

QuikChange HT Protein Engineering System eArrayによる変異導入ライブラリー作成・見積もり方法

QuikChange HT Protein Engineering System をご購入される際、eArrayの設計作業をご利用いただくこととなります。

本資料ではカスタムデザインオリゴDNAライブラリーの設計方法をご紹介します。

eArrayを用いて、ライブラリーの設計と見積もりを行うことができます。この資料で一連の手順についてご説明します。

予告なくwebのアップデートを行う場合があります。そのため、本資料と画面が異なる場合は、ご了承頂けます様、お願いします。

2014年12月25日作成

目次

用語と定義 P3

Mutagenesis Library siteへのアクセス方法 P5

1. Define Library P7
2. Input Target Sequence P9
3. Primer Details P14
4. Define Mutation P17
5. Layout Oligo Sets P28
6. Create Library P29

QuikChange HT Protein Engineering Systemの購入方法 p32

補足情報 P36

補足 1 ; Libraryに含まれるOligo Setの情報を確認する方法

補足 2 ; 各Oligo Setのプライマー配列をチェックする方法

お問い合わせ先 P41

Define Library
Input Target Sequence
Primer Details
Define Mutation
Layout Oligo Sets
Create Library



用語と定義

- Library

Oligo setの集合体。作成したLibraryに対して Design ID/Mutagenesis Library ID (MLID)が付与されます。

- Oligo set

1つの領域（最大50アミノ酸残基）に対する変異オリゴの集合体。1つのLibraryを構成するOligo setの数は最大で20になります。

（Sublibraryと表記されることがあります）

- Primer

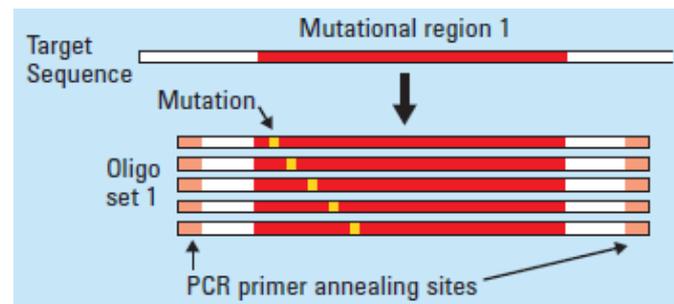
各Oligo setをPCRで増幅するために使用する配列。

- Target Sequence

変異導入したいタンパク質のcDNA塩基配列。

Library

- Oligo set 1



- Oligo set 2

- Oligo set 3

- Oligo set 4

•

•

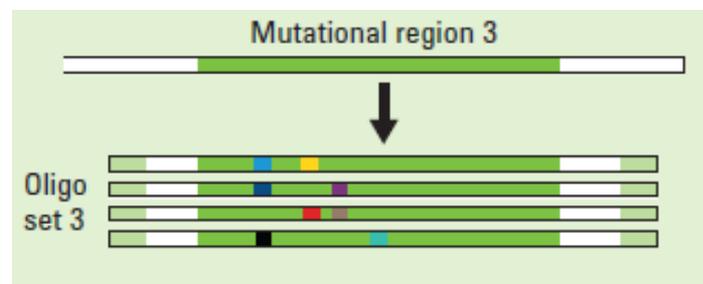
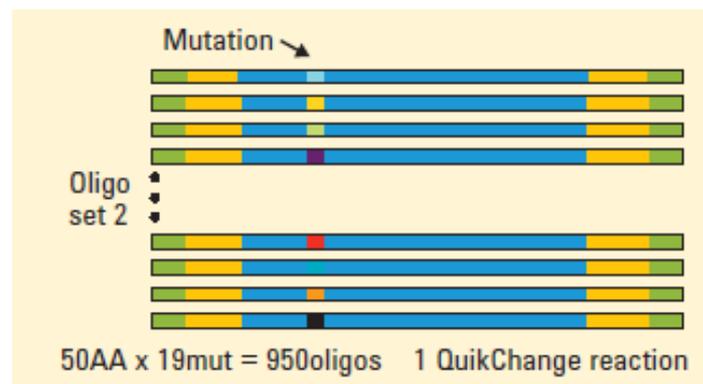
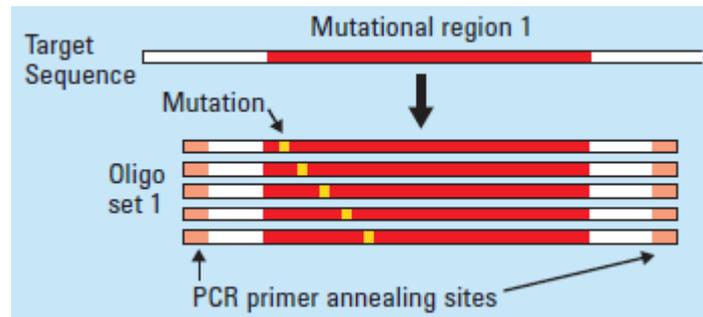
•

- Oligo set 20

用語と定義

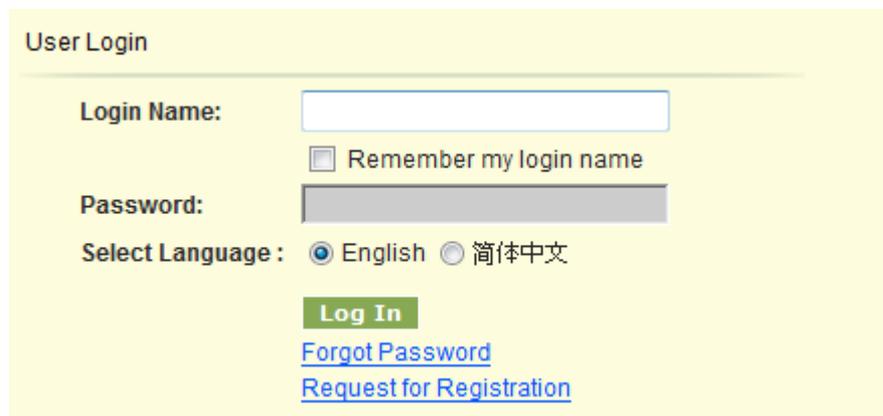
3つの変異導入メソッド

- **Single AA Scanning (QuikScan1)**
変異を導入したい領域の各アミノ酸残基を特定の1種類のアミノ酸に順次置換。
例：アラニンスキャンング
- **Site Saturation Scanning (QuikScan19)**
変異を導入したい領域の対象アミノ酸残基を他の別の19個のアミノ酸と置換。
- **Combinational Mutagenesis (QuikCombine)**
1つの領域（最大50アミノ酸残基）内で、最大4カ所のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換し、それぞれの置換したアミノ酸と組み合わせる。



Mutagenesis Library siteへのアクセス方法：ログイン

- eArray site: <https://earray.chem.agilent.com/earray/>にアクセスして、Login Name, Passwordを入力してアクセスします。



The screenshot shows a 'User Login' form with the following elements:

- Login Name:** A text input field.
- Remember my login name
- Password:** A password input field.
- Select Language:** Radio buttons for English and 简体中文.
- Log In** button (green).
- [Forgot Password](#) link (blue).
- [Request for Registration](#) link (blue).

- eArrayのご登録をされていない場合は、以下のサイトをご参照のうえ、ご登録をお願いします。eArrayの概要も以下のサイトに掲載されています。

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=29443>

Mutagenesis Library siteへのアクセス方法：アプリケーション選択

- eArrayにアクセスして、右上のApplication typeからMutagenesisを選択します。
- ターゲットタンパクの遺伝子配列を入力するために、Create Mutagenesis Libraries for a Target Sequenceを選択します。
- NEXTをクリック

Application Type: Mutagenesis

Library Wizards

- Create Mutagenesis Library for a Target Sequence
- Create Mutagenesis Library from Existing Oligo Sets
- Create Mutagenesis Oligo Sets

Next >>

[Refresh](#) [View All](#)

3 jobs found.

Wizard Name	Status	Created Date	Action
20140325tedt2	Incomplete	25-Mar-2014	Continue Delete
20140325test	Incomplete	24-Mar-2014	Continue Delete

Supported Browsers: IE 8.0+ and Mozilla Firefox 23.0+

- Create Mutagenesis Library from Existing Oligo setsと Create Mutagenesis Oligo setsは、複数のターゲットを1つのLibraryで作成する場合に用います。別途、お問い合わせください。

Define Library : ライブラリ名の入力

- Library nameを入力します（使えるのはアルファベット、数字、ハイフンのみ）。

Create Mutagenesis Library [Help](#)

Define Library	Library Name: <input type="text" value="hrGFP20140729"/>
Input Target Sequence	Library Description: <input type="text"/>
Primer Details	Comment: <input type="text"/>
Define Mutation	
Layout Oligo Sets	
Create Library	

Please review and Accept to proceed:
QuickChange mutagenesis libraries might not amplify correctly when there are repeat sequences in PCR primer binding sites. The user acknowledges that selecting PCR Primer binding sites with repeat elements can induce failure of the sub-library amplification. The amplification failure may be possibly corrected with optimized PCR conditions, but Agilent may not be able to accept library returns related to failed amplifications when the Primer binding sites contain repeat elements.

Define Library : 注意点

- 以下の赤字に記載した内容に同意いただいた上で次のステップにお進みください。

注意事項

QuikChange Mutagenesis librariesは、PCRプライマーの結合部位にリピート配列があると、正確に増幅できないことがあります。リピート配列に結合部位のあるPCRプライマーを選択することはできますが、sub librariesの増幅の失敗を増長する可能性があることをご了承ください。PCRの増幅条件を最適化することで、増幅の失敗を改善することが可能ですが、アジレント・テクノロジー社では、リピート配列等に結合部位をもつPCRプライマーでの増幅による失敗に関わるlibraryの返品をお受け致しかねます。

Please review and Accept to proceed:

QuickChange mutagenesis libraries might not amplify correctly when there are repeat sequences in PCR primer binding sites. The user acknowledges that selecting PCR Primer binding sites with repeat elements can induce failure of the sub-library amplification. The amplification failure may be possibly corrected with optimized PCR conditions, but Agilent may not be able to accept library returns related to failed amplifications when the Primer binding sites contain repeat elements.

- 右下のNextをクリックします。

Input Target Sequence : cDNA配列の入力

- Sequence Nameを入力します。
- Sequenceを入力（入力範囲は110 bp- 5 kbp）。最初の30塩基と最後の30塩基はPCR primerの候補になりますので、変異を入れることができません。開始コドンまたは終始コドン付近に変異を入れたい場合は、開始コドンまたは終始コドンから30塩基以上を追加して入力してください。遺伝子配列以外の文字（例：数字）があると、無効になりますので、注意してください。
- Reading Frameを1-3から選択します。選択方法は以下の通りです。
 - 1：開始コドン(ATG)のAが1番目か3の倍数に1を足した位置にあるとき
 - 2：開始コドン(ATG)のAが2番目か3の倍数に2を足した位置にあるとき
 - 3：開始コドン(ATG)のAが3の倍数の位置にあるとき
- 遺伝子配列情報がFASTA fileの場合、Uploadをクリックして、FASTA fileを読み込みます。

Create Mutagenesis Library [Help](#)

Define Library

Input Target Sequence

Primer Details

Define Mutation

Layout Oligo Sets

Create Library

Input Target Sequence

Sequence Name: hrGFP Reading Frame: 1

Enter the Target Sequence Below:

```
CCGAAGAAGGATCCAAGGAGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCG
CACCATGGTGAGCAAGCAGATCCTGAAGAACACCGCCCTGCAGGAGATCATGA
GCTTCAAGGTGAACCTGGAGGGCGTGGTGAACAACACGTGTTCAACATGGA
GGGCTGCGGCAAGGGCAACATCCTGTTCCGCAACACAGCTGGTGACATCCG
CGTGACCAAGGGCGCCCCCTGCCCTTCGCCTTCGACATCCTGAGCCCCG
CCTTCAGTACGGCAACCGCACCTTACCAAGTACCCGAGGACATCAGCGA
CTTCTTCATCCAGAGCTTCCC CGCGGCTTCGTGTACGAGCGCACCCCTGCG
CTACGAGGACGGCGCCTGGTGAGATCCGCAAGGACATCAACCTGATCGA
GGGATGTTCTGTACCGGCTGGAGTACAAGGGCGGCAACTTCCC AAGGAC
GGCCCCGTGATGAAG1201AAGACCATCACCGGCCCTGCAGCCAGCTTCGAG
CTCCTGTATATCAAGGACGGCCCTGCTGCTGCGGCAACCTGATCTGCTTAC
```

Define Mutational Regions

Region:

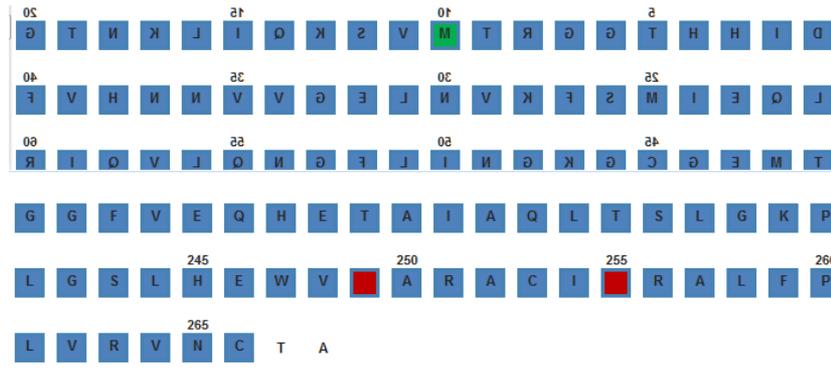
Mutational Region

No Mutational Region to show

- Translateをクリックします。

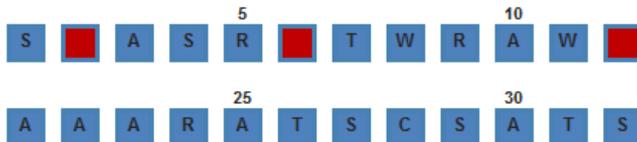
Input Target Sequence : Translate結果の確認

- Translateされたアミノ酸配列が表示。開始コドンは緑、終止コドンは赤で表示されます。



注意：アミノ酸配列情報が正しく表示されない場合

遺伝子配列の入力の時、開始コドンが正しく認識されていないと、下記のような正しいアミノ酸配列が表示されなくなります。



このときは、Reading frameの数字を変更して、開始コドンが選ばれるようにしてください。

Input Target Sequence : 変異導入部位の範囲指定

- 変異を入れたいアミノ酸の範囲をRegionのカラムに入力します。アミノ酸の範囲は最小で17アミノ酸が必要です。Createをクリックします。アミノ酸配列の区切りは17-50になります。
- 変異を入れたい複数のアミノ酸範囲が離れているとき、上記の操作を繰り返します。
- Mutational Regionをクリックします。
- 右下のNEXTをクリックします。

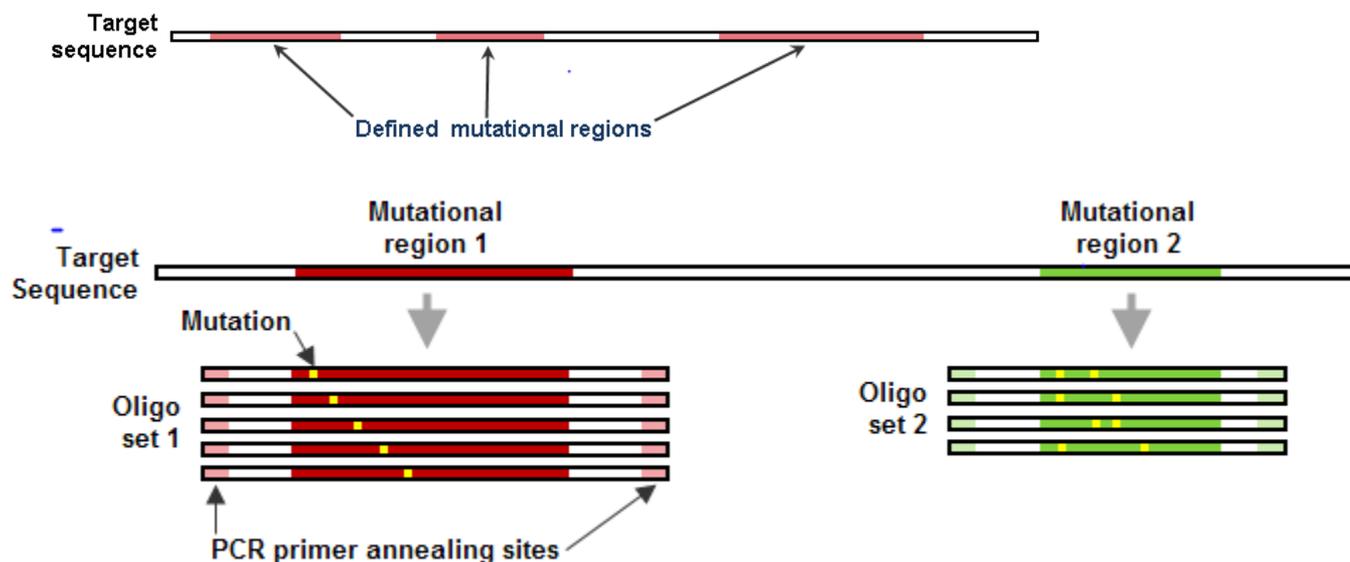
注意

Mutagen Regionのアミノ酸範囲が25付近で価格が変わります
(次ページ参照)。

The screenshot shows a web interface for defining mutational regions in a protein sequence. The interface is divided into several sections:

- Input Target Sequence:** A form where the sequence name is "hrGFP" and the reading frame is set to 1. A text area contains the target sequence: "GATATCCATCACACTGGCGGCCGCCACCATGGTGGAGCAAGCAGATCCTGAAGAAACACCCAGTGTTCACCATGGAGGCGTCCGGCAAGGGCAACATCCTGTTCGGCAACCCAGCTGGTGCAGATCCGCGTGACCAAGGGCGCCGCCCTGCCCCTCGCCTTCGACATCCTGAGCCCGCCTCCAGTACGGCAACCGCACCTTACCAGGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTCATCCAGAGCTTCCCGCCGCGCTTGTTACGAGCGCACCCCTGCGCTACGAGGACGGCGCCTGGTGGAGATCCCGAGCGACATCAACCTGATCGAGGGGATGTTCTGTACCGCGTGGAGTACAAGGGCCGCAACTTCCCAACGACGGCCCGTGTGAAGAAGACCATCACCGGCCGTCAGCCAGCTTCGAGGTGGTGTACATGAACGACGGCGTGGTGGTGGCCACCTCATCCTCCTGACCCCTCAACAGCCGCAACTTGTACAGCTCCACAT".
- Define Mutational Regions:** A panel where a region is defined. The "Region:" field is empty. A "Create" button is visible. Below, a list of "Mutational Region" entries is shown: "hrGFP_90-200" (checked), "hrGFP_90-126", "hrGFP_127-163", and "hrGFP_164-200".
- Translated Amino Acid Sequence:** A grid showing the translated amino acid sequence for "hrGFP". The sequence is: D I H H T G G R T M V S K Q I L K N T G L Q E I M S F K V N L E G V V N N H V F T M E G C G K G N I L F G N Q L V Q I R. The amino acid at position 10, Methionine (M), is highlighted in green.
- Download Translated Amino Acid Sequence:** A link to download the sequence.
- Search:** A search bar with "AA Sequence" selected and "Clear" and "Find" buttons.

Input Target Sequence : 参考



スキャンニングの範囲が25アミノ酸付近を超えると、変異導入オリゴ長は200 ntに設定されることがあります。

コンビナトリアル変異の範囲が25アミノ酸程度で、変異導入オリゴ長は150 ntまでに設定されることが多いです。

注意

- Oligo setのオリゴDNAの長さが101-150 ntまでと、151-200 ntでは価格が異なります。
- 150 ntのoligo setと200 ntのoligo setが同一のLibraryにあるときは、200 ntの価格設定が適用されます。
- すべてのOligo setでオリゴDNAの長さを101-150 ntの長さに揃えるためには、各Mutational regionsのアミノ酸範囲を25アミノ酸程度に個別で設定する必要があります。
- 25アミノ酸程度でもオリゴDNAの長さが150ntを超える場合は、アミノ酸を減らして調節する必要があります。
- オリゴDNAの長さは、次ページで紹介するPrimer Detailsの画面で確認することができます。

Input Target Sequence : 参考

オリゴDNAの長さを確認する方法

Primer Details 						
Mutational Region	Primer Pair Sequence	Length	Tm	%GC	Homopolymer Run	Primer Location
LacZ_11-35	5' GTCGTTTACTTTGACCAACAAGAACGTG	28	59.18	42.86	No	3-30
	3' GGTTCCTCCAGTCACGACGTTG	22	58.42	54.55	No	106-127
LacZ_40-64	5' CCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC	23	58.89	52.17	No	95-117
	3' CAACTGTTGGGAAGGGCGATCG	22	60.3	59.09	No	204-225
LacZ_70-94	5' CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG	22	58.05	54.55	No	174-195
	3' GATCGCACTCCAGCCAGCTTTC	22	60.62	59.09	No	283-304
LacZ_100-124	5' GAATGGCGCTTTGCCTGGTTTC	22	59.99	54.55	No	241-262
	3' CCGTAATGGGATAGGTCACGTTGG	24	59	54.17	No	374-397
LacZ_130-154	5' CGATGCGCCCATCTACACCAAC	22	60.55	59.09	No	357-378
	3' GGCCTTCCTGTAGCCAGCTTTC	22	59.98	59.09	No	463-484
LacZ_160-184	5' CGGGTTGTTACTCGCTCACATTAATG	27	58.78	44.44	No	431-457
	3' CAGACGGCAAACGACTGTCCTG	22	60.24	59.09	No	559-580
LacZ_190-214	5' GTTTCATCTGTGGTGCAACGGG	22	58.85	54.55	No	519-540
	3' CTTCCAGATAACTGCCGTCCTCC	24	59.06	54.17	No	644-667
LacZ_220-244	5' GTGATGGTGCTGCGTTGGAGTG	22	60.93	59.09	No	628-649
	3' GTGGCAACATGGAATCGCTGATTTG	26	59.96	46.15	No	733-758
LacZ_250-274	5' GCATAAACCGACTACACAAATCAGCG	26	59.11	46.15	No	717-742
	3' GAAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACG	26	58.77	50	No	823-848
LacZ_280-304	5' GGCGAGTTGCGTGAACCTAC	22	59.68	59.09	No	814-835
	3' GATCGGCATAACCACCACGCTC	22	60.3	59.09	No	913-934
LacZ_310-334	5' GTGAAATTATCGATGAGCGTGTTGG	25	58.51	48	No	899-923
	3' CTGCTTCAATCAGCGTGCCGTC	22	61.41	59.09	No	1027-1048

Primer Locationの一番大きい数字から一番小さい数字を引いた後に1を足した数がオリゴDNAの長さになります。

例 : LacZ_40-64のオリゴDNAの長さ $225 - 95 + 1 = 131$

Input Target Sequence : 変異導入部位の範囲指定時の注意点

- 最初と最後の10アミノ酸配列は、Oligo setをPCRで増幅するときのprimer配列になりますので、選択することができません。もし選択すると、以下のようなエラーが表示されます。

Mutational regions must not overlap the first 10 amino acid of the translated target sequence.

- アミノ酸の範囲を2つ以上に分けて入力する場合（例：50-150, 180-230）、選択するアミノ酸範囲が重複しないようにしてください（例：50-150, 140-200は入力できません）。もし重複している場合は、以下のエラーが表示されます。

Entered mutational region cannot overlap an existing mutational region.

- 選択したアミノ酸の範囲に終始コドンが含まれていると、以下のような確認の文章が表示されます。終始コドンに変異をいれたくないときは、選択する範囲を変更するようにお願いします。

The mutational region that you want to create contains one or more stop codons.

If you will try to mutate the region, the stop codon will also get replaced.

Do you want to continue ?

Primer Details : Oligo setのPrimer情報の表示

- 変異を入れる領域に対するOligo setのPrimerの情報が出力されます。
- 赤字のものはPrimerの取り扱いに注意が必要なものです。primerがdimerになる可能性がある、primerがhairpin構造をとる可能性があるとき等に、Mutational Regionの表示が赤くなります。
- 赤字が出力されたときは、下にあるBackをクリックして、選択するアミノ酸の範囲を3アミノ酸以上シフトさせて領域を変更させるなどお試しください（次ページ以降をご参照ください）。

Create Mutagenesis Library [Help](#)

Define Library	Primer Details																																																							
Input Target Sequence	<table border="1"><thead><tr><th>Mutational Region</th><th>Primer Pair Sequence</th><th>Length</th><th>Tm</th><th>%GC</th><th>Homopolymer Run</th><th>Primer Location</th></tr></thead><tbody><tr><td rowspan="2">hrGFP_90-126</td><td>5' GCAACCGCACCTTCACCAAGTAC</td><td>23</td><td>60.84</td><td>56.52</td><td>No</td><td>242-264</td></tr><tr><td>3' CTCCACGCGGTACACGAACATC</td><td>22</td><td>60.11</td><td>59.09</td><td>No</td><td>387-408</td></tr><tr><td rowspan="2">hrGFP_127-163</td><td>5' GATCCGCAGCGACATCAACCTG</td><td>22</td><td>60.55</td><td>59.09</td><td>No</td><td>357-378</td></tr><tr><td>3' GTTCAGGCGGTACACCAGGATCAC</td><td>24</td><td>61.28</td><td>58.33</td><td>No</td><td>520-543</td></tr><tr><td rowspan="2">Define Mutation</td><td>1. 3' primer has potential to form hairpin</td><td>22</td><td>59.47</td><td>59.09</td><td>No</td><td>447-468</td></tr><tr><td>2. 3' primer has potential to form dimer</td><td>22</td><td>58.18</td><td>59.09</td><td>No</td><td>603-624</td></tr><tr><td>Layout Oligo Sets</td><td>1. 5' primer has potential to form dimer</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Create Library</td><td></td></tr></tbody></table>	Mutational Region	Primer Pair Sequence	Length	Tm	%GC	Homopolymer Run	Primer Location	hrGFP_90-126	5' GCAACCGCACCTTCACCAAGTAC	23	60.84	56.52	No	242-264	3' CTCCACGCGGTACACGAACATC	22	60.11	59.09	No	387-408	hrGFP_127-163	5' GATCCGCAGCGACATCAACCTG	22	60.55	59.09	No	357-378	3' GTTCAGGCGGTACACCAGGATCAC	24	61.28	58.33	No	520-543	Define Mutation	1. 3' primer has potential to form hairpin	22	59.47	59.09	No	447-468	2. 3' primer has potential to form dimer	22	58.18	59.09	No	603-624	Layout Oligo Sets	1. 5' primer has potential to form dimer						Create Library	
Mutational Region	Primer Pair Sequence	Length	Tm	%GC	Homopolymer Run	Primer Location																																																		
hrGFP_90-126	5' GCAACCGCACCTTCACCAAGTAC	23	60.84	56.52	No	242-264																																																		
	3' CTCCACGCGGTACACGAACATC	22	60.11	59.09	No	387-408																																																		
hrGFP_127-163	5' GATCCGCAGCGACATCAACCTG	22	60.55	59.09	No	357-378																																																		
	3' GTTCAGGCGGTACACCAGGATCAC	24	61.28	58.33	No	520-543																																																		
Define Mutation	1. 3' primer has potential to form hairpin	22	59.47	59.09	No	447-468																																																		
	2. 3' primer has potential to form dimer	22	58.18	59.09	No	603-624																																																		
Layout Oligo Sets	1. 5' primer has potential to form dimer																																																							
Create Library																																																								

赤字の上にカーソルを置くと、注意事項が表示されます。

Primer Details : 変異導入部位の範囲の修正

赤字が出力されたときの修正例

Input Target Sequence

Sequence Name: Reading Frame:

Enter the Target Sequence Below:

```
GATATCCATCACACTGGCGGCCGCACCATGGTGAGCAAGCAGATCCTGAAGAA
CACCGGCCTGCAGGAGATCATGAGCTTCAAGGTGAACCTGGAGGGCGTGGTG
AACCAACCACGTGTTCACCATGGAGGGCTGCGGCAAGGGCAACATCCTGTTCCG
GCAACCAGCTGGTGCAGATCCGCGTGACCAAGGGCGCCCCCTGCCCTTCG
CCTTCGACATCCTGAGCCCCGCCTTCCAGTACGGCAACCGCACCTTCACCAA
GTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTCATCCAGAGCTTCCCCGCCGGCTTC
GTGTACGAGCGCACCCCTGCGCTACGAGGACGGCGGCCTGGTGGAGATCCGC
AGCGACATCAACCTGATCGAGGGGATGTTTCGTGTACCGCGTGGAGTACAAGG
GCCGCAACTTCCCCAACGACGGCCCCGTGATGAAGAAGACCATCACCGGCC
TGCAGCCCAGCTTCGAGGTGGTGTACATGAACGACGGCGTGCTGGTGGGCC
ACCTCATCCTCCTTACCCCTCAACACCCCAACTTCTACACCTCCACAT
```

Define Mutational Regions

Region:

Mutational Region

- hrGFP_90-200
 - hrGFP_90-126
 - hrGFP_127-163
 - hrGFP_164-200

- Mutation Regionのチェックボックスを選択して、Deleteをクリックします。Mutational Regionが消去されます。
- Regionのカラムに修正したアミノ酸の範囲を入力します（アミノ酸配列の開始または終了の位置を3アミノ酸以上シフトさせて領域を変更させるなど）。
- Createをクリックすると、デザインする配列が表示されます。
- 下にあるNextをクリックします。

Primer Details : 変異導入部位の範囲の修正 (つづき)

赤字が出力されたときの修正例

Create Mutagenesis Library Help																																															
Define Library	Primer Details																																														
Input Target Sequence	<table border="1"><thead><tr><th>Mutational Region</th><th>Primer Pair Sequence</th><th>Length</th><th>Tm</th><th>%GC</th><th>Homopolymer Run</th><th>Primer Location</th></tr></thead><tbody><tr><td rowspan="2">hrGFP_84-122</td><td>5' CTTGCGCCTTCGACATCCTGAGC</td><td>22</td><td>59.99</td><td>59.09</td><td>No</td><td>204-225</td></tr><tr><td>3' CATCCCCTCGATCAGGTTGATGTC</td><td>24</td><td>58.76</td><td>54.17</td><td>No</td><td>367-390</td></tr><tr><td rowspan="2">hrGFP_123-161</td><td>5' TTCGTGTACGAGCGCACCCCTG</td><td>21</td><td>61.81</td><td>61.9</td><td>No</td><td>310-330</td></tr><tr><td>3' GCCGTCGTTTCATGTACACCAC</td><td>21</td><td>58.36</td><td>57.14</td><td>No</td><td>484-504</td></tr><tr><td rowspan="2">hrGFP_162-200</td><td>5' GAAGAAGACCATCACCGGCCTG</td><td>22</td><td>59.47</td><td>59.09</td><td>No</td><td>447-468</td></tr><tr><td>3' GAAGTGGTACTCGGGGAAGTCC</td><td>22</td><td>58.18</td><td>59.09</td><td>No</td><td>603-624</td></tr></tbody></table>	Mutational Region	Primer Pair Sequence	Length	Tm	%GC	Homopolymer Run	Primer Location	hrGFP_84-122	5' CTTGCGCCTTCGACATCCTGAGC	22	59.99	59.09	No	204-225	3' CATCCCCTCGATCAGGTTGATGTC	24	58.76	54.17	No	367-390	hrGFP_123-161	5' TTCGTGTACGAGCGCACCCCTG	21	61.81	61.9	No	310-330	3' GCCGTCGTTTCATGTACACCAC	21	58.36	57.14	No	484-504	hrGFP_162-200	5' GAAGAAGACCATCACCGGCCTG	22	59.47	59.09	No	447-468	3' GAAGTGGTACTCGGGGAAGTCC	22	58.18	59.09	No	603-624
Mutational Region	Primer Pair Sequence	Length	Tm	%GC	Homopolymer Run	Primer Location																																									
hrGFP_84-122	5' CTTGCGCCTTCGACATCCTGAGC	22	59.99	59.09	No	204-225																																									
	3' CATCCCCTCGATCAGGTTGATGTC	24	58.76	54.17	No	367-390																																									
hrGFP_123-161	5' TTCGTGTACGAGCGCACCCCTG	21	61.81	61.9	No	310-330																																									
	3' GCCGTCGTTTCATGTACACCAC	21	58.36	57.14	No	484-504																																									
hrGFP_162-200	5' GAAGAAGACCATCACCGGCCTG	22	59.47	59.09	No	447-468																																									
	3' GAAGTGGTACTCGGGGAAGTCC	22	58.18	59.09	No	603-624																																									
Primer Details																																															
Define Mutation																																															
Layout Oligo Sets																																															
Create Library																																															

- 選択した塩基配列に問題がなければ、すべて黒字で表記されます
- Nextをクリックして、Oligo setへの変異導入方法の選択を行います。

Define Mutation

QuikScan1の場合

1. Select Mutational Strategy

- StrategyでQuikScan1を選択します。
- Replace all nonのカラムで置換したいアミノ酸を選択します。
(上の例では、指定した領域のアミノ酸をアラニンに置換)
- Replace all wild typeはwild typeにおいて、置換したいアミノ酸と同一のアミノ酸の処理方法を指示します。N/Aを選択した場合、置換したいアミノ酸と同一のアミノ酸は他のアミノ酸に置換されません(上の例では、アラニンは他のアミノ酸に置換されません)。
- 置換したくないアミノ酸配列はProtect Positionに入力します。

例：100番目と101番目を置換したくないときは、「100,101」と入力します。

2. Select Mutational Region

- Mutational StrategyをQuikScan1としたいアミノ酸範囲をクリックして選択します。

3. Define Host Type (Define Host Typeの詳細は次ページで説明します)

- 生物種を選択します。Codon Preference をPreferredまたはCustomから選択します。

4. Create Mutationをクリックします。

The screenshot shows a three-step process for defining a mutation:

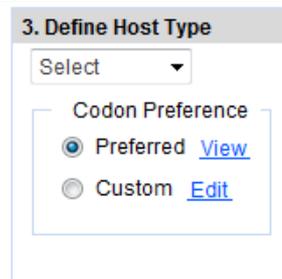
- 1. Select Mutational Strategy:** Strategy is set to QuikScan1. Below, 'Replace all non' is set to Ala/A with Ala/A. 'Replace all wild type' is set to Ala/A with N/A. 'Protect Position' is empty.
- 2. Select Mutational Region:** Three regions are listed: 'Select All' (unchecked), 'hrGFP_84-122' (checked), 'hrGFP_123-161' (unchecked), and 'hrGFP_162-200' (unchecked).
- 3. Define Host Type:** Host is set to E. coli. Under 'Codon Preference', 'Preferred' is selected (radio button), with a 'View' link. 'Custom' is also an option with an 'Edit' link.

A 'Create Mutation' button is located at the bottom right of the interface.



Define Mutation

参考 : Define Host Typeについて



- Host生物種は、selectのタブより、Insects, E. coli, Mammalian, Yeastの中から1つ選択することができます。
- Codon PreferenceでPreferredを選択すると、Host生物種のメジャーコドンが予め選択されています。Viewをクリックすると、選択されたコドンを確認できます。
- Codon PreferenceでCustomを選択すると、Editをクリックして、メジャーコドン以外のコドンを選択することも可能です。QuikScan1, QuikScan19の場合は最大2つ、QuikCombineの場合は1つ選択することができます。

Amino Acid	Codon	Frequency
Ala/A	<input checked="" type="checkbox"/> GCT	1.0
	<input checked="" type="checkbox"/> GCC	0.12
	<input type="checkbox"/> GCA	0.59
	<input type="checkbox"/> GCG	0.42
Arg/R	<input type="checkbox"/> CGT	1.0
	<input checked="" type="checkbox"/> CGC	0.36
	<input type="checkbox"/> CGA	0.0
	<input checked="" type="checkbox"/> AGG	0.0
	<input type="checkbox"/> AGA	0.0
	<input type="checkbox"/> CGG	0.0

図 : Customを選択した時、QuikScan19でHostをE.coliにした例

コドンを選択後、submitをクリックすると、選択したコドンでデザインが可能になります
赤字はE.coli (Host) のメジャーコドンになります

Define Mutation

QuikScan1の場合 (つづき)

Mutationsのカラムに表示される、Mutational Strategy、Mutational Region、Host Typeを確認します。

MutationsのカラムのActionにあるEditをクリックすると、どの位置のアミノ酸が置換されているのかを表示することができます。

Mutational Strategy	Mutational Region	Host Type	Actions		Statistics
QuikScan1	hrGFP_84-122	E. coli	Edit	Delete	Oligos in Selected Region: 38
QuikScan19	hrGFP_123-161	E. coli	Edit	Delete	Oligos for all Regions: 24779
QuikCombine	hrGFP_162-200	E. coli	Edit	Delete	

Mutational Region: hrGFP_84-122

T F T K Y P E D I S D F F I Q S F P A G

F V Y E R T L R Y E D G G L V E I R S

Codon Legend

- N Replaced wild-type
- M Start Codon
- A Replaced Non-AA
- M Stop Codon
- A Protected
- Non Mutated

Mutation Strategy:
QuikScan1のオプションで
Replace all wild type:
Ala with N/A (アラニ
ンスキャンニング)
を選んだ場合、"A"が
青色で表示されます。

Define Mutation

QuikScan19の場合

1. Select Mutational Strategy

- StrategyでQuikScan19を選択します。
- 置換したくないアミノ酸配列はProtect Positionに入力します。
例：150番目と151番目を置換したくないときは、「150,151」と入力します。

2. Select Mutational Regions

- Select Mutational Regionで変異を入れたい範囲を選択します。

3. Define Host Type

- 生物種を選択します。

Create Mutationをクリックします。

1. Select Mutational Strategy

Strategy:

Iteratively replace all defined amino acid positions with all amino acids

Protect Position:

2. Select Mutational Region

Select All

hrGFP_84-122

hrGFP_123-161

hrGFP_162-200

3. Define Host Type

Codon Preference

Preferred [View](#)

Custom [Edit](#)

Mutational Strategy	Mutational Region	Host Type	Actions	Statistics
QuikScan1	hrGFP_84-122	E. coli	<input type="button" value="Edit"/> <input type="button" value="Delete"/>	Oligos for all Regions: 779
QuikScan19	hrGFP_123-161	E. coli	<input type="button" value="Edit"/> <input type="button" value="Delete"/>	

Define Mutation

QuikScan19の場合 (つづき)

Mutationsのカラムに表示される、Mutational Strategy、Mutational Region、Host Typeを確認します。

MutationsのカラムのActionにあるEditをクリックすると、どの位置のアミノ酸が置換されているのかを表示することができます。

The screenshot shows a table of mutations and a detailed view of the Mutational Region for QuikScan19. The table lists three mutation strategies: QuikScan1, QuikScan19, and QuikCombine, all for E. coli. The Mutational Region view shows the amino acid sequence for the region hrGFP_123-161, with positions 127, 132, 137, 142, 147, 152, and 157 marked. A Codon Legend at the bottom explains the color coding for different amino acid types.

Mutational Strategy	Mutational Region	Host Type	Actions	Statistics
QuikScan1	hrGFP_84-122	E. coli	Edit Delete	Oligos in Selected Region: 741 Oligos for all Regions: 24779
QuikScan19	hrGFP_123-161	E. coli	Edit Delete	
QuikCombine	hrGFP_162-200	E. coli	Edit Delete	

Mutational Region: hrGFP_123-161

127 132 137 142

D I N L I E G M F V Y R V E Y K G R N F

147 152 157

P N D G P V M K K T I T G L Q P S F E

Codon Legend

- N Replaced wild-type
- M Start Codon
- A Replaced Non-AA
- X Stop Codon
- A Protected
- Non Mutated

Mutation Strategy:
QuikScan19で置換される
アミノ酸配列が表示され
ます。

Define Mutation

* QuikCombineの場合、置換したいアミノ酸の配列番号と何のアミノ酸で置換したいかを列記したテキストファイルを前もって準備する必要があります。

QuikCombineの場合*

➤ TDT file (タブ区切りテキスト) の作成

例：170番目、175番目、180番目、185番目のアミノ酸を置換したいとき

- Excelで以下の表を作成します。

カラムは必ずPOSとAMINOACID(S)で作成します。

置換したいアミノ酸の配列場所を入力します。

POS	AMINOACID(S)
170	R,N,D,C,G,H,I,K,M,F,P,S,T,W,Y,V
175	F,P,S,T,W,Y,V,R,N,D
180	C,E,Q,G,H,I,K,M,F,P,S,T,W,Y,V
185	P,S,T,W,Y,V,R,N,D,C

```
QuikCombine test1.txt - メモ帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)
POS      AMINOACID(S)
170      "R,N,D,C,G,H,I,K,M,F,P,S,T,W,Y,V"
175      "F,P,S,T,W,Y,V,R,N,D"
180      "C,E,Q,G,H,I,K,M,F,P,S,T,W,Y,V"
185      "P,S,T,W,Y,V,R,N,D,C"
```

テキスト (タブ区切り) で保存したtxtファイル

アミノ酸を1文字表記します。アミノ酸の間はカンマで区切ります。

- テキスト (タブ区切り) で保存します。保存したtxtファイルを開きます。「”」を消去して上書き保存します。QuikCombineで使用可能なTDT fileが完成します。

Define Mutation

QuikCombineの場合 (つづき)

- StrategyでQuikCombineを選択します。
- 参照をクリックして、作成したTDT fileを選択します。
- Select Mutational Regionで変異を入れたい範囲を選択します。
- Host typeを選択します。
- Mutation Typeを選択します。最大で4つ同時に選択することが可能です。今回はQuadrupleを選択します。

Single: 4カ所のうち1カ所ずつ変異を入れます

Double: 4カ所のうち2カ所同時に変異を入れます

Triple: 4カ所のうち3カ所同時に変異を入れます

Quadruple: 4カ所同時に変異を入れます

Single, Double, Triple, Quadrupleの使用例は

次ページで案内します。

注意 : QuikCombineの場合、Customを選択した時、コドンは1種類だけ選択可能です。

1. Select Mutational Strategy

Strategy:

File: [参照...](#)

Mutation Type

Single Double Triple Quadruple

2. Select Mutational Region

hrGFP_84-122

hrGFP_123-161

hrGFP_162-200

3. Define Host Type

E. coli

Codon Preference

Preferred [View](#)

Custom [Edit](#)

[Create Mutation](#)

Mutational Strategy	Mutational Region	Host Type	Actions	Statistics
QuikScan1	hrGFP_84-122	E. coli	Edit Delete	Oligos for all Regions: 779
QuikScan19	hrGFP_123-161	E. coli	Edit Delete	

Define Mutation

QuikCombineの場合 (つづき)

QuikCombineのSingle, Double, Triple, Quadrupleの使用例

- 160番目から200番目のアミノ酸配列の領域で、170番目のアミノ酸を別の3種類のアミノ酸、180番目を別の4種類のアミノ酸、190番目のアミノ酸を別の5種類のアミノ酸、200番目を別の6種類のアミノ酸に置換したいときの、Single, Double, Triple, Quadrupleのアミノ酸の組み合わせは以下の通りになります。

Single: $3+4+5+6=18$ Double: $3 \times 4 + 3 \times 5 + 3 \times 6 + 4 \times 5 + 4 \times 6 + 5 \times 6 = 119$

Triple: $3 \times 4 \times 5 + 3 \times 4 \times 6 + 3 \times 5 \times 6 + 4 \times 5 \times 6 = 342$ Quadruple: $3 \times 4 \times 5 \times 6 = 360$

- Single, Double, Triple, Quadrupleですが、一度に最高4つ同時に選択することが可能です。DoubleとQuadrupleを同時に選んだ場合、組み合わせは以下のようになります。

DoubleとQuadrupleを同時に選択 : $119+360=479$

Define Mutation

QuikCombineの場合 (つづき)

置換するアミノ酸の数が多い場合、オリゴDNAのデザインが完了するのに時間がかかります。

- Create Mutationをクリックします。
- Mutationsにデザインが表示されます。
- 右下のNEXTをクリックします。

1. Select Mutational Strategy

Strategy:

File: [参照...](#)

Mutation Type

Single Double Triple Quadruple

2. Select Mutational Region

hrGFP_84-122

hrGFP_123-161

hrGFP_162-200

3. Define Host Type

Codon Preference

Preferred [View](#)

Custom [Edit](#)

[Create Mutation](#)

Mutations

Mutational Strategy	Mutational Region	Host Type	Actions		Statistics
QuikScan1	hrGFP_84-122	E. coli	Edit	Delete	Oligos for all Regions: 24779
QuikScan19	hrGFP_123-161	E. coli	Edit	Delete	
QuikCombine	hrGFP_162-200	E. coli	Edit	Delete	

Define Mutation

QuikCombineの場合 (つづき)

Mutationsのカラムに表示される、Mutational Strategy、Mutational Region、Host Typeを確認します。

MutationsのカラムのActionにあるEditをクリックすると、どの位置のアミノ酸が置換されているのかを表示することができます。

Mutational Strategy	Mutational Region	Host Type	Actions		Statistics Oligos in Selected Region: 24000 Oligos for all Regions: 24779
QuikScan1	hrGFP_84-122	E. coli	Edit	Delete	
QuikScan19	hrGFP_123-161	E. coli	Edit	Delete	
QuikCombine	hrGFP_162-200	E. coli	Edit	Delete	

Mutational Region: hrGFP_162-200

166 171 176 181

V V Y M N D G V L V G Q V I L V Y R L N

186 191 196

S G K F Y S C H M R T L M K S K G V V

Codon Legend

N Replaced wild-type	M Start Codon	A Replaced Non-AA	■ Stop Codon	A Protected	■ Non Mutated
--	---	---	--	---	---

Mutation Strategy:
QuikCombineによって置換されるアミノ酸が紫色で表示されます。

Define Mutation

QuikCombineの場合 参考：Mutation Typeを2つ以上選んだ場合

例：DoubleとQuadrupleを同時に選んだ場合

1. Select Mutational Strategy
Strategy: ▼

File:

Mutation Type
 Single Double Triple Quadruple

2. Select Mutational Region
 hrGFP_84-122
 hrGFP_123-161
 hrGFP_162-200

3. Define Host Type
 ▼

Codon Preference
 Preferred [View](#)
 Custom [Edit](#)

Mutation TypeでDoubleとQuadrupleを選択した後、Create Mutationをクリックします。

Select	Oligo Set Name	Mutational Strategy	No. of Oligos
<input type="checkbox"/>	hrGFP_162-200_QuikCombine	QuikCombine	24960

Quadrupleの組み合わせ24000種類と、Doubleのときの組み合わせ960種類が合計された24960種類のOligoがデザインされます。

Layout Oligo Sets

- Libraryとして作製したいOligo setをSelectで選びます。
- Replicateは、最初は最低値の2で設定されています。Oligoの数は、合計が24万まで増やすことができます。Replicateの数を増やしてPercent Filledが100%に近くなるようにすると無駄がありません。
- Replicateの数字を変更した後、Selectの四角いタブをクリックすると、Percentage Filledの数字が変わります。
- 右下のNEXTをクリックします。

Create Mutagenesis Library [Help](#)

Define Library	Library Statistics			
Input Target Sequence	Maximum Library Size: 244038	Number of Oligo Sets: 3		
Primer Details	No. of Oligos Used: 243116	No. of Oligos Remaining: 812		
Define Mutation	Percentage Filled: 99.67 %			
Layout Oligo Sets	Oligo Sets			
Create Library	Click Add to select oligo set(s). <input type="button" value="Remove"/> <input type="button" value="Add"/>			
Select	Oligo Set Name	Mutational Strategy	No. of Oligos	Replicate
<input type="checkbox"/>	hrGFP_162-200_QuikCombine	QuikCombine	24000	<input type="text" value="10"/>
<input type="checkbox"/>	hrGFP_84-122_QuikScan1	QuikScan1	38	<input type="text" value="4"/>
<input type="checkbox"/>	hrGFP_123-161_QuikScan19	QuikScan19	741	<input type="text" value="4"/>

Create Library

Create Library with this status

Draft Allows you to edit the library. Later you can change the status.

Submitted Submits the library to Agilent Manufacturing and allows you to request a quote. [Design Checklist](#)

- Design Checklistをクリックすると、Mutagenesis libraryに関する確認事項がポップアップで表示されます。Design Checklistを確認すると、Checklistの横にチェックが入ります。Design checklistについて、次ページで説明します。

参考：

1つのLibraryあたりのOligo setが1-10の場合、10 sitesの見積もりになります。

1つのLibraryあたりのOligo setが11-20の場合、20 sitesの見積もりになります。

LibraryのOligo setの長さがすべて150 nt以下のときは、150 ntのkitとして取り扱いされます。

LibraryのOligo setの長さが151-200 ntのものが1つ以上含まれていると、200 ntのkitとして取り扱いされます。

<< Back Close Save

Create Library

- Design checklistの確認事項。各項目に同意したら、Select Allをクリックした後、Doneをクリックします。SubmittedかDraftを選ぶ画面に戻ります。

Did you:

- Select All
- Include all target sequences? Include all target regions? [Custom Design Guidance](#) ?
- Check the quality (length, Tm, etc.) of the PCR primers?
- Review any issues noted with the PCR primers?
- Apply your intended mutational strategy (QuikScan1, QuikScan19, or QuikCombine) to each mutational region?
- Select your intended host organism(s) for each mutational region?
- If custom codon preference was selected, did you indicate your codon preference(s) for your selected host organism(s) for each mutational region?
- Review the QuikChange Oligo Library Mutagenesis System user's guide to ensure that you have the equipment and reagents necessary to use the kit?

By clicking Done below, you agree that you have reviewed your Mutagenesis Library design using the provided checklist, and that, independent of the checklist, you are responsible for your design's fitness for a particular purpose.

If you do not agree, please click Cancel.

When you save your Mutagenesis Library design with status Submitted, eArray transmits your design to Agilent's manufacturing facility. Agilent will NOT be manufacture, ship, or invoice your kit until you send a purchase order.

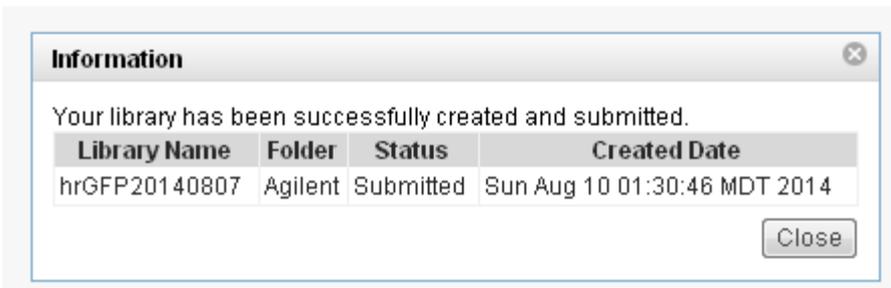
You can request a quote for your QuikChange Oligo Library Mutagenesis System kit through eArray. An Agilent representative will contact you to help you with your quote.

request a quote. [Design Checklist](#)

Saveをクリックすると、DesignがSubmittedされます。

Create Library

- Submittedをクリックし、SAVEをクリックすると、以下のポップアップがでてきて、登録したメールアドレスに、Library作成が完了したことを知らせるメールが届きます。



メールの文章



You have successfully submitted your Library to Agilent Manufacturing. ****NOTE**** The **Library will not be manufactured until you place an order for it.** To place an order, please contact your local Agilent sales representative. To find a local sales representative, go to: http://www.chem.agilent.com/scripts/cag_feedback.asp, or use the **Library > Request Quote** feature in eArray to start the ordering process.

The details of the Library appear below:

LibraryName: hrGFP20140807

Design ID: 069018

Application: Mutagenesis

Submission Date: 10-Aug-2014 01:30

見積もりおよびご注文の際に必要な
デザインID（6桁の数字）になります。

Library情報を見るには、補足p34~をご参考ください。

QuikChange HT Protein Engineering Systemの購入方法：お見積もり

お見積もりについて

ライブラリ情報は、作成後6ヶ月はeArrayサーバーに保存されますが、6ヶ月以内にご注文がないと自動的にeArrayのサーバー上から削除されることがありますのでご注意ください。（消去する前にeArray管理者からメールでご連絡いたします）

My Libraries [Refresh](#) [View All Libraries](#)

5 libraries found.

Name	Created Date ▼	Action
hrGFP20140807	10-Aug-2014	Order Download
hrGFP20140807	10-Aug-2014	Order Download
hrGFP20140729	03-Aug-2014	Order Download

- Homeタブをクリックして表示されるMy Librariesから（または補足1のライブラリ情報から）、見積もりを希望するLibraryを選んで、Actionにあるorderをクリックします。

日本では、eArray上から直接オンラインでのご注文は受付けていないため、orderをクリックした後、ご注文に際しては、弊社もしくは弊社製品取扱店にお問合わせください。下記の項目をご確認の上、お問合わせ願います。

- デザイン番号（6桁の数字）
- 反応数、および数量（次のページを参照ください）

QuikChange HT Protein Engineering Systemの購入方法：お見積もり(つづき)

- Kit Quantityのカラムに注文する数を入力します。
- Reaction Sizeは10か20が表示されます。Oligo setが1-10のときは10、Oligo setが11-20のときは20が表示されます。
- Nextをクリックします。

Home Libraries Oligo Sets My Functions My Account Application Type Mutagenesis

Search | Request Quote | Create Library

Order Libraries

Library Information
Library Name: hrGFP20140807
MLID Number(s): 069019

Quote Details
Kit Quantity:
Reaction Size:

Customer Details
Workgroup Name: Agilent Technologies
Company Name: Internal
Company Number: Internal

Next Cancel

[eArray Contact/Support](#) [eArray Terms of Use](#) [FAQ](#) © Copyright Agilent Technologies, Inc. 2002-2014 Supported Browsers: IE 8.0+ and Mozilla Firefox 23.0+

QuikChange HT Protein Engineering Systemの購入方法：お見積もり(つづき)

- MLID Number(s), 型番が表記された画面が表示されます。
- 右下のRequest a Quoteをクリックすると、見積もりオーダーが入ります。

The screenshot shows the 'Order Libraries' page in the Agilent website. The 'Library Information' section displays the following details:

- Library Name: hrGFP20140807
- MLID Number(s): 069019
- Part Number: G5901A
- Description: (Academic part number: G5903X) - QuikChange HT Protein Engineering System **200nt**, 10 sites

The 'Quote Details' section shows 'Kit Quantity: 1'. The 'Customer Details' section shows 'Workgroup Name: Agilent Technologies', 'Company Name: Internal', and 'Company Number: Internal'. At the bottom right, there are buttons for 'Print', 'Back', 'Cancel', and 'Request a Quote'. A red box highlights the 'Request a Quote' button, and a red arrow points from the '200nt' value in the description to the text below.

全てのMutational regionのアミノ酸範囲を25程度まで設定した場合、150 ntと表示されます。

QuikChange HT Protein Engineering Systemの購入方法：お見積もり(つづき)

- Request a Quoteがうまくいくと、以下のような画面が表示され、登録したemailアドレスにRequest a Quoteが完了したメールが届きます。



メールの文章



Agilent Technologies

You have requested a quote for the following design.
Library IDs: 069019
Library Name: hrGFP20140807
Slide Quantity: 1  お客様がお見積りをご要望されるkit数が反映されます。
Your company information is:
Workgroup: Agilent Technologies
Company Name: Internal
Company Number: Internal

- 各Oligo setを増幅するためのプライマーは、製品に添付されます。
- プライマーセットの数、および配列は、補足2をご参照ください。

補足：

補足 1 ; Libraryに含まれるOligo Setの情報を確認する方法 p35

補足 2 ; 各Oligo Setのプライマーの数と配列をチェックする方法 p37

補足 1 ; Libraryに含まれるOligo Setの情報を確認する方法

1) Library タブを開き、MLID(Design ID)やLibrary Nameで該当のLibraryを検索します。

The screenshot shows the Agilent Technologies eArray web interface. The 'Libraries' tab is selected and highlighted with a yellow box. Below the navigation bar, there is a search form with fields for 'Library Name', 'MLID', and 'Created Date'. The 'Search' button is also highlighted with a yellow box. The 'Folder Name' dropdown is set to 'All', and the 'Include subfolders' checkbox is checked.

2) 該当のLibraryが下に表示されます。 [Download](#)の青字をクリックください。

The screenshot shows the search results page. A table lists the found library. The 'Download' link is highlighted with a yellow arrow.

<input type="checkbox"/>	Library Name ▲	Folder Name	Status	Created Date	MLID	Order View Download
<input type="checkbox"/>	Test20140812	Agilent_Field	Submitted	11-Aug-2014	069054	

3) Categoryの中のファイル形式（FASTA、TDT形式）をチェックし、Downloadボタンを押します。

The screenshot shows the 'Library Details' page for the library 'Test20140812'. The 'Available files' section is highlighted with a yellow box, showing a table with columns for 'Category' and 'Download'. The 'FASTA' and 'TDT' categories are checked. The 'Download' button is also highlighted with a yellow arrow.

<input type="checkbox"/>	Category	Download
<input checked="" type="checkbox"/>	FASTA	
<input checked="" type="checkbox"/>	TDT	

ダウンロードされるファイルの内容は次ページをご確認ください。

- FASTAファイル； 各Oligomerに対するIDとシーケンスがFASTA形式で記載されています。

```

>AGL_PPRID_1376309
CTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTATGGGCAACCCCTAAGGTGAAGGCTCTGGGCAAGAAAGTGCTCGGTG
>AGL_PPRID_1380986
CTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGACATGGGCAACCCCTAAGGTGAAGGCTTGGGGCAAGAAAGTGCTCGGTG
>AGL_PPRID_1378279
CTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGATGGGCAACCCCTAAGGTGAAGGCTGTGGGCAAGAAAGTGCTCGGTG
>AGL_PPRID_1380082
CTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTAAGATGGGCAACCCCTAAGGTGAAGGCTAACGGCAAGAAAGTGCTCGGTG
>AGL_PPRID_1378895

```

- TDTファイル； 各Oligomerに対するIDとシーケンス、変異箇所などについてタブ区切り形式で記述されています。

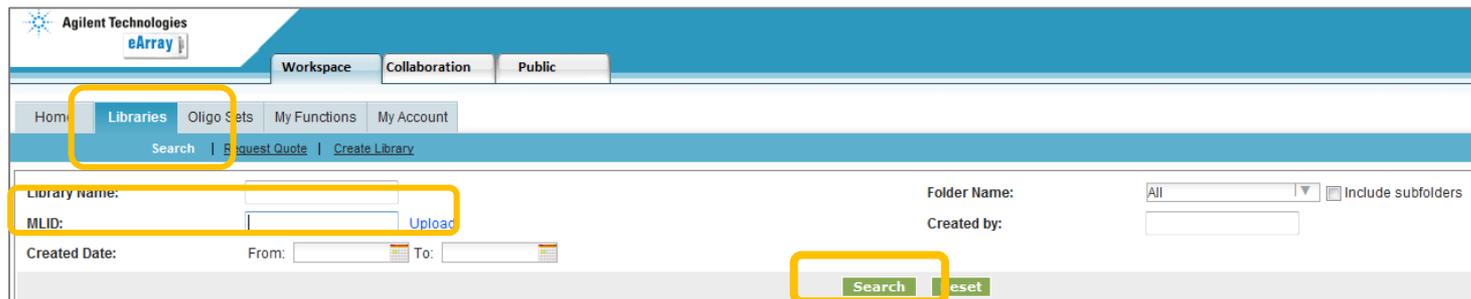
例； target 配列のposition 20-37をQuickScan1でアラニンに置換

ID	Sequence	TargetSequenceID	Mutational Position	WildtypeAA	Mutated AA	Wildtype Bp	Mutated Bp	Length
AGL_PPRID_1382093	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATGCCACTCCTGAC	HBB_20-37_QuikScan1	20	L	A	CTG	GCC	109
AGL_PPRID_1382094	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGGCCCTGAC	HBB_20-37_QuikScan1	21	T	A	ACT	GCC	109
AGL_PPRID_1382095	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTGCCGAC	HBB_20-37_QuikScan1	22	P	A	CCT	GCC	109
AGL_PPRID_1382096	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGCC	HBB_20-37_QuikScan1	23	E	A	GAG	GCC	109
AGL_PPRID_1382097	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAC	HBB_20-37_QuikScan1	24	E	A	GAG	GCC	109
AGL_PPRID_1382098	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAC	HBB_20-37_QuikScan1	25	K	A	AAG	GCC	109
AGL_PPRID_1382101	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAC	HBB_20-37_QuikScan1	29	T	A	ACT	GCC	109
AGL_PPRID_1382102	CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAC	HBB_20-37_QuikScan1	31	L	A	CTG	GCC	109

- ID; 各シーケンスに付加されたID
- Sequence; 変異導入後の塩基配列
- TargetSequence ID; 該当の塩基配列が所属するOligoSetの名前
- Mutational Position; 変異を導入したポジション
- Wildtype AA; ワイルドタイプの該当ポジションのアミノ酸残基
- Mutated AA ; 置換された後のアミノ残基
- Wildtype Bp; ワイルドタイプの該当ポジションの塩基配列
- Mutated Bp; 置換された後の塩基配列
- Length; 長さ (bp)

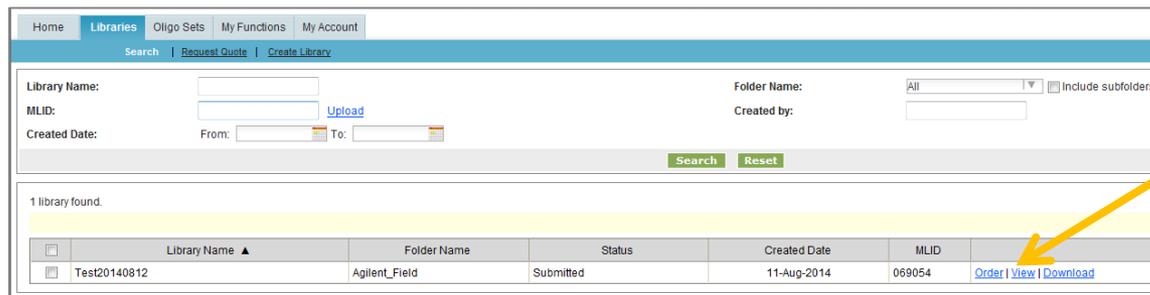
補足2 ; 各OligoSetのプライマーの数と配列をチェックする方法

1) Library タブを開き、MLID(Design ID)やLibrary Nameで該当のLibraryを検索します。



The screenshot shows the Agilent eArray web interface. The 'Libraries' tab is highlighted in the top navigation bar. Below it, there are search filters for 'Library Name', 'MLID', 'Folder Name', and 'Created Date'. A yellow box highlights the 'Libraries' tab and the search input fields. Another yellow box highlights the 'Search' button. The 'Reset' button is also visible.

2) 該当のLibraryが下に表示されます。 [View](#)の青字をクリックください。



The screenshot shows the search results page. A table displays one library found. A yellow arrow points to the 'View' link in the table row.

<input type="checkbox"/>	Library Name ▲	Folder Name	Status	Created Date	MLID	Order View Download
<input type="checkbox"/>	Test20140812	Agilent_Field	Submitted	11-Aug-2014	069054	

3) Oligo Set Details タブの中にLibraryに含まれるOligo Setがリストされています。

4) 調べたいOligo Setの文字をクリックします。

3' Primer, 5'Primerの欄にプライマー配列が記載されています。

View Library

Library Details

Library Name: CYTest20140812-2oligoset
 Status: Submitted
 Folder: Agilent_Field

Description:
 Comments:
 MLID: 069160

Library Statistics

Maximum Library Size: 244038
 No. of Oligos Used: 15782
 Percentage Filled: 6.51 %

Number of Oligo Sets: 4
No. of Oligos Remaining: 228146

Oligo Set Details | Library Creation Details | Library File Details

Oligo Set Name	Mutational Strategy	No. of Oligos	Replicate
CYTest-HBB_20-37_QuikScan1	QuikScan1	15	2
CYTest-HBB_70-100_QuikCombine	QuikCombine	7289	2
HBB-frame1_20-37_QuikScan1	QuikScan1	17	2
HBB-frame1_70-100_QuikScan19	QuikScan19	570	2

Oligoの数が
チェック
できます。

View Oligo Set

Oligo Set Name: HBB-frame1_20-37_QuikScan1
 Number of Oligos: 17
 Created by: Chiho Yoshida
 Created Date: 2014-08-12 01:32:04.0
 Status: Locked

Mutational Region Name: HBB-frame1_20-37
 Mutational Strategy: QuikScan1

3' Primer: GGCCTCACCACCACTTCATCC
 5' Primer: CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATG

17 oligos found.

External Oligo ID	Mutated Position	Oligo Sequence
AGL_PPRI_D_1382109	20	GCCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
AGL_PPRI_D_1382110	21	ATCGCCCTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
AGL_PPRI_D_1382111	22	ATCTGAGCCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
AGL_PPRI_D_1382112	23	ATCTGACTCGCCAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
AGL_PPRI_D_1382113	24	ATCTGACTCCTGGCCAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
AGL_PPRI_D_1382114	25	ATCTGACTCCTGAGGGCCAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG

View Oligo Set

Oligo Set Name: HBB-frame1_70-100_QuikScan19
 Number of Oligos: 570
 Created by: Chiho Yoshida
 Created Date: 2014-08-12 01:32:47.0
 Status: Locked

Mutational Region Name: HBB-frame1_70-100
 Mutational Strategy: QuikScan19

Host Codon Preference: [Show Codons](#)
 3' Primer: CAGATCCCCAAAGGACTCAAGAACC
 5' Primer: CAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAG

Oligo Sequence

D_1382130	70	GTGGTCTACCCTGGACCCAG
AGL_PPRI_D_1382131	70	TGCACCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCGCTATTGGTCTATTTCCACCCCTTAGGCTGCTG
		GTGGTCTACCCTGGACCCAG

お問い合わせ先

- eArrayのMutagenesisサイトに関するサポートお問い合わせ窓口

TEL: 0120-477-111

Email: email_japan@agilent.com

eArrayのMutagenesisサイトに関する質問と明示してください。

価格、納期等のご質問は、担当営業にご連絡ください。