

# 基因定点突变

## 一、定点突变的目

把目的基因上面的一个碱基换成另外一个碱基。

## 二、定点突变的原理

通过设计引物, 并利用 PCR 将模板扩增出来, 然后去掉模板, 剩下的就是我们的 PCR 产物, 在 PCR 产物上就已经把这个点变过来了, 然后再转化, 筛选阳性克隆, 再测序确定就行了。

## 三、引物设计原则

引物设计的一般原则不再重复。

突变引物设计的特殊原则:

(1) 通常引物长度为 25~45 bp, 我们建议引物长度为 30~35 bp。一般都是以要突变的碱基为中心, 加上两边的一段序列, 两边长度至少为 11-12 bp。若两边引物太短了, 很可能造成突变实验失败, 因为引物至少要 11-12 个 bp 才能与模板搭上, 而这种突变 PCR 要求两边都能与引物搭上, 所以两边最好各设至少 12 个 bp, 并且合成多一条反向互补的引物。

(2) 如果设定的引物长度为 30 bp, 接下来需要计算引物的  $T_m$  值, 看是否达到  $78^{\circ}\text{C}$  (GC 含量应大于 40%) 。

(3) 如果  $T_m$  值低于  $78^{\circ}\text{C}$ , 则适当改变引物的长度以使其  $T_m$  值达到  $78^{\circ}\text{C}$  (GC 含量应大于 40%) 。

(4) 设计上下游引物时确保突变点在引物的中央位置。

(5) 最好使用经过纯化的引物。

$T_m$  值计算公式:  $T_m = 0.41 \times (\% \text{ of GC}) - 675/L + 81.5$

注：L：引物碱基数；% of GC：引物 GC 含量。

#### 四、引物设计实例

以 GCG→ACG 为例：

5' -CCTCCTTCAGTATGTAGGCGACTTACTTATTGCGG-3'

(1) 首先设计 30 bp 长的上下游引物，并将 A (T)设计在引物的中央位置。

Primer #1: 5' -CCTTCAGTATGTAGACGACTTACTTATTGC-3'

Primer #2: 5' -GCAATAAGTAAGTCGTCTACATACTGAAGG-3'

(2) 引物 GC 含量为 40%，L 为 30，将这两个数值带入 Tm 值计算公式，得到其 Tm=75.5 (Tm=0.41×40-675/30+81.5)。通过计算可以看出其 Tm 低于 78℃，这样的引物是不合适的，所以必须调整引物长度。

(3) 重新调整引物长度。

Primer #1: 5' -CC7CCTTCAGTATGTAGACGACTTACTTATTGCGG-3'

Primer #2: 5' -CCGCAATAAGTAAGTCGTCTACATACTGAAGGAGG-3'

在引物两端加 5mer (斜体下划线处)，这样引物的 GC 含量为 45.7%，L 值为 35，将这两个数值带入 Tm 值计算公式，得到其 Tm 为 80.952 (Tm=0.41×47.5-675/35+81.5)，这样的引物就可以用于突变实验了。

#### 五、突变所用聚合酶及 Buffer

引物和质粒都准备好后，当然就是做 PCR 喽，不过对于 PCR 的酶和 buffer，不能用平时的，我们做 PCR 把整个质粒扩出来，延伸长度达到几个 K，所以要用那些 GC buffer 或扩增长片段的 buffer，另外，要用保真性能较好的 PFU 酶来扩增，防止引进新的突变。

除了使用基因定点突变试剂盒，如 Stratagene 和塞百盛的试剂盒，但价格昂贵。可以使用高保真的聚合酶，如博大泰克的金牌快速 taq 酶、Takara 的 PrimeSTAR™ HS DNA polymerase。

## **六、如何去掉 PCR 产物**

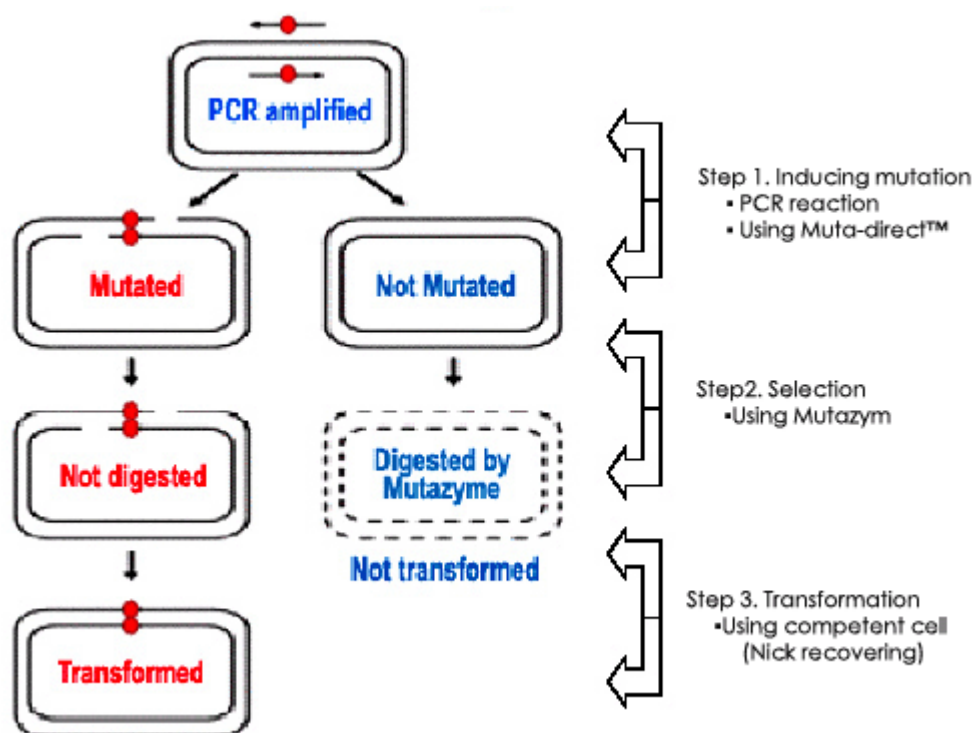
最简单的方法就是用 DpnI 酶，DpnI 能够识别甲基化位点并将其酶切，我们用的模板一般都是双链超螺旋质粒，从大肠杆菌里提出来的质粒一般都被甲基化保护起来（除非你用的是甲基化缺陷型的菌株），而 PCR 产物都是没有甲基化的，所以 DpnI 酶能够特异性地切割模板（质粒）而不会影响 PCR 产物，从而去掉模板留下 PCR 产物，所以提质粒时那些菌株一定不能是甲基化缺陷株。

DpnI 处理的时间最好长一点，最少一个小时吧，最好能有两三个小时，因为如果模板处理得不干净，哪怕只有那么一点点，模板直接在平板上长出来，就会导致实验失败。

## **七、如何拿到质粒**

直接把通过 DpnI 处理的 PCR 产物拿去做转化就行了，然后再筛选出阳性克隆，并提质粒，拿去测序，验证突变结果。

## **八、图示**



## 九、定点突变操作步骤

**[A] 诱导突变基因（PCR 反应）** 以待突变的质粒为模板，用设计的引物及 Muta-direct™ 酶进行 PCR 扩增反应，诱导目的基因突变。

1. 设计点突变引物。

[注]参考引物设计指导

2. 准备模板质粒 DN A

[注]用 *dam*<sup>+</sup>型菌株（例如 DH5α 菌株）作为宿主菌。在 *end*<sup>+</sup>型菌株中常有克隆数低的现象，但是对突变效率没有影响。提取质粒 DNA 时我们建议您使用本公司的质粒提纯试剂盒。

3. [选项]对照反应体系（50μl 反应体系）

10×Reaction Buffer	5μl
pUC18 control plasmid (10ng/μl, total 20ng)	2μl

Control primer mix (20pmol/μl)	2μl
dNTP mixture (each 2.5mM)	2μl
dH <sub>2</sub> O	38μl
<b>Muta-direct™ Enzyme</b>	<b>1μl</b>

#### 4. 样品反应体系 (50μl 反应体系)

10×Reaction Buffer	5μl
<b>Sample plasmid (10ng/μl, total 20ng)</b>	<b>2μl</b>
Sample primer (F) (10pmol/μl)	1μl
Sample primer (R) (10pmol/μl)	1μl
dNTP mixture (each 2.5mM)	2μl
dH <sub>2</sub> O	38μl
<b>Muta-direct™ Enzyme</b>	<b>1μl</b>

#### 5. PCR 反应条件

[注]按如下参数设置 PCR 扩增条件。

Cycles	Temperature	Reaction Time
1cycle	95℃	30sec

15cycle	95°C	30sec
	55°C	1min
	72°C	1min per plasmid Kb

6. PCR 扩增反应完成后冰育 5 分钟，然后置于室温（避免反复冻融）。

[注] 按下列提供的 PCR 条件进行扩增，控制 PCR 循环数。注意当突变点位点超过 4 个时会发生突变率降低的现象。

Mutation	Cycles
1~2Nucleotide	15cycles
3Nucleotides	18cycles

#### [B] 突变质粒选择

PCR 反应结束后使用 Mutazyme™酶消化甲基化质粒从而选择突变质粒 DNA。

1. 准备 PCR 反应产物
2. 加入 1μl (10U/μl) Mutazyme™酶 37°C温育 1 小时。

[注]当质粒 DNA 用量过多时 Mutazyme™酶可能发生与样品反应不完全的现象。因此我们建议为了保证突变率请严格遵照实验步骤进行操作。如果突变率低，可以适当延长反应时间或增加 Mutazyme™酶用量。

#### [C]转化

反应完毕后在质粒 DNA 上会产生缺口，当把这个质粒 DNA 转入 *E.coli* 中时请选择 *dam*<sup>+</sup> 型菌株，例如 DH5α。

1. 将 10μl 样品加到 50μl 感受态细胞里，然后放置在冰上 30 分钟。
2. 接下来可以参照一般的转化步骤进行。

## 序列分析

通常当 LB 平板上出白色菌落则表明发生了突变。

为了证实这一结果，我们建议对白色单菌落进行测序分析。