

Version 1

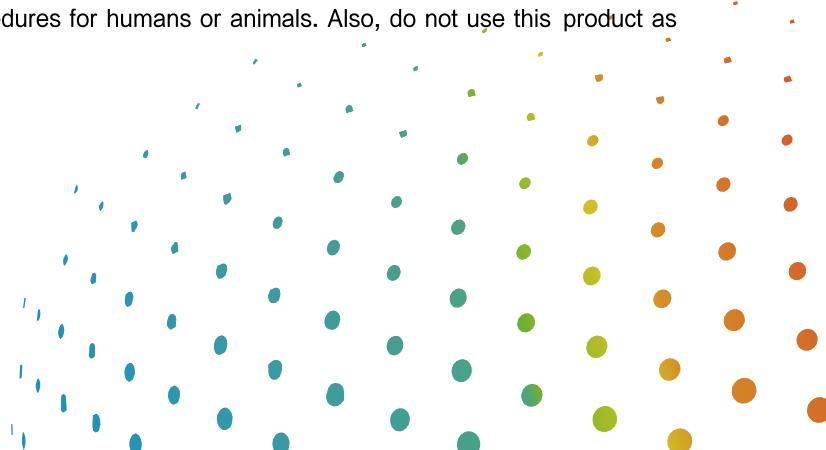
Cat No. AG11809



*Accurate Taq*  
随机突变试剂盒  
*Accurate Taq*  
Random Mutagenesis Kit

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。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

基于 PCR 的随机突变是阐述蛋白质的结构与功能关系和改进蛋白质性能的重要工具。易错 PCR ( error-prone PCR ) 技术是在特定的 PCR 反应体系中, 利用 *Taq* DNA Polymerase 不具有 3' → 5' 校对功能的特性, 可向目的基因中引入随机序列突变。本试剂盒在优化的体系下, 通过调整加入 PCR 反应体系中  $Mn^{2+}$  和 dGTP 的浓度, 利用 *Mutation* DNA Polymerase 可向目的基因中引入不同数量的碱基突变, 增加在蛋白水平上产生氨基酸序列突变的可能性。将随机突变的扩增产物克隆到表达载体中构建基因文库, 然后转入表达宿主中对蛋白进行活性筛选, 使研究人员能够在结构信息缺乏的情况下, 或者难以从蛋白质结构中预测有益突变的情况下, 筛选出有益突变。

## ➤ 产品组成

| 组分名称   | AG11809<br>( 50 rxns / 50 $\mu$ l ) |
|--|-------------------------------------|
| <i>Mutation</i> DNA Polymerase ( 1 U / $\mu$ l ) | 50 $\mu$ l                          |
| 5X Mutation Buffer                               | 500 $\mu$ l                         |
| 50X dNTP Mix ( dGTP free )                       | 50 $\mu$ l                          |
| dNTP Mix ( 10 mM each ) *                        | 50 $\mu$ l                          |
| dGTP Solution ( 2 mM )                           | 250 $\mu$ l                         |
| MnSO <sub>4</sub> Solution ( 8 mM )              | 200 $\mu$ l                         |

\*: 标准 dNTP mix, dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 的浓度均为 10 mM。

## ➤ 保存

保存温度: -20°C

运输温度: 干冰运输或 -20°C 冰袋运输

## ➤ 产品优势

1. 可控的随机突变, 可以通过改变反应条件以达到所需的随机突变水平。
2. 特异性好, 本产品中添加了能够抑制 DNA 聚合酶活性的单克隆抗体, 可以进行热启动反应。
3. 扩增性能强, 在各个反应条件下扩增的 DNA 片段长度均可达到 4.1 kb。
4. 突变多样性, 可产生转换 ( transition ) 和颠换 ( transversion ) 的点突变。  
( 注: 转换突变包括嘌呤→嘌呤和嘧啶→嘧啶的变化, 颠换突变是嘌呤↔嘧啶的变化。 )
5. 扩增得到的 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基, 可直接克隆于 T 载体。

## ➤ 实验原理

### PCR 扩增原理

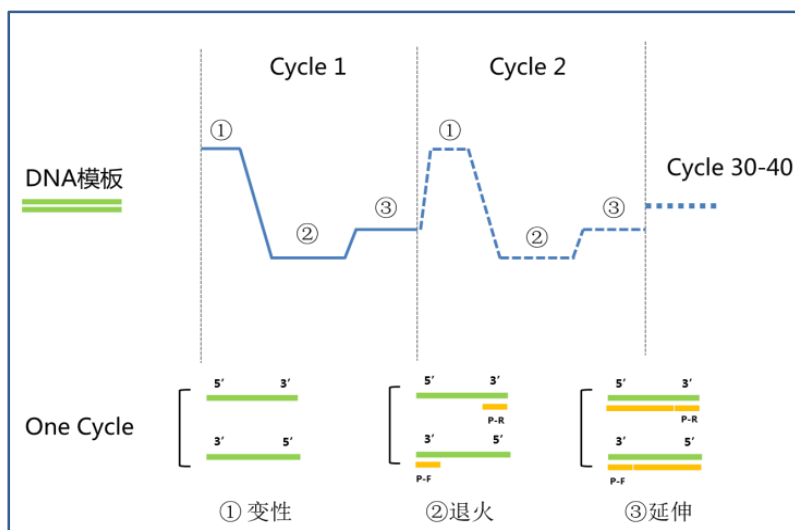
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30 ~ 40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链；



## ➤ 使用注意事项

1. 产品 *Mutation* DNA Polymerase 使用前可短暂离心，将酶液收集至离心管底部，减少损失；酶保存液中甘油浓度较高，离心后可用移液器轻柔吸打混匀，过程中尽量避免起泡；使用时注意缓慢吸取。
2. 试剂盒中各组分均需要在 -20°C 保存，使用前于冰上充分融解，轻柔混匀后再进行使用。
3. 反应体系建议在冰上配制，配制完成后放入 PCR 仪中进行反应。

## ➤ 实验前准备

### 1. 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头。

## 2. 仪器:

PCR 仪、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

## ➤ 操作方法

### 1. 确定合适的反应条件

#### 1) 确定合适的引物用量、模板用量

在大量扩增前，可参考下表摸索合适的引物用量、模板用量，影响因素可参考[<产品注意事项>](#)和[<附录 2: 常见问题及解决办法>](#)。

按照下表在冰上配制反应液:

| 组分名称   | 反应终浓度                     | 50 $\mu$ l 体系    |
|--|---------------------------|------------------|
| <i>Mutation</i> DNA Polymerase <sup>*1</sup> | 1 U                       | 1 $\mu$ l        |
| 5X <i>Mutation</i> Buffer                    | 1 X                       | 10 $\mu$ l       |
| dNTP Mix ( 10 mM each )                      | 0.2 $\mu$ M               | 1 $\mu$ l        |
| Primer F ( 10 $\mu$ M )                      | 0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup> | 1 $\mu$ l        |
| Primer R ( 10 $\mu$ M )                      | 0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup> | 1 $\mu$ l        |
| Template                                     | 1 ng <sup>*3</sup>        | -                |
| RNase free water                             | -                         | Up to 50 $\mu$ l |

\*1: 酶的加入量一般为 1 U，若扩增结果不理想，可根据实际需要在 0.5 U ~ 1.5 U 范围内调整。

\*2: 引物使用终浓度一般为 0.2  $\mu$  M；同时，可根据实际需要在 0.1 ~ 1.0  $\mu$  M 范围内调整。

\*3: 模板的加入量一般为 1 ng，若扩增结果不理想，可根据实际需要在 0.1 ~ 10 ng 范围内调整。

#### 2) 确定合适反应程序 (以三步法扩增为例<sup>\*3</sup>)

将含有反应液的 PCR 管放置于 PCR 仪中，然后参考下表条件摸索合适的 PCR 反应程序，影响因素可参考[<产品注意事项>](#)和[<附录 2: 常见问题及解决办法>](#)：

| 步骤   | 温度                 | 时间         | 循环数                     |
|------|--------------------|------------|-------------------------|
| 预变性  | 95°C               | 1 min      | 1                       |
| 变性   | 95°C               | 30 sec     | } 25 ~ 30 <sup>*2</sup> |
| 退火   | 60°C <sup>*1</sup> | 30 sec     |                         |
| 延伸   | 68°C               | 1 min / kb |                         |
| 最终延伸 | 68°C               | 1 min      | 1                       |

\*1: 退火温度主要取决于上下游引物的  $T_m$  值，通常可按照  $T_m \pm 5^\circ\text{C}$  设定。

\*2: 通常使用 25 个循环即可获得较好的扩增结果，若 25 个循环扩增效果不好，可尝试增加至 30 个循环。

\*3: 当引物  $T_m$  值较高或三步法 PCR 扩增结果不好，可尝试两步法 PCR 扩增 (两步法 PCR 反应程序可参考[<附录 1: 两步法 PCR 反应程序>](#))。

## 2. 配制随机突变 PCR 反应体系

- 1) 可根据所需求的突变数量，参考下表的不同扩增条件序列的突变情况，选择 1~3 个 PCR 反应条件。

| 条件 <sup>*2</sup>       | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9    |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 测序长度 (kb)              | ~25 | ~27 | ~31 | ~31 | ~36 | ~27 | ~28 | ~28 | ~25  |
| 碱基突变数/kb <sup>*1</sup> | 0.9 | 1.9 | 2.3 | 2.8 | 4.4 | 6.0 | 8.2 | 9.5 | 11.0 |

\*1: 碱基突变数为测序不同 GC 含量和不同长度的 DNA 片段后得到的每 kb 序列的平均突变数。同一扩增条件下不同 GC 含量和不同长度的 DNA 片段的碱基突变率可能不同，上述每 kb 的碱基突变数**仅供参考**。

\*2: 如果突变率不符合预期，当突变率偏高时可选择靠前的反应条件或者适当减少循环数等，当突变率偏低时可选择靠后的反应条件或者适当增加循环数等，具体可参考<附录 2: 常见问题及解决办法>。

- 2) 可根据<操作方法 1-1>所确定的最适引物用量、模板用量，及<操作方法 2-1>所选反应条件，按照下表中相应的反应体系在冰上配制反应液：

| 组分   | 随机突变扩增 PCR 体系 (μl) |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
|  | 1                  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  |
| <i>Mutation</i> DNA Polymerase <sup>*1</sup> | 1                  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| 5X Mutation Buffer                           | 10                 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 50X dNTP Mix ( dGTP free )                   | 1                  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| dGTP Solution ( 2 mM )                       | 1                  | 1  | 1  | 1  | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  |
| MnSO <sub>4</sub> Solution ( 8 mM )          | 0                  | 1  | 2  | 3  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  |
| Primer F <sup>*2</sup> ( 10 μ M )            | 1                  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| Primer R <sup>*2</sup> ( 10 μ M )            | 1                  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| Template <sup>*3</sup> ( 1 ng / μ l )        | 1                  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| RNase free water                             | 34                 | 33 | 32 | 31 | 30 | 29 | 28 | 27 | 26 |
| Total  | 50                 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

\*1: 酶的加入量为根据<操作方法 1-1>所确定的最适酶量 ( 酶的加入量一般为 1 U, 若扩增结果不理想, 可根据实际需要在 0.5 U ~ 1.5 U 范围内调整 )。

\*2: 引物使用终浓度为根据<操作方法 1-1>所确定的最适引物使用终浓度 ( 引物使用终浓度一般为 0.2 μ M; 同时, 可根据实际需要在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整 )。

\*3: 模板的加入量为根据<操作方法 1-1>所确定的最适模板量 ( 模板的加入量一般为 1 ng, 若扩增结果不理想, 可根据实际需要在 0.1 ~ 10 ng 范围内调整 )。

- 3) 根据<操作方法 1-2>所确定的最适反应程序进行 PCR 反应。

## 3. 结果检测

- 1) 反应结束后，取 2~5 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测产物浓度及特异性。
- 2) 剩余的 PCR 产物电泳，切胶回收目的 DNA 片段。
- 3) 将回收得到的目的 DNA 片段连接、转化到宿主菌株中，构建突变文库和开展后续实验。

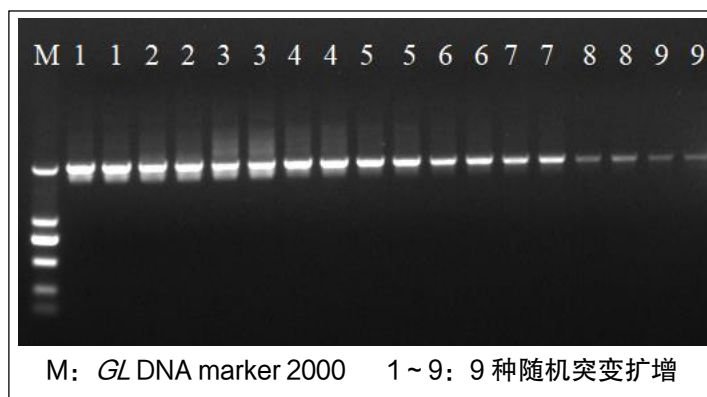
➤ 实验例

- 以 1 ng 的质粒为模板，利用本试剂盒扩增约 2 kb 的 DNA 片段，在对应<操作方法 2-2>中 1~9 反应体系的各个条件下均可成功扩增出目的片段。

反应程序：

| 温度   | 时间     | 循环数  |
|------|--------|------|
| 95°C | 1 min  | 1    |
| 95°C | 30 sec | } 25 |
| 60°C | 30 sec |      |
| 68°C | 2 min  |      |
| 68°C | 1 min  | 1    |

电泳结果如下图所示：

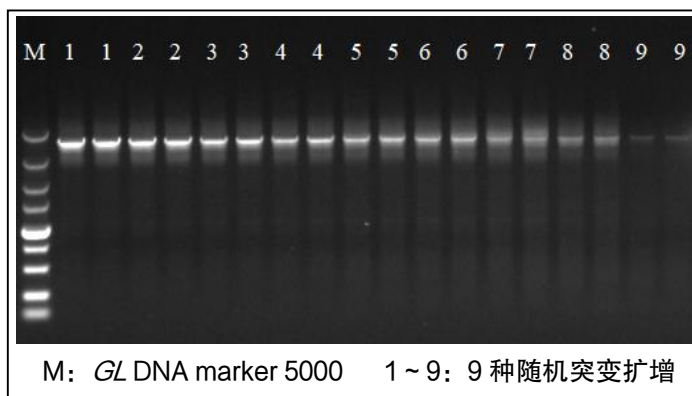


- 以 10 ng 的质粒为模板，利用本试剂盒扩增 4.1 kb 的 DNA 片段，在对应<操作方法 2-2>中 1~9 反应体系的各个条件下均可成功扩增出目的片段。

反应程序：

| 温度   | 时间     | 循环数  |
|------|--------|------|
| 95°C | 1 min  | 1    |
| 95°C | 30 sec | } 30 |
| 60°C | 30 sec |      |
| 68°C | 4 min  |      |
| 68°C | 1 min  | 1    |

电泳结果如下图所示：



## ➤ 产品注意事项

### 1. 合适的模板及加入量

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，产物量减少，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低。
- ❖ 模板的纯度、完整性和起始 DNA 模板浓度会严重影响 PCR 反应。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率。

### 2. 合适的引物

- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低，Ct 值较大。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增产物。
- ❖ 引物设计的原则：
  - ① 引物一般是 20 ~ 30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 ~ 60 % 之间。
  - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50 ~ 70°C ( 尽量控制在 60°C 左右 ) ，两引物 Tm 值相差不超过 5°C，尽量减小引物之间的 Tm 值差。
  - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
  - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
  - ⑤ 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列。
- ❖ 如果实验需要，可以在引物中加入限制性酶切位点。

### 3. 合适的变性温度及时间

- ❖ 变性时间过长或温度过高，可能导致非特异性扩增、DNA 聚合酶活性降低等问题发生；变性时间过短或温度过低，可能导致扩增效率低，电泳条带弥散。

### 4. 合适的退火条件

- ❖ 退火温度升高，可能会造成引物与模板结合困难，降低扩增效率，但同时可能提高扩增特异性。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，出现引物二聚体。
- ❖ 若引物 Tm 值较高，使用 68°C 退火/延伸步骤的两步法程序可能获得更好的结果。

### 5. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数对突变率会有影响，若 25 个循环扩增的突变率低于需求时，可提高 PCR 扩增的循环数至 30，或切胶回收 PCR 产物后，进行第二轮随机突变反应。

- ❖ 扩增循环数增加，一定程度上可增加扩增产量，但可能会导致扩增特异性降低，出现弥散条带。

## 6. PCR 产物纯化方式

- ❖ 突变反应产物建议进行切胶回收处理，去除 DNA 模板、PCR 产物上结合的 DNA 聚合酶以及其他杂质。

## ➤ 附录 1：两步法 PCR 反应程序

| 步骤   | 温度   | 时间         | 循环数       |
|------|------|------------|-----------|
| 预变性  | 95°C | 1 min      | 1         |
| 变性   | 95°C | 30 sec     | } 25 ~ 30 |
| 延伸   | 68°C | 1 min / kb |           |
| 最终延伸 | 68°C | 1 min      | 1         |

## ➤ 附录 2：常见问题及解决办法

| 问题           | 可能的原因 |         | 解决方法   |
|--------------|-------|---------|--|
| 没有观察到 PCR 产物 | 反应程序  | 变性温度不合适 | 以 1°C 的变化量提升/降低变性温度。                             |
|              |       | 退火温度较高  | 将三步法的退火温度适当降低 2 ~ 4°C。                           |
|              |       | 延伸时间较短  | 对于较长片段的扩增，可按照 1 kb / min 的延伸速度适当增加延伸时间。          |
|              |       | 循环数较少   | 适当增加 3 ~ 5 个循环。                                  |
|              | 模板    | 完整性较差   | 可通过凝胶电泳检测模板 DNA 完整性，必要时可重新制备模板。                  |
|              |       | 低纯度     | 应对模板 DNA 的浓度和纯度进行检测（cDNA 模板不建议测浓度），改善较低的 DNA 质量。 |
|              |       | 用量不足    | 适当增加模板起始量。                                       |



|              |       |                 |                                  |
|--------------|-------|-----------------|----------------------------------|
|              | 引物    | 设计不合理           | 可参考<产品注意事项 2>中引物设计原则重新设计引物。      |
|              |       | 引物降解            | 可将引物分装保存，避免多次冻融或长期 4℃ 保存，防止引物降解。 |
|              |       | 用量不合适           | 优化引物使用量，在 0.2 ~ 1.0 μM 范围内调整。    |
| PCR 产物电泳条带弥散 | 电泳条件  | 时间过长            | 适当缩短电泳时间。                        |
|              |       | 电压不稳            | 建议检查电压。                          |
|              | 反应程序  | 变性不充分           | 可适当增加变性时间和/或温度，使 DNA 有效解离。       |
|              |       | 退火温度较低          | 以 1℃为变化量适当提高退火温度。                |
|              |       | 退火时间过长          | 适当缩短退火时间。                        |
|              |       | 延伸温度过高          | 以 1℃为变化量适当降低延伸温度，特别是对于长片段 PCR。   |
|              |       | 延伸时间不足          | 可适当增加延伸时间，特别是对于长片段 PCR。          |
|              | 循环数较多 | 适当减少 3 ~ 5 个循环。 |                                  |
|              | 模板    | 完整性较差           | 通过凝胶电泳检测模板 DNA 完整性，必要时可重新制备模板。   |
|              |       | 起始量过多           | 适当降低模板起始量。                       |
|              | 酶     | 添加量过多           | 在 0.5 U ~ 1.5 U 范围内适当调整酶量。       |
| 非目标 PCR 产物   | 反应程序  | 退火温度较低          | 适当升高 2 ~ 3℃的退火温度。                |
|              |       | 延伸时间较长          | 以 1 min 为变化量适当缩短延伸时间。            |
|              |       | 循环数较多           | 适当减少循环数。                         |

|            |         |        |   |
|------------|---------|--------|---|
|            | 引物      | 设计不合适  | 可参考<产品注意事项 2>中引物设计原则重新设计引物。                 |
|            |         | 用量过多   | 优化引物浓度（通常每条引物终浓度为0.2 μM可以得到较好的结果）。          |
|            | 实验污染    | 实验区域污染 | 进行 PCR 实验时，建议划分独立的实验区域，配制 PCR 反应体系时做好防污染工作。 |
|            |         | 交叉污染   | 为了避免出现交叉污染，操作时应小心轻柔，防止将模板吸入加样枪内或溅出离心管外。     |
| 碱基突变率过高或过低 | 循环数不合适  |        | 适当减少或增加 2 ~ 3 个循环。                          |
|            | 反应条件不合适 |        | 可参考不同反应条件下的序列突变情况，使用小体系进行突变率摸索。             |