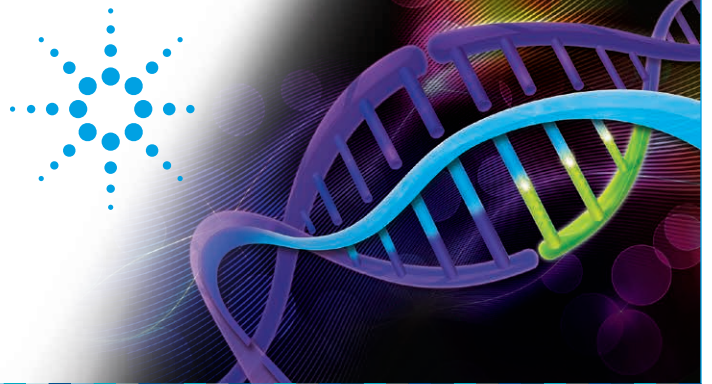


# 合成生物学

# QUIKCHANGE HT

## 蛋白质工程系统



## 节约研究时间并获取更多信息 — 只需一次实验

- 快速识别功能位点 — 整个蛋白质的点饱和突变
- 利用靶向组合突变以最少的筛选找到增强的变异体
- 靶向一种蛋白质或一类变异体

## 概述

定点突变 (SDM) 是对蛋白质进行推理性突变，并确保其具有高保真度和目标功能的首选方法。

QuikChange HT 蛋白质工程系统在功能强大的 QuikChange 技术的基础上进行了改进，新添了高保真度的定制寡核苷酸库。利用 QuikChange HT 推理设计突变体库可快速解决有关结构与功能的问题，其合理的定价使综合突变体库在多方面得到广泛的应用，例如单一氨基酸扫描、点饱和扫描和靶向组合突变。

## 两全其美

推理设计的突变体库有助于高效、全面地识别与活性或结合效率以及物理特性（如溶解性、渗透性、构象和细胞内定位）有关的蛋白质功能位点。

推理设计的突变体库通常要求具有结构信息，因此高通量的突变实验不仅成本高，而且缺乏靶向性。此外，易错 PCR (EP-PCR) 扩增并不全面，且会生成许多不必要的突变并且可能发生多位点突变，继而需要进行后续的 SDM 实验才能确认关键的突变。

安捷伦的 SurePrint 技术可用于进行高通量、高质量的寡核苷酸库合成，实现推理的单一氨基酸扫描、点饱和扫描和靶向组合突变，从而揭示结构与功能之间的关系，同时还识别改良的变异体。采用 SurePrint 技术可最大程度减少待筛选的克隆体的数量，省去合成整个基因的费用。

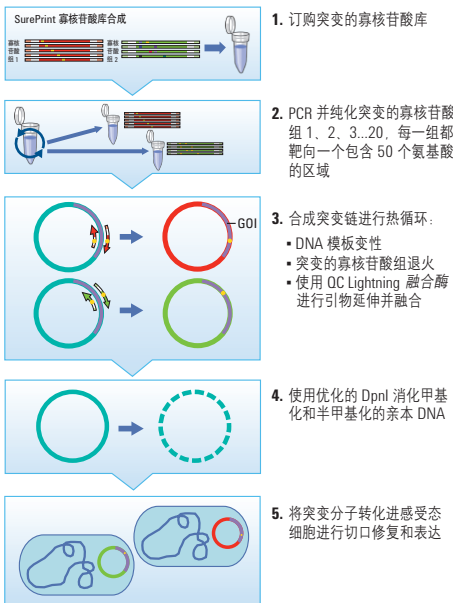


图 1. QuikChange HT 方法

## QUIKCHANGE HT 的应用

抗体工程	磷酸化位点
酶工程	蛋白质/蛋白质相互作用
蛋白质折叠和溶解性	蛋白质表达密码子优化
识别功能位点	SNP 验证



# QUIKCHANGE HT 蛋白质工程系统

## 发现更快，了解更深入

- 合理的 QC HT 设计可消除因使用简并寡核苷酸和 EP-PCR 而出现的密码子冗余和偏倚，以及非编码、野生型和非靶向的突变的出现
- 信心十足地揭示结构与功能之间的关系 — 只包含推理性突变，避免筛选大量的非功能性突变体，从而节约时间和成本
- 使用优化的密码子快速为宿主生物体构建具有增强功能的相关突变体
- 有效的筛选有助于减少测序负担。相比简并突变体 (NNX/NNN)，使用 QuikChange HT 方法获取任何给定的变异体时，所需筛选的菌落数量减少了 1.7–3.5 倍
- 全面覆盖了每一个突变，有利于加强知识产权的创造和保护

## QC HT 工作流程包括子库、QuikScan 和 QuikCombine

QuikChange HT 蛋白质工程系统使研究人员能够在一天时间内通过单组寡核苷酸准确靶向并诱变 50 个氨基酸区域内的每个密码子。其他的寡核苷酸组可以在平行反应中诱变多个不同的位点，例如相同或不同蛋白质中的其他 50 个氨基酸区域。

研究人员可以免费访问突变工作区软件用户界面，设计含有 1000 个到最多

120000 个用户指定序列的大型突变库。该文库可包含许多靶向单一蛋白质或多种蛋白质的不同区域的寡核苷酸组（多达 20 个）。各寡核苷酸组对应一段同源的 DNA 序列，可与相同的基因片段杂交，并且序列中存在一个或最多四个密码子的差异。各个 DNA 序列都含有完全互补的两端，用于对寡核苷酸组进行 PCR 扩增。每个突变库均针对各个实验进行定制，研究人员获得突变库后即可在一天时间内生成已转化的感受态细胞库。

	QuikChange HT	QuikChange + 简并寡核苷酸	GeneMorph II
方法	定点突变	定点突变	随机突变
需要结构信息	否	是	否
提供结构信息	是	是	否
覆盖率（预期突变）	95–100%	60–100%	10–50%
文库大小/待筛选的克隆数量（均等表达低丰度密码子）	1x	1.7–3.5x	100x
一体化操作	是	否	否
成本	\$\$	\$\$\$	\$

图 2. QuikChange HT 突变方法的比较

使用高性能的 QuikChange Lightning 可在几乎所有的双链质粒内进行定点突变，从而避免进行亚克隆以及 ssDNA 拯救，实现最高保真度的 DNA 合成以及大于 80% 高效转化。

突变方法：eArray (agilent.com/genomics/earray) 中免费使用的 QC HT 突变工作区软件可帮助您轻松设计复杂的寡核苷酸库。构建 1–20、15–50 个氨基酸区域以覆盖整个蛋白质或选定的区段。每个突变区域选取三种突变方法中的一种生成寡核苷酸组，混合单个蛋白质或蛋白质家族的寡核苷酸组，从而生成最多含有 120000 个突变体的文库。

## 验证：GFP 密码子饱和扫描

为了验证推理性设计的突变库的性能，设计了点饱和实验，以揭示众所周知和高度优化的增强型 GFP 的单氨基酸变异体。通过单个实验识别出 40 个单点突变，每个突变体的亮度都比增强型 GFP 高，其中 15 个比超高亮型 Vitality hrGFP II 还要亮。

有趣的是，这 15 个超亮的变异体经确定在两个不能直接形成发色团的区段内发生了突变，从而为后续的组合突变确定了目标区域。

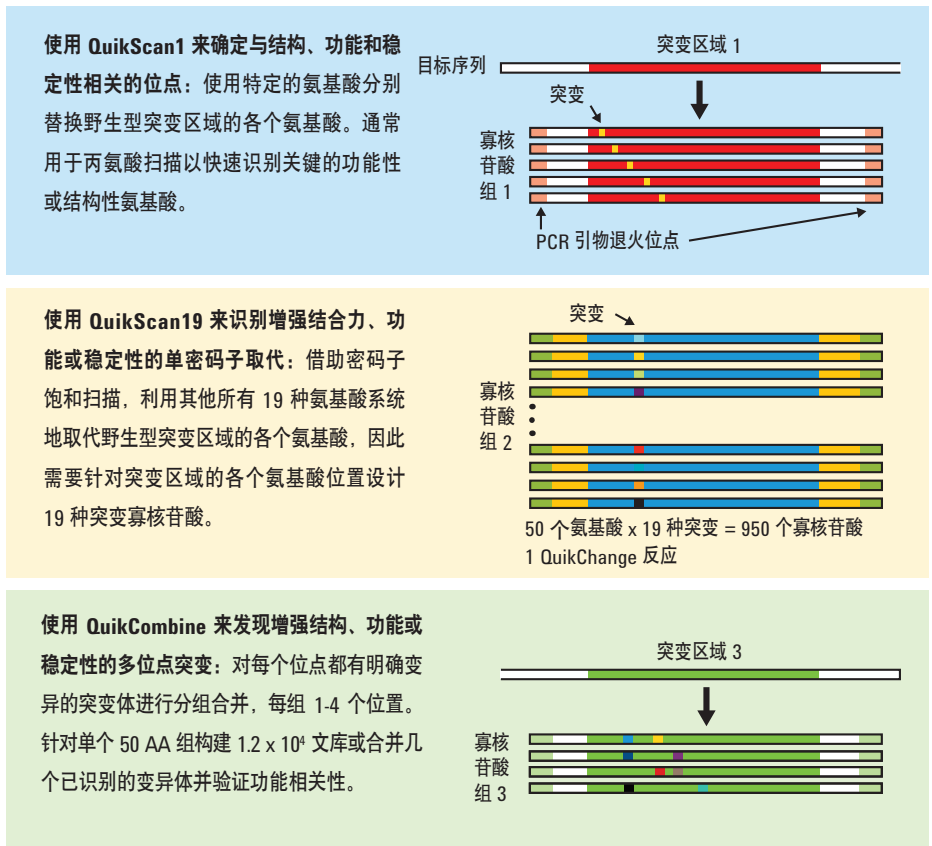
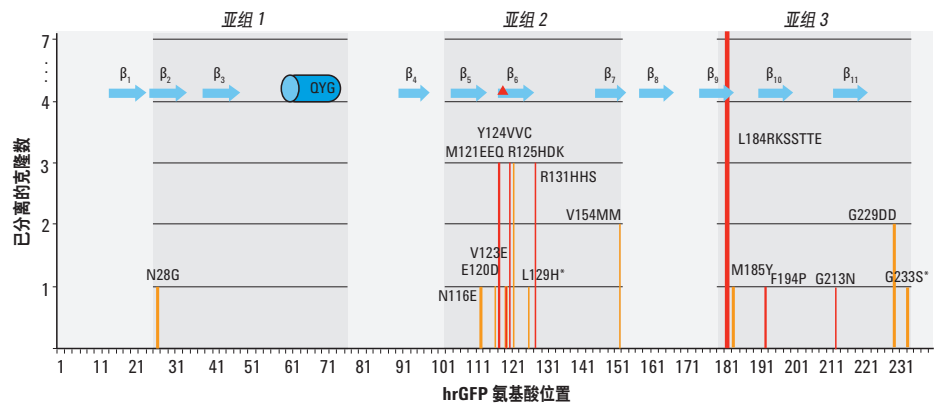


图 3. QC HT 方法



	GFP 组 1 N-端 (发色团)	GFP 组 2 中间	GFP 组 3 C-端
子库大小	7,800	14,000	8,900
筛选的克隆数	13,200	25,000	15,400
荧光的克隆百分比	0.5%	5.9%	7.7%
亮度比 hrGFP/hrGFP II 高的阳性突变体数 (大肠杆菌)	1/0	14/8	10/7

图 4. GFP 的密码子饱和扫描。GFP 的结构对修饰非常敏感，从只有少量的突变体保留荧光可以说明这一点。 $\beta$ -桶状结构的构象对于蛋白质的取向、成熟和发色团发出的荧光具有重要影响。其他的酶（例如  $\beta$ -半乳糖苷酶）则表现出更高的突变耐受性



# QUIKCHANGE HT 蛋白质工程系统

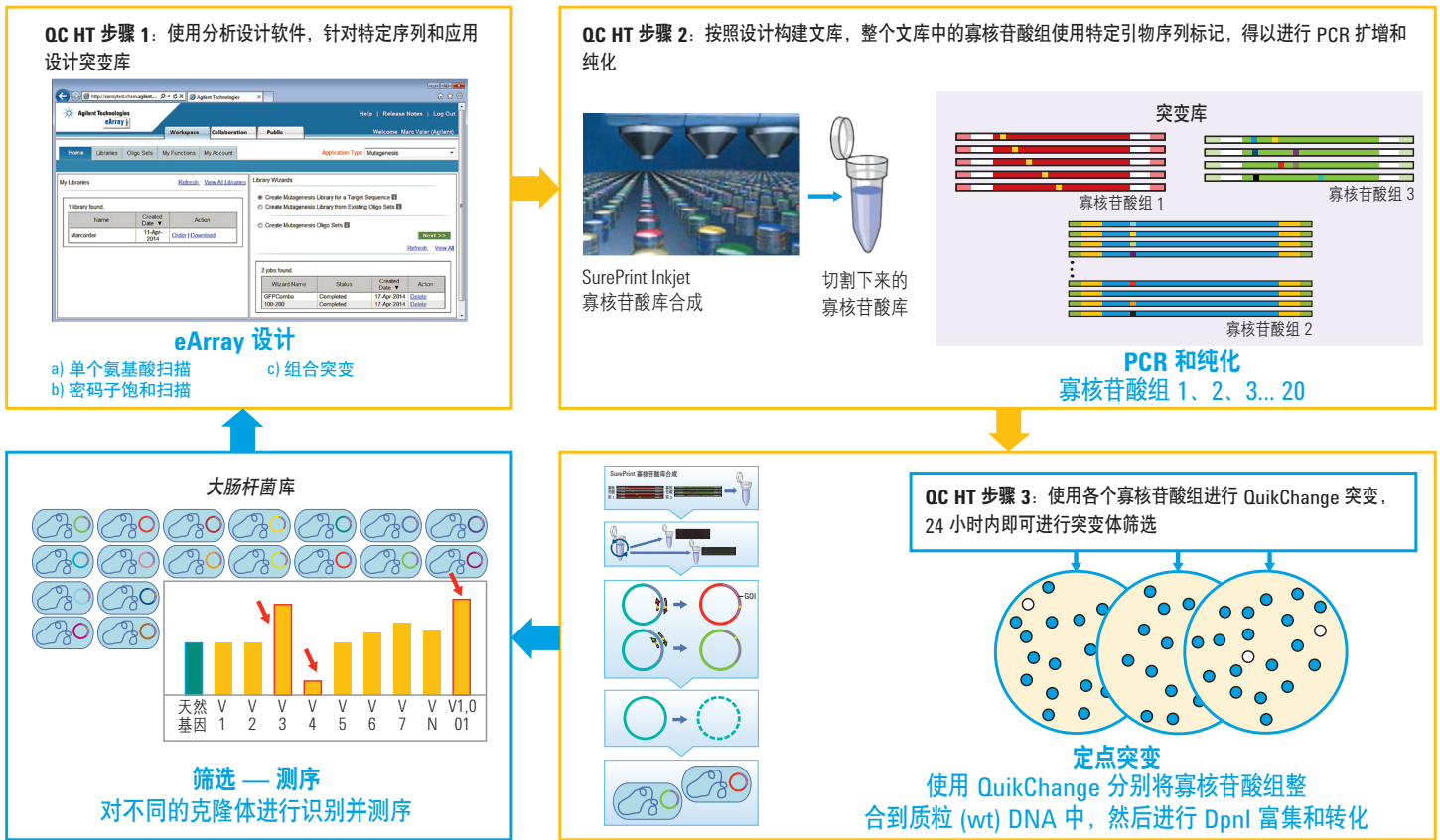


图 5. 简单的 QuikChange HT 工作流程

## QC HT 产品订购和结构

QuikChange HT 蛋白质工程系统满足您构建突变体库的一切所需, 包括多达 120000 个致突变的寡核苷酸、寡核苷酸扩增引物和试剂、QuikChange 酶和试剂, 以及 SoloPack Gold 超级感受态细胞。

应用范围	描述	部件号
商业	QuikChange HT 蛋白质工程系统 150nt, 10 个位点	G5900A
	QuikChange HT 蛋白质工程系统 150nt, 20 个位点	G5900B
	QuikChange HT 蛋白质工程系统 200nt, 10 个位点	G5901A
	QuikChange HT 蛋白质工程系统 200nt, 20 个位点	G5901B
科研	G5902A QuikChange HT 蛋白质工程系统 150nt, 科研型, 10 个位点	G5902A
	G5902B QuikChange HT 蛋白质工程系统 150nt, 科研型, 20 个位点	G5902B
	G5903A QuikChange HT 蛋白质工程系统 200nt, 科研型, 10 个位点	G5903A
	G5903B QuikChange HT 蛋白质工程系统 200nt, 科研型, 20 个位点	G5903B

图 6. 订购部件号

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

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus:cn](http://www.agilent.com/chem/contactus:cn)

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2014

2014 年 6 月 12 日, 中国印刷

5991-4691CHCN

看得更深, 走得更远



Agilent Technologies | Genomics