



# Accurate Taq 随机突变试剂盒

Version 1

## Accurate Taq Random Mutagenesis Kit

Code No. AG11809

<b>包装量:</b>	50 rxns / 50 $\mu$ l
<b>保存温度:</b>	-20 $^{\circ}$ C

### > 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'  $\rightarrow$  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<sup>2+</sup> 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

Mutation 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。

### > 保存及运输

**保存温度:** -20 $^{\circ}$ C

**运输温度:** 干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

### > 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. 试剂盒中的各组份均需要在 -20 $^{\circ}$ 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, 配制完后放入 PCR 仪中进行反应。

### > 实验操作

#### 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。

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
Mutation DNA Polymerase <sup>*1</sup>	1 U	1 $\mu$ l
5X Mutation 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。

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 Tm 值, 通常可按照 Tm ± 5°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 Tm 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好, 可尝试两步法 PCR 扩增。

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。

② 可根据<实验操作 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
Mutation 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 μM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Primer R <sup>2</sup> (10 μM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Template <sup>3</sup> (1 ng / μl)	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<实验操作 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 ~ 1.5 U 范围内调整)。

\*2: 引物使用终浓度为根据<实验操作 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 μM; 同时, 可根据实际需要在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整)。

\*3: 模板的加入量为根据<实验操作 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<实验操作 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。