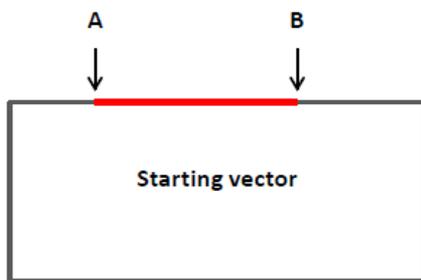


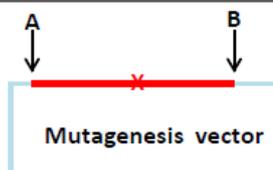
QuikChange Site-Directed Mutagenesis

Please refer to Maniatis for theoretical background. This rapid four-step procedure generates mutants with greater than 80% efficiency. The protocol is simple and uses miniprep plasmid DNA. The mutagenesis protocol is used to make point mutations, switch amino acids, and delete or insert single or multiple amino acids. The QuikChange site-directed mutagenesis method is performed using a *proof-reading* DNA polymerase cyclase. The basic procedure utilizes a supercoiled double-stranded DNA (dsDNA) vector with an insert of interest and two synthetic oligonucleotide primers containing the desired mutation. The oligonucleotide primers, each complementary to opposite strands of the vector, are extended during temperature cycling by DNA polymerase. Incorporation of the oligonucleotide primers generates a mutated plasmid containing staggered nicks. Following temperature cycling, the product is treated with *Dpn* I. The *Dpn* I endonuclease (target sequence: 5'-Gm6ATC-3') is specific for methylated and hemimethylated DNA and is used to digest the parental DNA template and to select for mutation-containing synthesized DNA. DNA isolated from almost all *E. coli* strains is *dam* methylated and therefore susceptible to *Dpn* I digestion. The nicked vector DNA containing the desired mutations is then transformed into XL1-Blue competent cells.

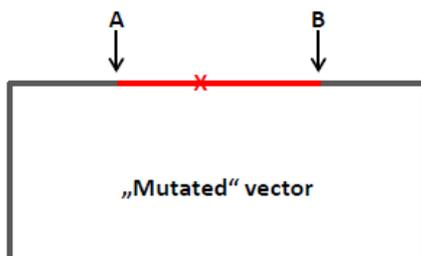
Flow chart in vitro mutagenesis



The protocol depends on PCR, therefore the reaction itself is bound to create new mutations. Therefore, subclone the fragment in which mutations should be introduced into Bluescript or related general cloning vector. For this purpose, use unique sites.



Perform mutagenesis as described and analyse colonies by restriction analysis. Choose 1 or 2 clones for sequencing the insert. If sequence is correct, cut out fragment with same enzymes as before and re-insert into original vector.



Prepare minipreps, check by restriction (same sites as above plus 1 site in fragment, ideally one that was introduced with mutation). If correct, go ahead with experiment.

1 Klonierung der zu mutierenden DNA in Bluescript

Zu mutierendes Fragment mit 2 verschiedenen Restriktionsenzymen (Orientierung!) in Bluescript oder ähnlichen Vektor klonieren. Minipräp. charakterisieren.

2 Verdünnung des Ausgangs-Plasmids herstellen

- 5 bis 50 ng/μl

3 PCR-Reaktion (Mutation)

- Phusion Polymerase ca. 15 bis 30 sec/kbp
- Punktmutation: 12-14 Zyklen; Insert/Deletion: 18-24 Zyklen

	Konzentration	Probe	Kontrolle
Buffer (5x)		10μl	10μl
dNTP	5 mM	2μl	2μl
Forward primer	25μM	1μl	1μl
Reverse primer	25μM	1μl	1μl
Polymerase		0,5μl	-
ad H2O		34,5μl	35μl
Template	5 ng/μl	1μl	

PCR-Programm

Programm	Deckel heizen 99°C; Vorlauf ein		
Steps			
1	98°C	30 sec	
2	98°C	10 sec	
3	50°C	30 sec	
4	72°C	200 sec	go step 2 repeat 14 times
5	72°C	5 min	
6	4°C	Pause	

4 Abbau template

- DpnI schneidet G m6A ^ T C (im PCR-Produkt ist keine Methylierung)
- 1μl DpnI mit 10U/μl (Fermentas) in PCR-Tube
- Vortexen und zentrifugieren
- 1h bei 37°C

5 Transformation

- Nach Standardprotokoll

6 Klone picken

- 40 µl LB- Medium (Antibiotika Kanamycin 100µg/ml, Ampicillin 200µg/ml) in ein steriles 1,5 ml Eppi vorlegen
- mit sterilem Zahnstocher einzeln liegende Kolonie picken
- zuerst in Replikaplatte einstechen, dann gleichen
- Zahnstocher in Eppi mit LB-Medium tauchen und Medium verwirbeln
- Eppi in Thermomixer 3 h bei 37°C 400 rpm inkubieren

7 Kolonie-PCR

- Taq-DNA Polymerase von Invitrogen
- Ansatzvolumen: 25µl
- PCR mit 2µl aus Schritt 5

		1x	6x
Wasser		20	120
10xPuffer		2,5	15
MgCl ₂	50 mM	0,75	4,5
dNTP's	10 mM	0,5	3
Primer fwd	25 µM	0,5	3
Primer rev	25 µM	0,5	3
Taq		0,2	1,2
pro Eppi:		23	

PCR-Parameter

Programm	Deckel heizen 99°C; Vorlauf ein		
Steps			
1	95°C	1 min	
2	95°C	30 sec	
3	57°C	30 sec	
4	72°C	2 min	go step 2 repeat 39 times
5	72°C	3 min	
6	4°C	Pause	

8 Mini-Präparation

- Nach Standardprotokoll mit Zahnstocher von frischer Replikakolonie animpfen

9 Restriktion

- Zuerst Vorhandensein Mutation prüfen (falls durch Restriktion möglich), dann Fragment mit gleichen Enzymen wie beim Ein-Klonieren ausschneiden.
- 1 bis 2 µg DNA pro Restriktionsansatz
- 2µl 10 x Restriktionspuffer
- je 1µl Restriktionsenzym

- 1h bei 37°C verdauen
- Auf ein 1-1,4 % Agarose-Gel auftragen
- 1-2 korrekte Klone sequenzieren lassen
- Korrektes Insert wie oben ausschneiden und in Zielvektor, der mit den gleichen Enzymen geschnitten ist, ligieren und Transformation durchführen.
- Zielvektor durch gleiche Restriktion auf korrekte Insertion prüfen.
- Falls korrekt, fertig.