



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2025-06-03

# 快速多点突变试剂盒

## Fast MultiSite Mutagenesis Kit

(目录号: ZC402)

试剂盒组成	ZC402-1 10次	ZC402-2 20次
2×K-Pfu Mix	1ml	1ml×2
DMT Enzyme	30μl	30μl×2
4×SE Cloning Mix	25μl	50μl
DMT Competent Cell	10支 (50μl/支)	20支 (50μl/支)
Nuclease-free Water	1ml	1ml

保存: -20°C至少保存1年, DMT Competent Cell -80°C至少半年。

### ■ 设计原理

- 设计带有突变位点的引物, 使用2×K-pfu Mix大量扩增带有突变位点的PCR片段。
- 引物设计带有重叠区域, 依据同源重组原理, 将不多于5个片段无缝拼接, 完成突变。
- 产物中少量的非突变的甲基化质粒模板, 通过DMT酶体外降解和DMT感受态细胞体内降解。

### ■ 产品特点

- 2×K-Pfu Mix扩增能力强, 速度快, 保真度高, 快速获得大量正确突变产物。
- 能够实现载体上单点或多点 (连续或不连续) 突变。
- 10min完成同源重组反应。
- 综合使用DMT酶和DMT感受态细胞双重降解非突变的甲基化质粒模板, 双重降解保证极高的突变效率。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



**PCR程序**

95°C	1-3min	}	20-30 cycles
95°C	10sec		
55°C	10sec		
72°C	4kb/min		
72°C	5min		

**电泳检测**

取5-10  $\mu\text{l}$  PCR产物，琼脂糖凝胶电泳检测。

**PCR产物的消化**

取1 $\mu\text{l}$  DMT酶加入PCR产物中，混匀，37°C孵育1小时。

**片段纯化**

电泳检测时，如扩增产物单一无杂带，可用PCR产物纯化试剂盒纯化。如果有非特异扩增，有杂带，则需用凝胶回收试剂盒纯化回收。

**片段同源重组**

反应体系：推荐8 $\mu\text{l}$ 反应体系，可按比例放大或者缩小。

组分	体积
片段 1	x $\mu\text{l}$
片段 2	y $\mu\text{l}$
...	...
4× SE Cloning Mix	2 $\mu\text{l}$
Nuclease-free Water	To 8 $\mu\text{l}$

建议片段等摩尔比添加

各组分混匀后在37°C水浴锅或PCR仪中放置10分钟，然后转移到冰上或-20 °C保存。

**转化**

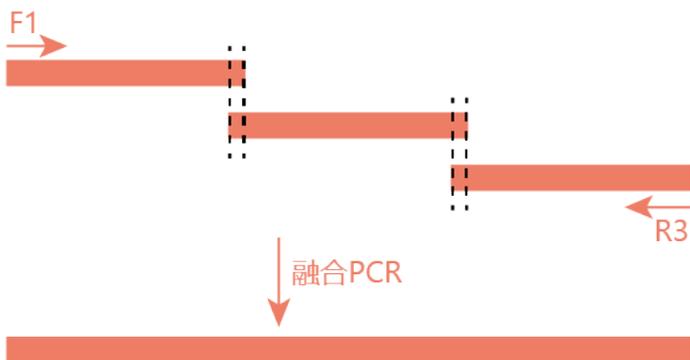
- (1) 将重组产物加入50  $\mu\text{l}$ 感受态细胞中（在感受态细胞刚刚解冻时加入连接产物），轻弹混匀，冰浴 20-30分钟。
- (2) 42°C水浴热激60秒，立即置于冰上2分钟。
- (3) 加500 $\mu\text{l}$  平衡至室温的SOC或LB培养基，180rpm、37°C培养1小时。
- (4) 将适宜抗性的平板在37°C培养箱中预热。
- (5) 取100-200 $\mu\text{l}$ 菌液均匀地涂在平板上，在37°C培养箱中过夜培养。



### 注意

- 如无克隆生长，或克隆数少，建议提高加入片段的量或同源重组的体积或菌液涂布量。
- 如片段复杂或有重复序列等，建议将部分片段融合PCR，融合PCR可以将两个或多个PCR片段连接到一起，以减少连接的片段数和避开复杂区域的连接。

### ■ 3片段融合PCR原理图：



### 推荐融合PCR体系与条件

反应体系：推荐50μl反应体系，可按比例放大或者缩小。

组分	体积
片段 1	1 μl
片段 2	1 μl
.....	.....
5' 端最末端引物 (10μM)	1 μl
3' 端最末端引物 (10μM)	1 μl
2×K-Pfu Mix	25 μl
Nuclease-free Water	to 50 μl

建议片段等摩尔比添加

- |      |         |                |
|------|---------|----------------|
| 95°C | 1-3min  | } 20-25 cycles |
| 95°C | 10sec   |                |
| 55°C | 10sec   |                |
| 72°C | 4kb/min |                |
| 72°C | 5min    |                |