

权 利 要 求 书

1. 一种构建基因突变文库的方法，所述方法包括：
- (1) 合成在一个或多个突变位点上包含突变核苷酸的寡核苷酸序列池；
- 5 (2) 对合成的包含突变核苷酸的寡核苷酸序列池中的寡核苷酸进行 PCR 扩增；
- (3) 以包含已甲基化的位点且包含待突变的基因或其部分的质粒为模板，以步骤(2)中获得的扩增后的寡核苷酸序列池中的寡核苷酸为引物，进行 PCR 扩增；
- 10 (4) 用识别并切割所述已甲基化的位点的核酸内切酶切割步骤(3)的扩增后的体系中存在的模板质粒；和
- (5) 向步骤(4)获得的体系中添加分别对应于待突变的基因或其部分的两端的正向引物和反向引物，进行 PCR 扩增，以得到包含多个含有突变核苷酸的基因或其部分的基因突变文库。
- 15 2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中在步骤(1)-(5)之间不进行纯化。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其进一步包括：
- (6) 对步骤(5)的扩增产物进行回收和纯化，以得到最终产物。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，其进一步包括：
- (7) 对步骤(6)中获得的最终产物进行测序，以验证序列和/或检测基因突
- 20 变分布。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述测序为 Sanger 测序和/或高通量测序。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法，其中在步骤(1)中合成的寡核苷酸序列池中的寡核苷酸序列的长度为 60-170 bp，优选为 80-90 bp。
- 25 7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法，其中在步骤(1)中合成的寡核苷酸序列池在 1 至 10 个突变位点上包含突变核苷酸。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的方法，其中所述突变位点是相邻或不相邻的。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法，其中所述含有突变核苷酸的
- 30 基因编码的氨基酸序列与所述待突变的基因编码的氨基酸序列具有至少一个氨基酸差异。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述至少一个氨基酸差异选自下组：取代、添加或缺失。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述至少一个氨基酸差异是取代。

5 12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述取代是用与原氨基酸具有不同性质的氨基酸取代原氨基酸。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述性质选自下组：酸碱性、极性、荷电性和侧链基团。

10 14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的方法，其中步骤(2)中的 PCR 扩增使用分别对应于所述在一个或多个突变位点上包含突变核苷酸的寡核苷酸序列的两端的两个引物。

15 15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的方法，其中步骤(2)中 PCR 扩增的循环数为 10-25 个循环，优选为 12-22 个循环、14-20 个循环、15-18 个循环或 15-16 个循环，最优选为 16 个循环。

15 16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的方法，其中步骤(2)的 PCR 扩增使用的 DNA 聚合酶为高保真 DNA 聚合酶。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的方法，其中步骤(3)中引物与模板的摩尔比为 15:1 至 50:1，优选为 16:1 至 40:1，17:1 至 30:1，18:1 至 25:1，或 19:1 至 22:1，更优选为 19:1 至 21:1，最优选为 20:1。

20 18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法，其中步骤(3)中 PCR 扩增的循环数为 10-20 个循环，优选为 12-18 个循环、14-16 个循环，最优选为 15 个循环。

25 19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的方法，其中步骤(3)的 PCR 扩增使用的 DNA 聚合酶为高保真 DNA 聚合酶，优选为高保真的 Phusion DNA 聚合酶。

20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的方法，其中所述质粒提取自使质粒甲基化的细菌，优选提取自大肠杆菌，更优选提取自大肠杆菌 TOP10 菌株。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的方法，其中步骤(4)中的核酸内切酶为 *DpnI*、*MspII* 或 *FspEI*。

30 22. 一种基因突变文库，其是使用根据权利要求 1-21 中任一项所述的方法构建的。

23. 一种用于根据权利要求 1-21 中任一项所述的构建基因突变文库的方法的试剂盒，其包含在一个或多个突变位点上包含突变核苷酸的寡核苷酸序列池、包含已甲基化的位点且包含待突变的基因或其部分的质粒、和识别并切割所述已甲基化的位点的核酸内切酶。

5 24. 根据权利要求 23 所述的试剂盒，其中所述试剂盒还包含 DNA 聚合酶。

25. 一种解析蛋白质中的氨基酸突变与蛋白质的特性、调控和/或功能之间的关系的方法，其包括以下步骤：

10 (1) 使用根据权利要求 1-21 中任一项所述的方法构建编码所述蛋白质的基因的基因突变文库；

 (2) 将所述基因突变文库中的突变基因编码的蛋白质的特征、调控和/或功能与未突变的蛋白质的特征、调控和/或功能进行比较；和

 (3) 解析突变位置的氨基酸与蛋白质的特性、调控和/或功能的关系。