定引物 Anchor R 的 5' 端应与载体序列完全一致；Anchor F 的 5' 端应与 ETail F 序列完全相同（见下述【各种引物序列】表中 Anchor F1 的阴影部分），Anchor R 的 3' 端应与 ETail R 序列完全互补（见下述【各种引物序列】表中 Anchor R1 的阴影部分）。这样在实施 PCR 扩增时可以直接使用 Kit 中提供的 ETail F 和 ETail R 引物进行 PCR 扩增。
3. 所有锚定引物及定点突变用引物必须为同一方向，在进行 Annealing、Extension、Ligation 时必须形成一条同一方向的突变单链作为靶序列，可以用于 PCR 扩增（原理见图 1）。
4. 引物长度应在 25–50 nt 之间， $T_m \geq 75^\circ\text{C}$ ，引物长度最好不要超过 50 nt，否则可能形成二级结构而影响定点突变效率。定点突变引物间最好有较为相近的  $T_m$  值， $T_m$  值的计算公式如下：  

$$T_m = 81.5 + 41 \times \text{GC 数量} / N - 675 / N - \text{突变碱基数} / N \times 100$$
 其中 N 代表引物的长度。
5. 突变点最好设计在引物的中间，保证突变点两侧至少有 10–15 个碱基能与模板完全互补，引物的 3' 端应以 G 或 C 结尾。
6. 引物之间可以相邻或者有一定的间距（目前尚未发现引物间的距离对多位点定点突变效率有影响）。
7. 为了保证引物质量，引物应进行 PAGE 纯化。

### 【试剂盒中的各种引物序列】

引物名称	引物序列 (5' → 3')	长度 (nt)
Anchor F1	ACAGCAAAAAGCCCGAGCGACCTTCCGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	48
Anchor R1	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCCGGCTAAGGCACGCGCCACTTTTT	47
Control	ACAGCAAAAAGCCCGAGCGACCTTCGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGAC	47
Control Primer Mix	CATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCG	31
	CGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCG	30
	TGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	31
	GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAG	32
ETail F	ACAGCAAAAAGCCCGAGCGACCTTC	24
ETail R	AAAAGTGGCGCGTGCCTTAGCCG	23

## ● 试剂盒原理

试剂盒原理见图 1，简单操作步骤如下：

1. 设计锚定引物 (Anchor F、Anchor R) 以及定点突变用引物 (mt1、mt2……)。
2. 将 Anchor F 与 Anchor R 的混合物以及定点突变用引物 (mt1、mt2……) 混合物分别进行 5' 末端磷酸化。
3. 将 5' 末端磷酸化引物与原始质粒模板进行退火、延伸、连接反应，形成新的突变单链。
4. 用 ETail F 与 ETail R 对突变单链进行 PCR 扩增，获得突变双链 DNA 片段。
5. 突变双链 DNA 片段经酶切、凝胶回收后克隆于目的载体中。
6. 筛选阳性克隆，进行 DNA 测序，获得突变体。

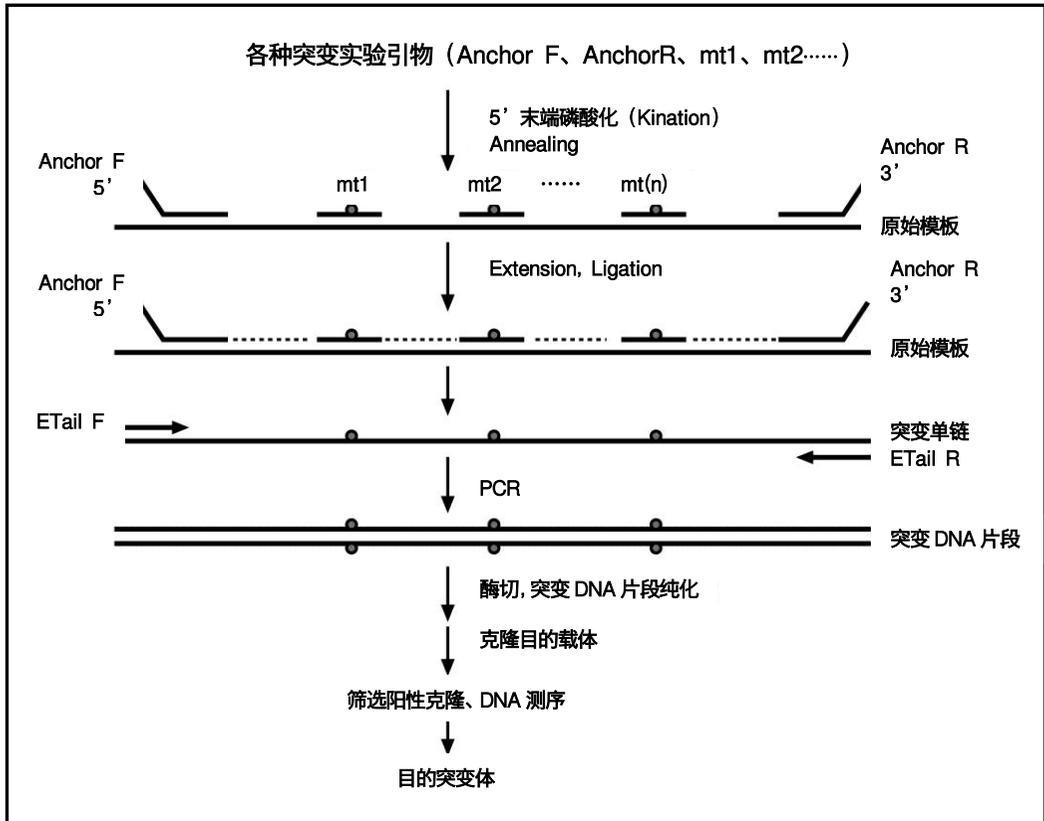


图 1. 本试剂盒原理图

## ● 使用 Control Plasmid 时的实验例

Control Plasmid 说明：在构建 Control Plasmid 时，在 pUC19 载体的 *LacZ* 基因上引入了四个终止密码子 TAA，使得 *LacZ* 基因不能正常表达，在 Amp<sup>+</sup>、IPTG、X-Gal 平板培养基上形成菌落时，四个终止密码子中只要有一个存在，得到的培养菌落将为白色菌落（不能形成蓝色菌落）。

本试剂盒中提供了四条 Control 用定点突变引物 (Control Primer Mix)，可以将 *LacZ* 基因中的四个终止密码子 TAA 同时突变为正常密码子（原理见图 2）。由于四个终止密码子突变后的质粒可以正常对 *LacZ* 基因进行表达，其质粒转化后在含有 Amp<sup>+</sup>、IPTG、X-Gal 平板培养基上将形成蓝色菌落。

本实验通过对 Control Plasmid 的巧妙设计，可以对突变后的质粒经转化后在含有 Amp<sup>+</sup>、IPTG、X-Gal 平板培养基上是否形成蓝色菌落，来判断四个位点同时进行突变的效率。

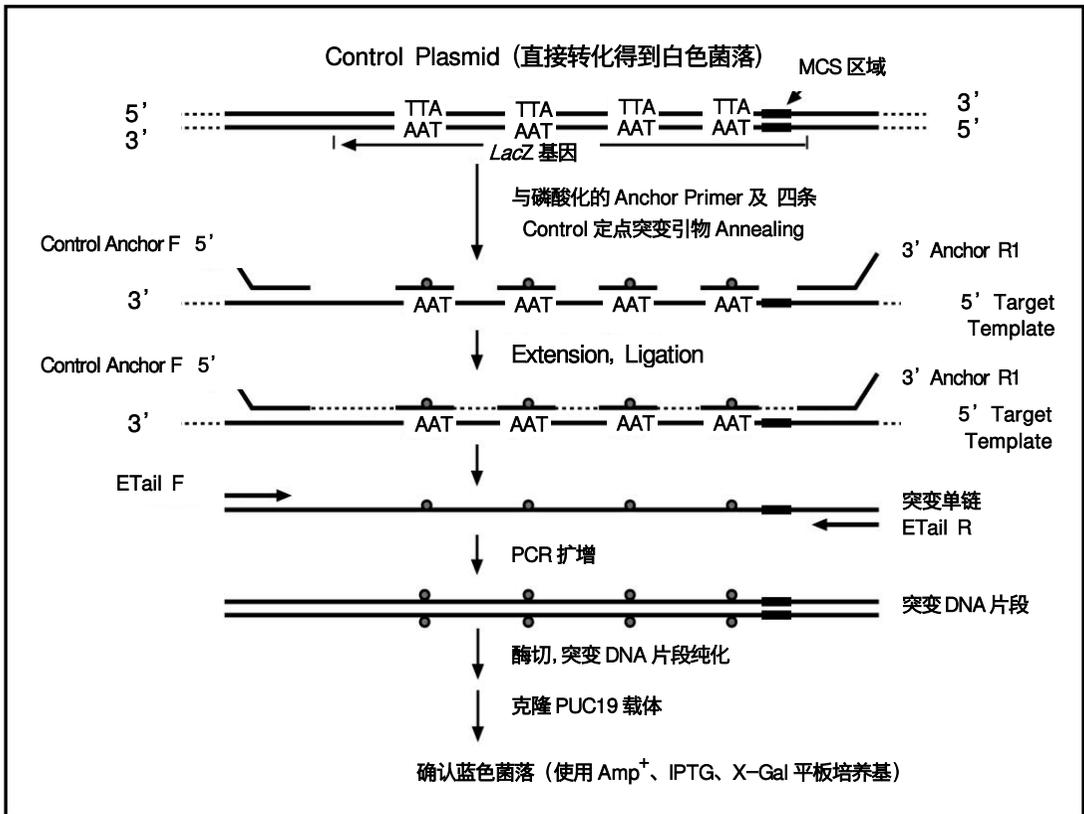


图 2. Control 实验原理图

1. 锚定引物和定点突变引物的磷酸化反应。

① 在两个 PCR 反应管中分别配制下列两种引物的磷酸化反应液。

【锚定引物的磷酸化】

试剂	使用量
Control Anchor F (8 pmol/μl) *	1 μl
Anchor R1 (8 pmol/μl)	1 μl
ATP (10 mM)	2.4 μl
10×Reaction Buffer	2 μl
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	2 μl
灭菌水	11.6 μl
Total	20 μl

\* 由于在本实验中设计的突变点有的在 Anchor F1 引物结合位点的外侧，所以上游锚定引物使用了 Anchor F1 引物结合位点外侧的 Control Anchor F 引物。

【定点突变用引物的磷酸化】

试剂	使用量
Control Primer Mix (12.5 pmol/ $\mu$ l each)	4 $\mu$ l
ATP (10 mM)	2.4 $\mu$ l
10 $\times$ Reaction Buffer	2 $\mu$ l
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
灭菌水	9.6 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

- ② 37°C反应 30 分钟。  
 ③ 70°C加热 10 分钟。

2. 退火反应。

- ① 在 PCR 反应管中配制下列反应液。

试剂	使用量
Control Plasmid (50 fmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
步骤 1 的 Control Anchor F/Anchor R1 磷酸化反应液 (0.4 pmol/ $\mu$ l each)	1 $\mu$ l
步骤 1 的 Control Primer Mix 磷酸化反应液 (2.5 pmol/ $\mu$ l each)	4 $\mu$ l
10 $\times$ Annealing Buffer	2 $\mu$ l
灭菌水	12 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

- ② 99°C加热 3 分钟后，经 30 分钟缓慢降温至 45°C。在 45°C保温 10 秒钟后，再降温至 4°C。本操作请在 PCR 仪上进行。  
 注) 退火产物不稳定，请立刻进行下步实验。

3. 延伸、连接反应。

- ① 将下列组份混合后加入到步骤 2 的退火反应液中。

试剂	使用量
10 $\times$ Extension Buffer	3 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (60 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T4 DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
灭菌水	5 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

- ② 25°C反应 1 小时。  
 注) 延伸、连接产物不稳定，请立刻进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增反应。

① 按下列组份配制 PCR 反应液，总体积为 50  $\mu$ l。

试剂	使用量
步骤 3 的延伸、连接反应液	1 $\mu$ l
5 $\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 $\mu$ l
ETail F (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
ETail R (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
灭菌水	32.5 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

② PCR 反应条件如下:

98°C	10 sec	} 30 Cycles
60°C	10 sec	
72°C	30 sec	

③ 取 5  $\mu$ l PCR 反应液进行 1%的琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增片段长度为 478 bp。

5. PCR 产物的凝胶回收。

PCR 反应液 (45  $\mu$ l) 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收，最后使用 20  $\mu$ l 灭菌水洗脱 DNA。此 DNA 即为突变 DNA 片段。

6. 酶切反应及 DNA 片段的纯化。

① 按下列组份配制酶切反应液。

试剂	使用量
步骤 5 的凝胶回收突变 DNA 片段	12 $\mu$ l
<i>Nde</i> I (10 U/ $\mu$ l) *	1 $\mu$ l
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu$ l) *	1 $\mu$ l
10 $\times$ K Buffer	5 $\mu$ l
灭菌水	31 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

\* 突变点在 pUC19 的 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点之间。

② 37°C反应 2 小时。

③ 使用 TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 (Code No. 9761) 对酶切 DNA 片段进行纯化，最后使用 20  $\mu$ l 灭菌水洗脱 DNA。

7. 克隆载体的制备。

① 按下列组成配制酶切反应液，总体积为 50  $\mu\text{l}$ 。

试剂	使用量
Control Plasmid (50 fmol/ $\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$
<i>Nde</i> I (10 U/ $\mu\text{l}$ ) *	1 $\mu\text{l}$
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu\text{l}$ ) *	1 $\mu\text{l}$
10 $\times$ K Buffer	5 $\mu\text{l}$
灭菌水	33 $\mu\text{l}$
Total	50 $\mu\text{l}$

\* 突变点在 pUC19 的 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点之间。

② 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜反应。

③ 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收酶切载体，最后使用 10  $\mu\text{l}$  灭菌水洗脱载体 DNA。

8. 载体与酶切突变 DNA 片段的连接。

① 按下列组份配制连接反应液。

试剂	使用量
步骤 7 的酶切载体* <sup>1</sup>	1 $\mu\text{l}$
步骤 6 的酶切突变 DNA 片段* <sup>1</sup>	4 $\mu\text{l}$
Ligation Solution I* <sup>2</sup>	5 $\mu\text{l}$
Total	50 $\mu\text{l}$

\*<sup>1</sup> 酶切载体 1  $\mu\text{l}$  (50 ng) 约为 0.03 pmol，酶切突变 DNA 片段 4  $\mu\text{l}$  (32 ng) 约为 0.18 pmol，载体与片段的摩尔比约为 1:6。

\*<sup>2</sup> Ligation Solution I 的量应占反应体系的 1/2。

② 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。

9. DNA 转化。

① 将上述连接液 10  $\mu\text{l}$  加入至 100  $\mu\text{l}$  JM109 Competent Cell 中，在 1.5 ml Microtube 中迅速轻轻混匀后，在冰上放置 30 分钟。

② 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 45~50 秒钟后立刻移至冰上放置 2 分钟。

③ 将上述②的细菌溶液移至 15 ml Falcon Tube 中。

④ 向 Falcon Tube 中加入 900  $\mu\text{l}$  的 SOC 培养基后，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡 (约 200 rpm) 培养 1 小时。

⑤ 取 100  $\mu\text{l}$  菌液涂布在含有 Amp<sup>+</sup> (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、IPTG (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、X-Gal (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的平板培养基上，37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

10. 实验结果。

质粒种类	蓝菌数 (个)	白菌数 (个)	蓝菌比例 (%) *2
Control Plasmid (100 pg) *1	0	400	0
定点突变后的 Plasmid	815	140	85.3

\*1 Control Plasmid (100 pg) 转化后同样取 100  $\mu$ l 的菌液涂布平板培养基。

\*2 蓝菌比例是指蓝菌占总菌数的百分比。

● 多位点定点突变实验操作方法

1. 锚定引物和定点突变引物的磷酸化反应。

① 在两个 PCR 反应管中分别配制下列两种引物的磷酸化反应液。

【锚定引物的磷酸化】

试剂	使用量
Anchor F (8 pmol/ $\mu$ l) *	1 $\mu$ l
Anchor R (8 pmol/ $\mu$ l) *	1 $\mu$ l
ATP (10 mM)	2.4 $\mu$ l
10 $\times$ Reaction Buffer	2 $\mu$ l
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
灭菌水	11.6 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

\* 如果需要突变的 DNA 片段克隆于 pUC 系列载体或 pBluescript 系列载体中时，锚定引物可以直接使用 Kit 中提供的 Anchor F1 和 Anchor R1。

如果需要突变的 DNA 片段克隆于其他载体中时，则需要设计锚定引物。锚定引物的设计可根据“引物设计原则”进行。

【定点突变引物的磷酸化】

试剂	使用量
配制定点突变引物的混合物 (12.5 pmol/ $\mu$ l each)	4 $\mu$ l
ATP (10 mM)	2.4 $\mu$ l
10 $\times$ Reaction Buffer	2 $\mu$ l
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
灭菌水	9.6 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

② 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。

③ 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟。

2. 退火反应。

① 在 PCR 反应管中配制下列反应液。

试剂	使用量
ds DNA 模板* (50 fmol/ μl)	50 fmol
步骤 1 的 Anchor F/Anchor R 磷酸化反应液 (0.4 pmol/ μl each)	1 μl
步骤 1 的定点突变引物磷酸化反应液 (2.5 pmol/ μl each)	4 μl
10× Annealing Buffer	2 μl
灭菌水	up to 20 μl

\* 模板量计算公式:

$$\text{fmol} = \frac{\text{质粒的 ng 数}}{330 \times 2 \times \text{质粒全长的碱基数 (片段 + 载体)}} \times 10^6$$

② 99°C加热 3 分钟后, 经 30 分钟缓慢降温至 45°C。在 45°C保温 10 秒钟后, 再降温至 4°C。本操作请在 PCR 仪上进行。

注) 退火产物不稳定, 请立刻进行下步实验。

3. 延伸、连接反应。

① 将下列组份混合后加入到步骤 2 的退火反应液中。

试剂	使用量
10× Extension Buffer	3 μl
T4 DNA Ligase (60 U/ μl)	1 μl
T4 DNA Polymerase (1 U/ μl)	1 μl
灭菌水	5 μl
Total	10 μl

② 25°C反应 1 小时。

注) 延伸、连接产物不稳定, 请立刻进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增反应。

① 按下列组份配制 PCR 反应液, 总体积为 50 μl。

试剂	使用量
步骤 3 的延伸、连接反应液	1 μl
5×PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
ETail F (10 pmol/ μl)	1 μl
ETail R (10 pmol/ μl)	1 μl
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μl)	0.5 μl
灭菌水	32.5 μl
Total	50 μl

② PCR 反应条件如下:

98°C	10 sec	} 30 Cycles
60°C	10 sec	
72°C	1 min/kb	

③ 取 5  $\mu$ l PCR 反应液进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 确认 PCR 扩增片段长度。

5. PCR 产物的凝胶回收。

PCR 反应液 (45  $\mu$ l) 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收, 最后使用 20  $\mu$ l 灭菌水洗脱 DNA。此 DNA 即为突变 DNA 片段。

6. 突变 DNA 片段的酶切反应及 DNA 片段的纯化。

① 使用适当的限制酶酶切突变 DNA 片段。

② 使用 TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 (Code No. 9761) 对酶切 DNA 片段进行纯化, 最后使用 20  $\mu$ l 灭菌水洗脱 DNA。

7. 克隆载体的制备。

① 使用适当的限制酶酶切载体 DNA。

② 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收酶切载体, 最后使用 10  $\mu$ l 灭菌水洗脱载体 DNA。

8. 载体与酶切突变 DNA 片段的连接。

① 按下列组份配制连接反应液。

试剂	使用量
步骤 7 的酶切载体*1	1 $\mu$ l
步骤 6 的酶切突变 DNA 片段*1	4 $\mu$ l
Ligation Solution I*2	5 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

\*1 酶切载体与酶切突变 DNA 片段的摩尔比约为 1 : 5~10。

\*2 Ligation Solution I 的量应占反应体系的 1/2。

② 16°C 反应 1 小时。

9. DNA 转化。

① 将上述连接液 10  $\mu$ l 加入至 100  $\mu$ l JM109 Competent Cell 中, 在 1.5 ml Microtube 中迅速轻轻混匀后, 在冰上放置 30 分钟。

② 42°C 水浴中保温 45~50 秒钟后立刻移至冰上放置 2 分钟。

③ 将上述②的细菌溶液移至 15 ml Falcon Tube 中。

④ 向 Falcon Tube 中加入 900  $\mu$ l 的 SOC 培养基后, 在 37°C 下振荡 (约 200 rpm) 培养 1 小时。

⑤ 取 100  $\mu$ l 菌液涂布在含有 Amp<sup>r</sup> (100  $\mu$ g/ml)、IPTG (30  $\mu$ g/ml)、X-Gal (40  $\mu$ g/ml) 的平板培养基上, 37°C 过夜培养。

10. 筛选阳性克隆。

① 挑选菌落, 提取质粒 DNA。

② 进行 DNA 测序, 选取目的突变体。

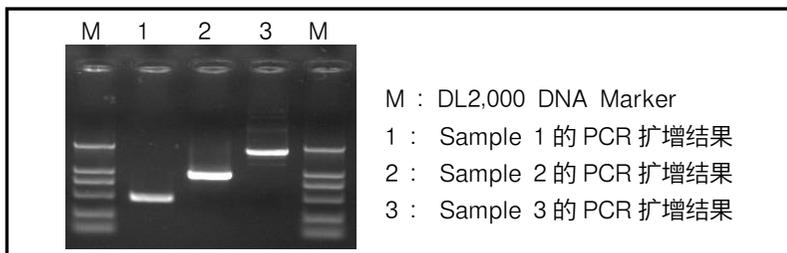
## ● 实验例

使用本试剂盒，进行了三个多位点定点突变实验。详细实验情况如下：

Sample 1 是 Control 实验，进行了 4 点突变（4 条突变引物）；

Sample 2 是对 pUC18 载体上约 800 bp 的 DNA 片段进行了 6 点突变（6 条突变引物）；

Sample 3 是对 pMD18-T Simple 载体上约 1.5 kb 的 DNA 片段进行了 10 点突变（10 条突变引物）。以上三个多位点定点突变实验例的 PCR 反应结果见下图。



## ● Q&A

Q1 PCR 扩增得不到特异性条带的原因可能是什么？

- A1
- ① 锚定引物与突变引物的方向不正确，不能退火成同一方向的突变单链，请重新设计合成引物。
  - ② 锚定引物与突变引物的磷酸化反应不充分，未能形成突变单链，请重新将引物磷酸化。
  - ③ 模板量不足，请适当增加模板量或优化 PCR 反应条件。

Q2 PCR 扩增有杂带（无法准确判断主带位置），如何解决？

- A2
- ① 适当优化 PCR 反应条件：可适当提高反应的退火温度，以 2°C 为单位渐进，或者使用两步法进行 PCR 扩增，即 98°C 10 秒，68°C 1 分钟/kb，运行 30 Cycles。
  - ② 适当降低 PCR 反应的延伸时间，以 15 秒或 30 秒为单位递减。
  - ③ 适当减少模板的使用量。

## ● 参考文献

1. Seyfang A, Jin JH. Multiple site-directed mutagenesis of more than 10 sites simultaneously and in a single round. *Anal Biochem.* 2004; **324**(2): 285–91.
2. Lei Young and Qihan Dong. TAMS technology for simple and efficient *in vitro* site-directed mutagenesis and mutant screening. *Nucleic Acids Res.* 2003 February 1; **31**(3): e11.
3. Kunkel, T. A. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(2): 488–92.
4. Smith, M. (1985) *In vitro* mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* **19**, 423.

### 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: <http://www.takara.com.cn>

v201612Da