



Stratagene **突变** 解决方案，
满足 **蛋白质工程** 需求

STRATAGENE

安捷伦科技公司子公司

采用突变技术的蛋白质工程学使研究者能够调控蛋白活性和阐述结构与功能之构效关系，从而丰富了我们对细胞基本进程和疾病机制的认知，并推动了对复杂病症（如癌症）新型疗法的发现。二十年来，Stratagene 在开发新型突变工具方面一直处于领先地位。已经被数以千计文献所引用的 QuikChange® 定点突变与 GeneMorph® 随机突变试剂盒，为许多重大实验与科学突破提供了不可或缺的工具。

Stratagene: 您在靶向蛋白质工程领域的合作伙伴

为了帮助使用者最大限度地发挥突变的能力，Stratagene 提供了当今最为完备的试剂和试剂盒。我们的产品将先进技术、酶工程专业知识和经验验证过的实验方案整合为一体，可在最短时间内轻松获得准确而可靠的结果。我们持续不断的创新将继续建立新的标准。例如，新型 QuikChange Lightning 定点突变试剂盒® 在保持了 Stratagene 一贯的高效率与准确性的同时，可极大地减少实验所需时间。如今，作为安捷伦科技公司的子公司，Stratagene 可为我们客户伙伴提供更多的资源。

突变用产品选择指南				
应用	产品	说明	特点	页码
定点突变	QuikChange Lightning 试剂盒 	采用了催化速度更快的酶和反应时间更短的实验方案，在节省大量时间的同时，保持了原有 QuikChange 试剂盒的效率和准确性，适合所有质粒大小的定点突变，并且用长达 14 kb 的 DNA 模板进行质量控制	<ul style="list-style-type: none"> • 少于 1 小时的操作和过夜转化即可完成整个实验 • 包含持续合成能力强、保真度高的 QuikChange Lightning 融合型 DNA 聚合酶 • 采用 QuikSolution 以增强扩增效果 • 包含增强型 <i>Dpn</i> I 酶，使得突变筛选更快 • 使用我们最高效的 XL-10 Gold® 超级感受态细胞 	6
	QuikChange II 试剂盒	使用超高保真 <i>Pfu</i> 酶，确保高准确性和高效率的定点突变	<ul style="list-style-type: none"> • 包含我们的超高保真 <i>PfuUltra</i>® DNA 聚合酶和 <i>Dpn</i> I 筛选酶 • 包含 XL1-Blue 感受态细胞 	7
	QuikChange II XL 试剂盒	使用超高保真 <i>Pfu</i> 聚合酶，可确保高准确性和高效的定点突变；其它试剂盒组成可促进大质粒（大于 8 kb）或复杂质粒的突变	<ul style="list-style-type: none"> • 包含我们的超高保真 <i>PfuUltra</i> DNA 聚合酶和 <i>Dpn</i> I 筛选酶 • 采用 QuikSolution 以增强扩增 • 包含我们最高效的 XL-10 Gold® 超级感受态细胞 	7
	QuikChange II-E 试剂盒	提供超高保真定点突变，随后即可将突变分子转化进电转化感受态细胞	<ul style="list-style-type: none"> • 包含我们的超高保真 <i>PfuUltra</i> DNA 聚合酶和 <i>Dpn</i> I 筛选酶 • 包含 XL1-Blue 电转化感受态细胞 	7
多位点定点突变	QuikChange 多点突变试剂盒	采用了简单的三步法实验方案，可同时在多达 5 个位点引入突变，可以方便地进行饱和突变或构建用于筛选的突变克隆库	<ul style="list-style-type: none"> • 使用含有我们的 <i>PfuTurbo</i>® DNA 聚合酶^b 的多酶混合物 • 包含 <i>Dpn</i> I 筛选酶和我们最高效的 XL-10 Gold 超级感受态细胞 	8
随机突变	GeneMorph II 试剂盒	提供优于常规 <i>Taq</i> 酶的易错 PCR 法；使用新型聚合酶，可产生无偏突变谱，可稳定扩增长达 10 kb 的靶序列	<ul style="list-style-type: none"> • 包含 Mutazyme® II 易错 DNA 聚合酶混合物 • 使用浓度平衡的核苷酸和不含锰的反应缓冲液进行稳定的易错 PCR • 提供简单的方法，实现所需的低、中或高突变频率 	10
	GeneMorph II EZClone 试剂盒	采用两步法进行随机突变和不依赖于限制性内切酶的克隆，可突变、克隆长达 3.5 kb 的靶序列；结合了 GeneMorph II 随机突变与简便精确的克隆方法二者的优点，可构建用于筛选的、具有代表性的大型突变文库	<ul style="list-style-type: none"> • 包含 GeneMorph II 试剂盒的所有成分 • 另外还包含超高保真 EZClone 聚合酶和 <i>Dpn</i> I 酶，前者用于将随机突变序列插入带切口的环状 DNA 中，而后者用于富集突变序列 • 包含对照引物和模板，以及我们的最高效 XL-10 Gold 超级感受态细胞 	10

轻松实现准确可靠的定点突变

定点突变是改变选定位点的基因序列或载体序列的首选方法。通过在扩增反应中使包含所需修饰的引物经 DNA 聚合酶引入，从而实现点突变、插入突变或缺失突变。Stratagene 提供目前市场上最准确、最高效且最易于使用的突变试剂盒。

当天即可完成的简单实验方案，节省您的时间

QuikChange 突变试剂盒采用了我们独有的、一天内即可完成的三步法，可在几乎任何双链质粒模板中引入点突变、氨基酸替换、缺失突变和小插入突变，并且突变效率超过 80%。这种简单的三步法首先使用热循环仪合成突变链，然后使用 *Dpn* I 降解亲本 DNA 模板，最后通过转化步骤完成实验（图 1）。该方法无需耗时的亚克隆、单链 DNA 拯救或体外甲基化步骤。

因此可以确保以最少的错配进行稳定的线性扩增。为了保证只有亲本链被复制，设计了可与亲本链完全匹配的互补引物。使用 *Dpn* I 酶处理扩增产物，以消化 dam 甲基化和半甲基化的亲本链。这种非 PCR 方法结合市场上保真度最高的聚合酶，几乎可完全消除不需要的第二位点突变。

减少不必要的错误

在 PCR 反应过程中，错误往往随着每轮扩增循环而逐步增加，与此不同，QuikChange 方法采用了线性扩增策略，只能以亲本 DNA 作为模板进行扩增。由于循环次数少而模板起始量相对较高，

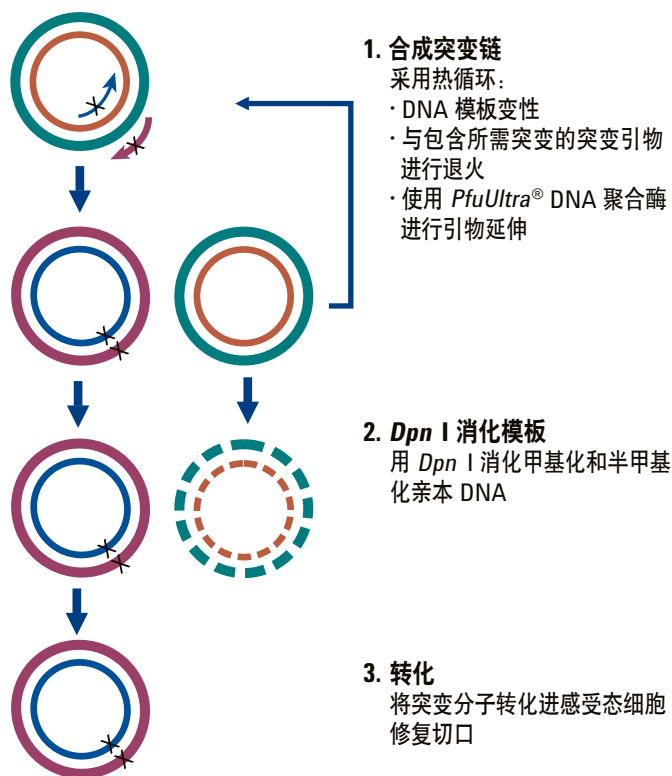


图 1. QuikChange 方法
一天内完成的 QuikChange 方法使您只需简单三步即可获得结果

经过优化的试剂确保实验成功

QuikChange 试剂盒包含所有必需试剂 (包括对照), 因此您什么都不缺。酶、缓冲液和 dNTP 经过优化, 可节省时间并保持结果一致性。此外, 我们所有试剂盒都包含 *Dpn* I 酶和高效的感受态细胞。

引物设计更加容易

QuikChange 引物设计程序可帮助您设计突变引物, 以进行 QuikChange 定点突变实验。

- 设计生成适用于点突变、缺失突变和插入突变的引物序列, 设定最佳的解链温度和自由能
- 为多位点突变和饱和突变提供建议
- 将导入的 DNA 序列翻译为氨基酸序列
- 支持我们所有 QuikChange 定点突变试剂盒



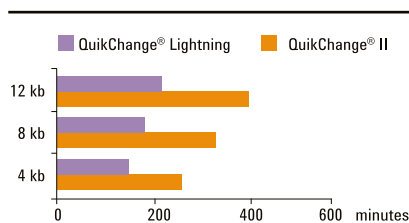
访问 www.stratagene.com/mutagenesis,
体验 QuikChange 引物设计程序

定点突变领域的创新技术

Stratagene 意识到定点突变在您研究中的重要作用。因此我们持续研发功能更强大的新工具，帮助您在更少的时间里更轻松地开展实验，成功应对条件最为挑战的应用。

QuikChange Lightning 定点突变试剂盒：功能强大的新工具

在三小时内即可引入点突变、插入突变或缺失突变，随后便可进行过夜转化，同时保持了 QuikChange 试剂盒预期所能达到的高准确性和高效率（图 2）。由于采用了我们独有的三步 QuikChange 实验方案及催化速度更快的酶，扩增和筛选步骤所需时间得到了缩短。这些新型酶类仅为我们的 QuikChange Lightning 定点突变试剂盒所独有。



QuikChange® Lightning 与 QuikChange® II 实验时间对比

图 2. 我们的 QuikChange Lightning 产品可节省大量时间
QuikChange Lightning 定点突变试剂盒为您节省时间，加快研究进程

增强的持续合成能力可减少筛选时间

我们的 QuikChange Lightning DNA 聚合酶融合蛋白是专利配方，能够以超高的保真度在更短的时间内延伸突变引物。我们的 QuikChange Lightning DNA 融合型聚合酶具有增强的持续合成能力，极为准确和高效，并能扩增长片段靶序列，同时大幅减少延伸时间。

- QuikChange Lightning DNA 聚合酶融合蛋白具有更快的延伸时间 (30 秒/kb)
- Dpn I 限制性内切酶经强化，只需 5 分钟即可高效消化亲本质粒 DNA，为您节省多达 55 分钟的时间

适合大片段质粒

使用高保真酶来扩增长片段靶序列非常关键，因为突变频率随扩增子的增大而线性增大。该试剂盒适合富含 G/C 的杂质粒和/或长达 14 kb 的大片段质粒。我们的新型 QuikChange Lightning 试剂盒包含我们的 QuikSolution 试剂，可促进大片段质粒的复制。

- 我们的 XL-10 Gold® 超级感受态细胞提高了转化过程中 DNA 的转化效率

轻松进行结构域交换

通过结构域交换实验可在相关基因序列之间交换区域，从而绘制同源蛋白质之间的功能差异图谱。按照常规作法，这些实验通常难度大，耗时多，因为实验中要生成含尿嘧啶的 ssDNA¹ 或者依赖方便的限制性酶切位点²。与之相比，使用经过改进的新型 QuikChange 试剂盒可快速轻松地进行 DNA 序列³ 交换（图 3）。

插入与缺失突变的理想之选

通过插入与缺失突变研究能够绘制基因的独立功能区图谱、改造载体、引入亲和标签以及纠正移码突变。我们使用 QuikChange 方法进行小片段插入和缺失（最多 12 bp），可观察到高于 80% 的突变效率⁴。公司外部的许多其他研究者使用 QuikChange 方法或其改进方法可以引入 31 bp⁵、87 bp⁶ 和 3 kb⁷ 的缺失或者 31 bp⁵ 以及高达约 1 kb⁸ 的插入片段。同结构域交换实验一样，这些 QuikChange 试剂盒改良方法简单且高效，可用任何质粒 DNA 模板最大限度地实现多种功能研究。

QuikChange II 定点突变试剂盒：成熟的技术

使用我们 QuikChange II 试剂盒，可以实现高效且准确的定点突变，该试剂盒特点在于包含经由基因工程改造而来，具有增强地纠错功能的 *PfuUltra* DNA 聚合酶^d。

QuikChange II XL：应对条件最具挑战的应用

我们的 QuikChange II XL 定点突变试剂盒^a 专为大片段质粒模板或者其它难突变质粒模板的突变而设计。QuikChange II XL 试剂盒的特点在于其试剂成分专门设计用于提高 DNA 复制和增强细菌转化效率。

- QuikSolution 试剂可促进大片段质粒复制
- 与原有 QuikChange 试剂盒采用的 XL1-Blue[®] 细胞相比，XL-10 Gold 超级感受态细胞的转化率是前者的 5 倍

QuikChange II-E：实现最高的电穿孔转化效率

我们的 QuikChange II-E 定点突变试剂盒^f 专为那些需要将分离的突变克隆转化进电转化感受态细胞的研究者设计。该试剂盒包含我们的 XL1-Blue 电转化感受态细胞，该感受态细胞具有四环素抗性并且具有极高的电转化效率。

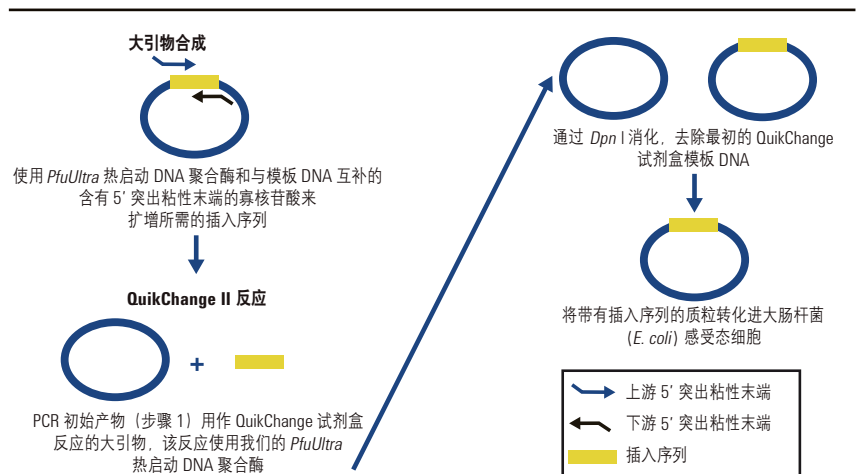


图 3. 结构域交换机制
QuikChange 能轻松实现同源蛋白质之间的区域交换

多种用途的多位点定点突变系统

在蛋白质结构与功能关系的研究中，通常先根据蛋白质结构数据推测出可能对蛋白质功能起关键性作用的氨基酸残基，或者鉴定单点突变后引起的蛋白质活性的变化，或者从随机突变体库中分离鉴定出活性发生变化的突变体，然后找出对应的序列变化。一旦找出这些关键的氨基酸残基，可能需要创建大量的多点突变体，以进一步确定这些关键点突变之间的组合效应。我们的 QuikChange 多点突变试剂盒为您提供了一种可以同时引进多达五个点突变的简单方法。此外，这种功能强大的多用途试剂盒还可以轻松用于饱和点突变，以及用于建立随机定点突变组合的突变体集群。

一个强大的工程突变系统

通过同时并行引入多个点突变，而不是按次序逐个引入单个点突变，我们的 QuikChange 多点突变试剂盒可以在创建多点突变体的过程中节省几天甚至几个星期的时间。该试剂盒提供了一个快速而可靠的方法，可同时在五个不同位置上对质粒 DNA 进行定点突变。同时使用三个突变引物，突变效率为 50%，而使用单个突变引物时，突变效率可达 95%（见表 1）。该试剂盒要求对每个突变点使用单条的突变引物，以双链 DNA 为模板。整个过程包括三个步骤，一天内即可完成（图 4）。

一天内创建突变体克隆群

我们的 QuikChange 多点突变试剂盒为创建突变体克隆集群提供了简单有效的方法。克隆群中包括同一位置上所有可能的替换突变（定点饱和突变），或者具体位置突变的所有可能组合，或二者兼有。

使用两个或两个以上突变引物进行多点突变时，随机地引入其中的部分突变引物还将同时产生额外的突变体。例如，同时在一个蛋白质序列中的 3 个不同位置上突变时，除了需要的三突变体产物之外，QuikChange 系统还将同时产生各种可能的单突变体和双突变体。

图 5A 演示了在 3 个酪氨酸位置上同时进行受体磷酸化的研究。虽然图中只显示了 3 种产物，但实际上所得的突变体群中共有七种不同的突变产物（一个三突变体，三个不同的双突变体和三个不同的单突变体）。可以对这些突变体群进行筛选，以找出某种所需功能的最佳突变组合。

要创建克隆群，还可以采用 QuikChange 多点突变试剂盒进行饱和突变。在蛋白质结构与功能关系的研究中，与单个氨基酸置换和易错的 PCR 方法相比，饱和突变可提供更为全面的分析。使用 QuikChange Multi 试剂盒和简并密码子引物，可以创建各种克隆的集群，其中每个克隆在一个或多个位置上包含各自不同的氨基酸置换突变。与进行多个单一 QuikChange 突变反应相比，QuikChange Multi 试剂盒能够更方便、更经济地在特定氨基酸位置引入所有可能的变化。

表 1. QuikChange 多位点定点突变系统
突变的效率和分布取决于使用突变引物的数目，设计，以及模板 DNA 的序列

同时引进多点突变的平均效率	
突变点的点数	突变的平均效率 (%)
1	91
2	91
3	58
4	60
5	30

如图 5B 所示，使用 QuikChange 多点突变试剂盒，利用一个简并密码子 (NNN) 引物对一个关键磷酸化位点（酪氨酸）进行饱和突变。本例显示通过单一反应所产生的 19 个突变体中的三种（色氨酸，谷氨酸，精氨酸）独特的突变体。如上所述，所得的突变体群可以当做一个库来筛选以鉴定活性的变化，或作为单独的克隆用于精确鉴定结构与功能的关系。另外的研究已经表明，每次 QuikChange Multi 反应的克隆数足以创建对多达三个随机密码子的具有完全代表性的文库。¹¹

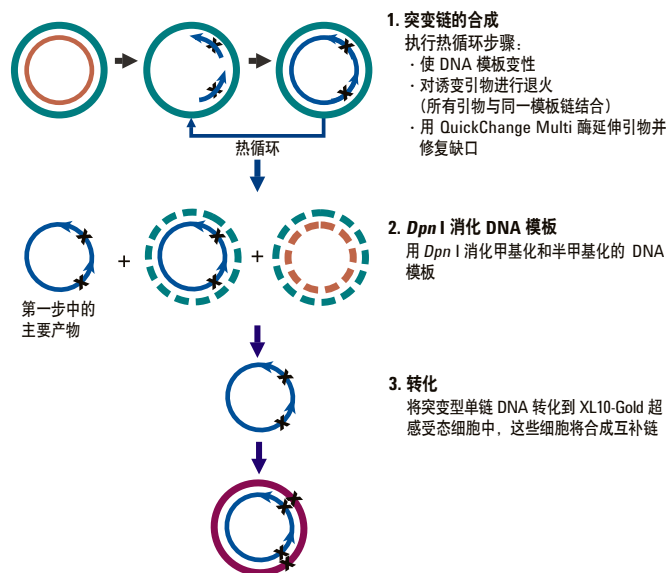
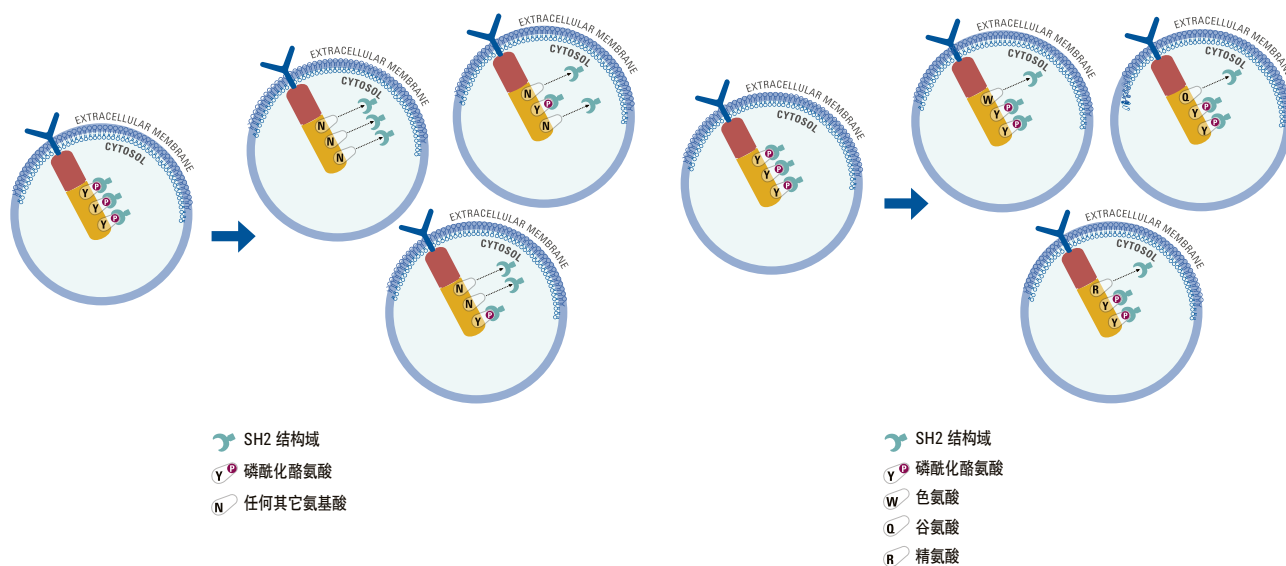


图 4. QuikChange 多点突变方法
使用 QuikChange 多点突变试剂盒可将多达五个突变引物中的突变引入到质粒 DNA 中



优于常规随机突变方法的最佳选择

随机突变往往是制作蛋白质功能结构域初级图谱的第一步。通常做法是，使用易错 PCR 使基因或基因片段发生随机突变，将带有突变的序列克隆到合适的表达载体中，然后对文库进行筛选，找出蛋白质功能发生变化的克隆。通过比较蛋白质活性的改变与氨基酸序列的变化，研究者便可以确定功能域并绘制出结构-功能关系图。我们的 GeneMorph 产品，通过为易错 PCR 和突变体文库构建方法的优化设计，从而大大简化了随机突变过程。

通过 GeneMorph II 随机突变试剂盒可获得更平衡的突变谱

GeneMorph II 随机突变试剂盒提供的说明书可简单快速地控制突变频率并确保稳定产量的方法，并且可简化克隆和文库构建过程。该试剂盒的特点是包含一种新型的酶混合物 Mutazyme® II，该酶混合物包含 Mutazyme DNA 聚合酶及错配率高于野生型的突变型 *Taq* 酶。Mutazyme II DNA 聚合酶克服了单一 PCR 聚合酶的突变偏性使突变谱更加均匀，即其中 A 和 T 位置的突变频率与 G 和 C 几乎相同（图 6）。文库构建因此更加方便，不仅如此，和使用 *Taq* 酶在易错低效条件下（如 dNTP 用量不均，含锰）下生成的文库相比，用 GeneMorph II 构建的文库更具有代表性并包含独特的突变体。

使用 GeneMorph II EZClone 结构域突变试剂盒可快速高效地创建突变体文库

GeneMorph II EZClone 结构域突变试剂盒提供了简单快速的方法，可以对长达 3.5 kb 的片段进行随机突变和无需限制性内切酶的克隆。整个过程可通过一天的操作和随后的过夜转染即可完成。

使用 GeneMorph II EZClone 结构域突变试剂盒，可以对编码整个蛋白质或某个特定结构域的质粒 DNA 序列进行随机突变，然后通过不使用限制性内切酶/连接酶的方法，用随机突变所产生的序列置换野生型序列。简单方便的 EZClone 突变方法可以迅速构建多个文库（不同的突变率或不同的蛋白质结构域），从而以前所未有的速度实现研究目标。

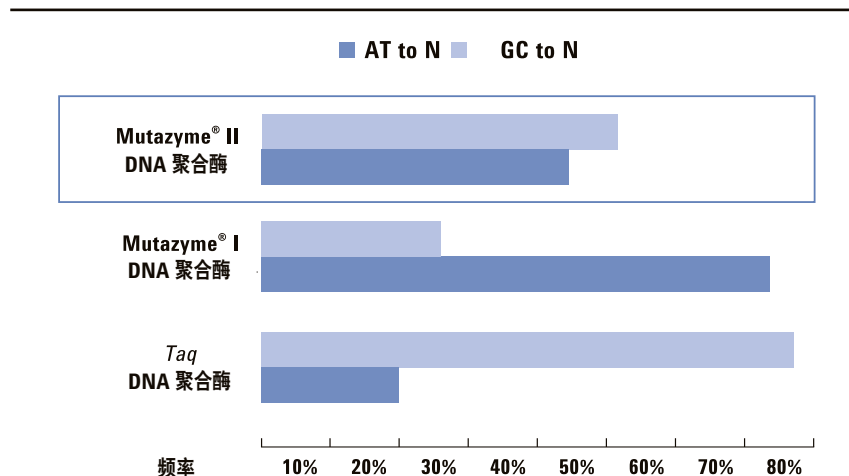


图 6. 更为平衡的突变谱
GeneMorph II 随机突变试剂盒包含 Mutazyme II DNA 聚合酶，这种酶能使 G 和 C 的突变频率与 A 和 T 几乎相同

如图 7 所示，首先使用 Mutazyme II DNA 聚合酶通过易错 PCR 对结构域序列进行扩增以引入随机突变。将纯化后的突变 PCR 产物 当作大引物用于 EZClone 反应。将这些引物变性，然后在退火条件下与原有的供体质粒结合，随后使用 EZClone 高保真 DNA 聚合酶进行延伸。几个循环之后，用 *Dpn* I 酶处理反应混合物，去除背景 DNA，然后将产物转化到感受态 *E. coli* 中。转化完成后即可通过功能分析以筛选突变体文库。

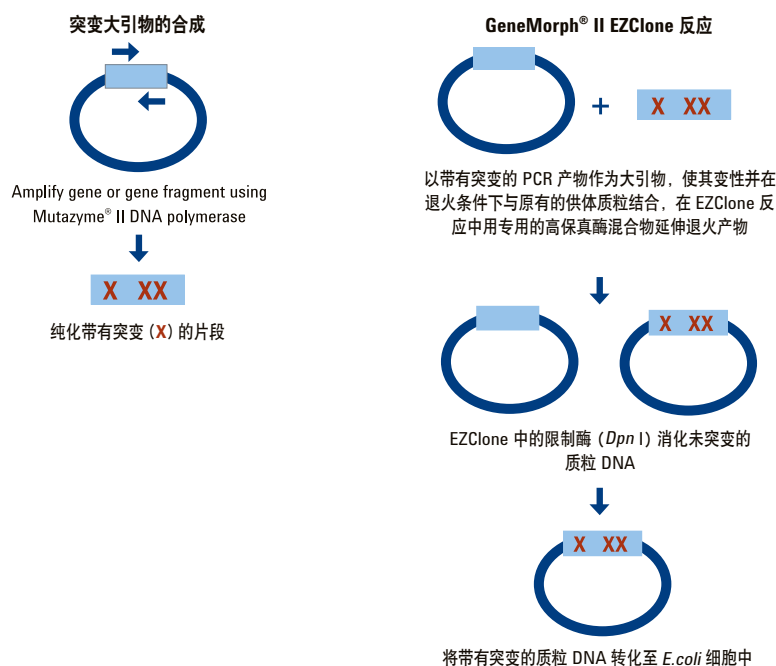


图 7. GeneMorph II EZClone 方法

本方法可在不进行亚克隆的条件下随机突变目标基因的特定区域。只需用 Mutazyme II 生成突变大引物，纯化后将产物添加到包含 EZClone 酶的下一个反应体系中。然后用 *Dpn* I 消化所有背景产物，随后即可将突变序列转化到我们提供的 XL-10 Gold 超感受态细胞中。对于大多数模板来说，该方案在 24 小时内即可完成

注释：

- a. 美国专利 Nos. 7176004、7132265、7045328、6734293、6713285、6706525、6489150、6444428、6391548、6183997、5948663、5932419、5866395、5789166、5707841、5545552、5512468 及未决专利。
- b. 美国专利 Nos. 7045328、6734293、6489150、6444428、6183997、5948663、5866395、5545552 及未决专利。
- c. 美国专利 Nos. 6706525、5512468、5707841 和未决专利及等国的外国专利。
- d. 美国专利 Nos. 7045328、6734293、6489150、6444428、6183997、5948663、5866395、5545552 未决专利。

购买者请注意：有限许可

本产品的使用受以下美国专利及美国以外对应专利权利要求的限制：5079352、5789224、5618711、6127155 以及与美国专利 No.4889818 对应的美国以外地区的专利权利要求。如果仅仅在购买者内部研究中使用购买量的本产品，则所购买产品包含的不可转让的有限许可可能提供诉讼豁免；我们并未以明示、暗示或默许的方式授予购买者任何专利权利要求（比如美国专利 Nos. 5210015 和 5487972 的权利要求中的 5' 核酸酶方法）中的任何权利、使用任何专利方法的权利、提供任何商业服务（包括但不限于为了收取费用或处于其他商业目的报告购买者研究活动的结果）的权利。本产品仅用于研究。涉及 Roche 专利的临床使用需要另外从 Roche 获得许可。要了解更多关于购买许可证的信息，请致函联系（Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA）。

- e. 美国专利 Nos. 6586249、6338965、6040184 及未决专利。
- f. 美国专利 Nos. 7176004、7132265、7045328、6734293、6489150、6444428、6391548、6183997、5948663、5932419、5866395、5789166、5545552 及未决专利。
- g. 美国专利 Nos. 6734293、6489150、6444428、6183997、5948663、5866395、5545552 及未决专利。商业单位必须获得 Stratagene 的商业许可证才能使用 QuikChange® 多位点定点突变试剂盒（目录号 200514 和 200515）。我们向商业组织销售带有有限使用许可证的 QuikChange® 多位点定点突变试剂盒（目录号 200513 和 200531）。
- h. 美国专利 Nos. 7045328、6803216、6734293、6489150、6444428、6183997、5489523 及未决专利。

参考文献：

1. Tessier, D. and Thomas, D. (1996) *Methods Molec. Bio.* 57:229-237.
2. Yu, Z., et al. (1996) *JBC* 271:8818-8823.
3. Kirsch, R.D. and Joly, E. (1998) *NAR* 26:1848-1850.
4. Papworth, C., Braman, J. and Wright, D.A. (1996) *Strategies* 9:3-4.
5. Wang, W. and Malcolm, B. (1999) *Biotechniques* 26:680-682.
6. Burke, T., et al. (1998) *Oncogene* 16:1031-1040.
7. Makarova, O., et al. (2000) *Biotechniques* 29:970-972.
8. Geiser, M., et al. (2001) *Biotechniques* 31:88-92.
9. Miyazaki, K. and Arnold, F.H. (1999) *J. Mol. Evol.* 49:716-720.
10. Hogrefe, H. (2001) *Strategies* 14(3):74-75.
11. Hogrefe, H., et al. (2002) *Biotechniques* 33:1158-1165.

更多资讯

了解更多
www.genomics.agilent.com

在线购买
www.genomics.agilent.com

安捷伦客户服务中心：
免费专线：800-820-3278
400-820-3278（手机用户）

联系我们：
customer-cn@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/quote:cn

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：
www.agilent.com/chem/
accessagilent:cn

GeneMorph®, Mutazyme®, PfuTurbo®, PfuUltra®, QuikChange® 和 XL-10 Gold® 是安捷伦科技公司子公司 Stratagene 在美国的注册商标。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2010
中国印刷，2010 年 6 月
5989-8097CHCN

订购信息

产品名称	产品数量	目录号
QuikChange Lightning 定点突变试剂盒	 10 次反应 30 次反应	210518 210519
QuikChange II 定点突变试剂盒	10 次反应 30 次反应	200523 200524
QuikChange II-E 定点突变试剂盒	10 次反应	200555
QuikChange II XL 定点突变试剂盒	10 次反应 30 次反应	200521 200522
QuikChange 多位点定点突变试剂盒		
学术机构版	10 次反应	200515
学术机构版	30 次反应	200514
商业版	10 次反应	200531
商业版	30 次反应	200513
GeneMorph II 随机突变试剂盒	30 次反应	200550
GeneMorph II EZClone 结构域突变试剂盒	10 次反应	200552

STRATAGENE

安捷伦科技公司子公司