S6 Site-Directed Mutagenesis Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
S6 Site-Directed Mutagenesis Kit	10T	S6129-01
S6 Site-Directed Mutagenesis Kit	20T	S6129-02

【储存条件】

-20°C保存，有效期 24 个月。

【产品简介】

本试剂盒用于克隆在质粒上的 DNA 序列的定点编辑，可实现快速高效的密码子突变、插入或缺失等改变，支持大片段序列的插入和删除，配合推荐的引物设计方法，突变效率可达 100%。只需通过 S6-Mutase 酶进行目的质粒扩增和 S6-Remase 酶清除原始质粒模板，产物转化大肠杆菌感受态细胞即可得到目的载体的克隆，操作简单方便。本试剂盒采用的高速超保真酶 S6-Muta 可极大缩短 PCR 时间，可用于 10-20kb 的质粒的定点突变，只需 1 天即可完成目的基因的定点编辑，可以广泛应用于基因及蛋白质的功能研究。

【产品组分】

组分名称	10 T	20 T
2× S6-Mutase Mix	110 μl	220μl
S6-Remase (10U/μl)	10 μl	20 μl
10× S6-Remase Buffer	25 μl	50 μl

【引物设计】

推荐使用“非对称”的引物设计方法，即突变位点不要位于两条引物的中央，而是采取下图 1 的排布方式，保证两条突变引物的 3’ 端与原始质粒完全匹配的序列的 Tm 值均达到 58-68°C。图 1 中所示为将原始质粒上 AT 替换为 GC，引物的上引入突变位点的位置更靠近 5’端，使两条引物的 5’端相重叠的序列的 Tm 值达到 48-53°C；同理设计插入和删除突变的引物。如对引物设计不熟悉，推荐采取在线引物设计：http://ps.biocloud.org.cn/。

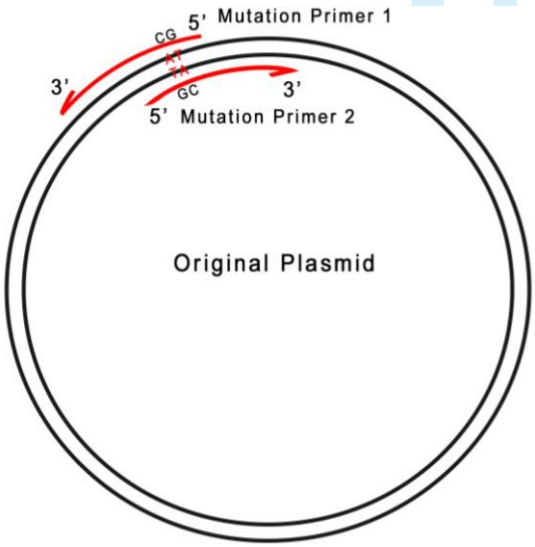

图 1 引物设计示意图

【操作方法】

1. **PCR 扩增目的质粒（请注意是扩增质粒全长，而不是某个片段，PCR 延伸时间请设置足够）：**

A. 按下表配制 PCR 反应体系:

2×S6-Mutase Mix	10 μl
Primer 1 (10 μM)	0.4 μl
Primer 2 (10 μM)	0.4 μl
Original Plasmid	1-10 ng
ddH_2O 补足至	20 μl

B. 推荐使用的 PCR 程序:

Procedure	Temperature	Time	
Pre-denaturation	95°C	2 min.	
Denaturation	94°C	25 sec.	15-25cycles**
Annealing	54–64°C	25 sec.	
Extension	68°C	15 sec.-30 sec./1 kb DNA	
Final extension	68°C	3-5 min.	
Keeping	4°C	forever	

PCR 反应结束后，取 5-10 μl 产物进行电泳，**必须看到明显和原始质粒大小一致的条带**，才可进行下一步操作。注意：**如果 15-25 个循环看不到明显的条带，可以把循环数提高到 30 个，看到条带后才可进行下一步操作。

2. 去除原始质粒模板

取 8 μl PCR 产物，加入 1 μl 10× S6-Remase Buffer 和 1 μl S6-Remase (10U/μl) 酶，37°C 水浴 1h，即可用于转化 dam^+型大肠杆菌感受态细胞（如 S6038 或 S6039），涂布相应抗性的平板培养。

3. 培养过夜后挑取单克隆进行测序。

【注意事项】

1. 如果转化后无单菌落出现，请检查 PCR 的条件**（尤其是延伸时间是否足够扩出质粒全长，时间不够导致 PCR 失败！）**。
2. 如果电泳图没有正确大小的条带，请尝试降低或者调高 PCR 的退火温度（S6-Mutase 酶退火温度按 Tm+3 设置可能会更好）。
3. 如果不是 PCR 的问题造成，请检查感受态的转化效率及筛选培养基平板。
4. 原始质粒的加入量需严格控制，加入的原始质粒的量尽量不要超过 10 ng**（原始质粒太多，将对 PCR 有强烈的抑制！）**。
5. 如出现突变效率低的情况，请检查模板质粒的加入量，并可延长第二步 S6-Remase 的反应时间。

【FAQ】

Q：我扩增后得到 2 条带，是否影响后面的实验？

A：这与引物设计有关，可能有非特异结合位点，但是只要有正常大小的目的质粒条带扩增就可以继续消化完成转化，因为小条带只可能是质粒的一部分序列，不会影响转化。

Q：对同一个质粒的 3 个位点突变，需要设计 6 条引物，不知道如何使用该试剂盒对这 3 个位点进行快速突变？

A：同时突变多个位点的，比如设计了引物 F1/R1, F2/R2,F3/R3,分别用 F1+R2，F2+R3，F3+R1 配对进行 PCR（分 3 个管独立进行），然后消化模板质粒后，混合，50℃反应 1h 后进行转化。每个 PCR 的产物跑胶鉴定确定 PCR 成功，是否有非特异或引物二聚体，如有，建议切胶回收后再混合。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。