

Code No. R407

研究用

TaKaRa

Multipoints Mutagenesis Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 本 Kit 以外必备试剂和仪器	2
● 引物设计说明	2
● 试剂盒原理	3
● 使用 Control Plasmid 时的实验例	3
● 多位点定点突变实验操作方法	8
● 实验例	11
● Q&A	11
● 参考文献	11

● 制品说明

本试剂盒是利用一对设计特殊的锚定引物 (Anchor Primer) 及几条定点突变引物对DNA多个不同位点同时进行定点突变的试剂盒。锚定引物“尾巴”上的特异性序列是与大多数基因都不相匹配的, 因此保证了PCR扩增的特异性。本试剂盒的主要原理是: 设计合成同一方向的锚定引物及定点突变引物, 将锚定引物及定点突变引物用T4 Polynucleotide Kinase磷酸化后与模板质粒DNA进行退火, 再使用T4 DNA Polymerase和T4 DNA Ligase进行延伸和连接形成突变单链, 然后使用锚定引物“尾巴”上的特异性引物 (ETail F/ETail R) 和高保真DNA聚合酶PrimeSTAR对突变单链进行PCR扩增, 再将获得的双链PCR产物克隆回原载体中, 即可达到实验目的, 获得目的突变体。

本试剂盒操作快速简单, 只需一天时间便可以完成整个突变操作。本试剂盒尤其适用于插入片段长度在1.0 kb以下的高位点基因突变实验, 对于1.0 kb以上的DNA片段的高位点基因突变, 由于引物退火的不完全、PCR扩增中可能引入新的突变点等原因, 可能降低实验成功率。本公司曾经使用本试剂盒, 成功进行了1.5 kb DNA片段的高位点基因突变实验。

本试剂盒中的Anchor F1和Anchor R1引物可供克隆于pUC系列载体或pBluescript系列载体中的DNA片段的高位点基因突变实验, 使用方便。使用试剂盒中的Control Plasmid及各种Control实验用引物可进行Control实验。

● 制品内容 (20次量)

T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l)	40 μ l
10 \times Reaction Buffer*1	40 μ l
ATP (10 mM)	48 μ l
10 \times Annealing Buffer	40 μ l
10 \times Extension Buffer	60 μ l
T4 DNA Ligase (60 U/ μ l)	20 μ l
T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l)	20 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	10 μ l
5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	200 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	80 μ l
Control Plasmid (50 fmol/ μ l)	20 μ l
Control Primer Mix (12.5 pmol/ μ l each)	20 μ l
Control Anchor F (8 pmol/ μ l)	5 μ l
Anchor F1 (8 pmol/ μ l) *2	20 μ l
Anchor R1 (8 pmol/ μ l) *2	25 μ l
ETail F (10 pmol/ μ l)	25 μ l
ETail R (10 pmol/ μ l)	25 μ l
Ligation Solution I	100 μ l

*1 10 \times Reaction Buffer 于-20 $^{\circ}$ C保存时会有白色浑浊出现, 溶解后不影响反应。

*2 Anchor F1 与 Anchor R1 是基于 pUC 系列载体、pBluescript 系列载体设计的锚定引物。Anchor F1 的 3' 端和 Anchor R1 的 5' 端与上述系列载体的多克隆位点两侧序列完全一致; Anchor F1 的 5' 端与 ETail F 序列完全相同, Anchor R1 的 3' 端与 ETail R 序列完全互补。当要突变的 DNA 片段克隆于上述系列载体中时, 锚定引物可以直接使用 Anchor F1 和 Anchor R1。

● 保存: -20 $^{\circ}$ C

● 本 Kit 以外必备试剂和仪器

- PCR 扩增仪。
- 水浴锅。
- 小型离心机。
- 各种移液枪。
- 各种型号的 Microtube、Tip 等。
- TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762)。
- TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 (Code No. 9761)。
- *Nde* I、*Hind* III (用于 Control 实验)。
- JM109 Competent Cell。
- 灭菌水。

● 引物设计说明

1. Kit 中的 Anchor F1 与 Anchor R1 是基于 pUC 系列载体、pBluescript 系列载体设计的锚定引物。当要突变的 DNA 片段克隆于上述系列载体中时，锚定引物可以直接使用 Anchor F1 和 Anchor R1。
2. 当要突变的 DNA 片段克隆于其他载体中时，则需要设计锚定引物。上游锚定引物 Anchor F 的 3' 端和下游锚定引物 Anchor R 的 5' 端应与载体序列完全一致；Anchor F 的 5' 端应与 ETail F 序列完全相同（见下述【各种引物序列】表中 Anchor F1 的阴影部分），Anchor R 的 3' 端应与 ETail R 序列完全互补（见下述【各种引物序列】表中 Anchor R1 的阴影部分）。这样在实施 PCR 扩增时可以直接使用 Kit 中提供的 ETail F 和 ETail R 引物进行 PCR 扩增。
3. 所有锚定引物及定点突变用引物必须为同一方向，在进行 Annealing、Extension、Ligation 时必须形成一条同一方向的突变单链作为靶序列，可以用于 PCR 扩增（原理见图 1）。
4. 引物长度应在 25–50 nt 之间， $T_m \geq 75^\circ\text{C}$ ，引物长度最好不要超过 50 nt，否则可能形成二级结构而影响定点突变效率。定点突变引物间最好有较为相近的 T_m 值， T_m 值的计算公式如下：

$$T_m = 81.5 + 41 \times \text{GC 数量} / N - 675 / N - \text{突变碱基数} / N \times 100$$
 其中 N 代表引物的长度。
5. 突变点最好设计在引物的中间，保证突变点两侧至少有 10–15 个碱基能与模板完全互补，引物的 3' 端应以 G 或 C 结尾。
6. 引物之间可以相邻或者有一定的间距（目前尚未发现引物间的距离对多位点定点突变效率有影响）。
7. 为了保证引物质量，引物应进行 PAGE 纯化。

【试剂盒中的各种引物序列】

引物名称	引物序列 (5' → 3')	长度 (nt)
Anchor F1	ACAGCAAAAAGCCCGAGCGACCTTCCGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	48
Anchor R1	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCCGGCTAAGGCACGCGCCACTTTTT	47
Control	ACAGCAAAAAGCCCGAGCGACCTTCGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGAC	47
Control Primer Mix	CATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCG	31
	CGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCG	30
	TGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	31
	GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAG	32
ETail F	ACAGCAAAAAGCCCGAGCGACCTTC	24
ETail R	AAAAGTGGCGCGTGCCTTAGCCG	23

● 试剂盒原理

试剂盒原理见图 1，简单操作步骤如下：

1. 设计锚定引物 (Anchor F、Anchor R) 以及定点突变用引物 (mt1、mt2……)。
2. 将 Anchor F 与 Anchor R 的混合物以及定点突变用引物 (mt1、mt2……) 混合物分别进行 5' 末端磷酸化。
3. 将 5' 末端磷酸化引物与原始质粒模板进行退火、延伸、连接反应，形成新的突变单链。
4. 用 ETail F 与 ETail R 对突变单链进行 PCR 扩增，获得突变双链 DNA 片段。
5. 突变双链 DNA 片段经酶切、凝胶回收后克隆于目的载体中。
6. 筛选阳性克隆，进行 DNA 测序，获得突变体。

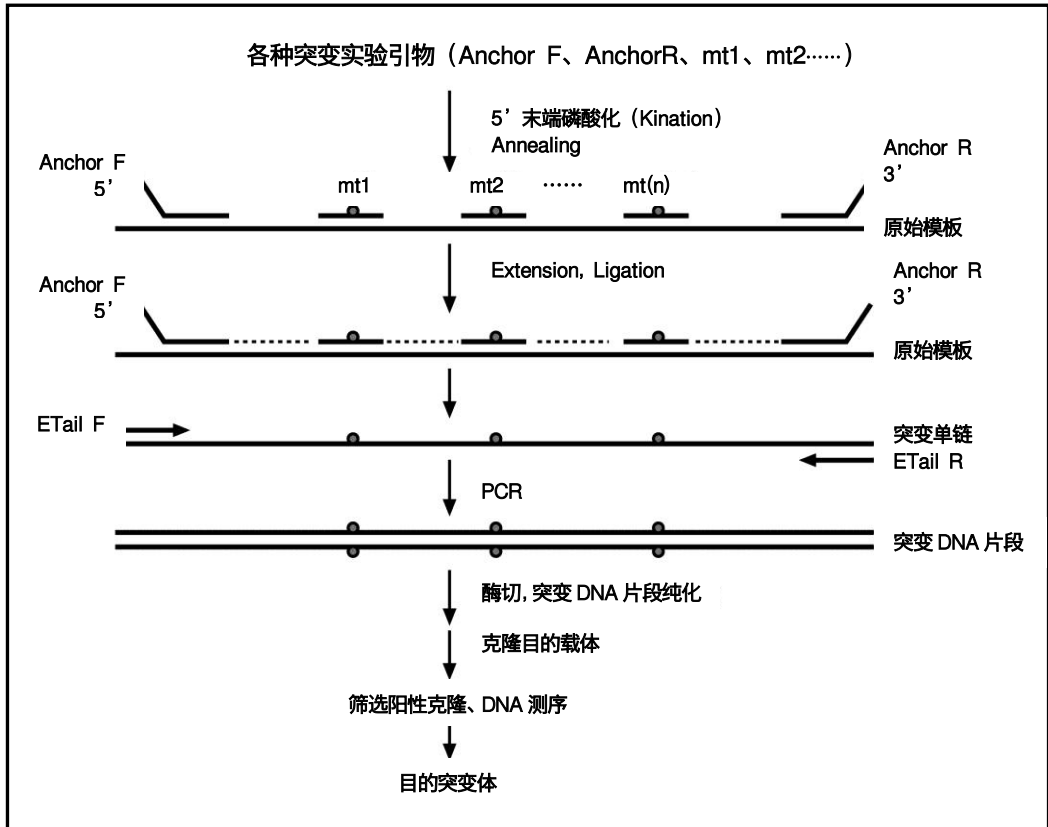


图 1. 本试剂盒原理图

● 使用 Control Plasmid 时的实验例

Control Plasmid 说明：在构建 Control Plasmid 时，在 pUC19 载体的 *LacZ* 基因上引入了四个终止密码子 TAA，使得 *LacZ* 基因不能正常表达，在 Amp⁺、IPTG、X-Gal 平板培养基上形成菌落时，四个终止密码子中只要有一个存在，得到的培养菌落将为白色菌落（不能形成蓝色菌落）。

本试剂盒中提供了四条 Control 用定点突变引物 (Control Primer Mix)，可以将 *LacZ* 基因中的四个终止密码子 TAA 同时突变为正常密码子（原理见图 2）。由于四个终止密码子突变后的质粒可以正常对 *LacZ* 基因进行表达，其质粒转化后在含有 Amp⁺、IPTG、X-Gal 平板培养基上将形成蓝色菌落。

本实验通过对 Control Plasmid 的巧妙设计，可以对突变后的质粒经转化后在含有 Amp⁺、IPTG、X-Gal 平板培养基上是否形成蓝色菌落，来判断四个位点同时进行突变的效率。

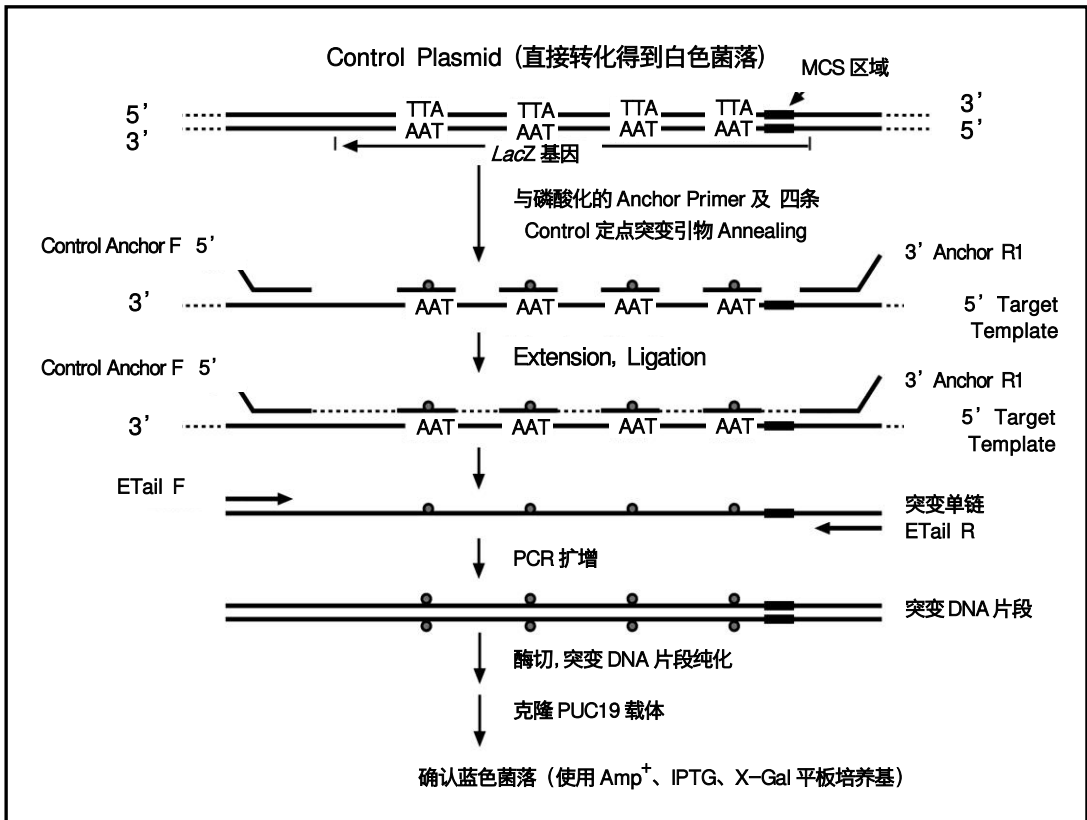


图 2. Control 实验原理图

1. 锚定引物和定点突变引物的磷酸化反应。

① 在两个 PCR 反应管中分别配制下列两种引物的磷酸化反应液。

【锚定引物的磷酸化】

试剂	使用量
Control Anchor F (8 pmol/μl) *	1 μl
Anchor R1 (8 pmol/μl)	1 μl
ATP (10 mM)	2.4 μl
10×Reaction Buffer	2 μl
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	2 μl
灭菌水	11.6 μl
Total	20 μl

* 由于在本实验中设计的突变点有的在 Anchor F1 引物结合位点的外侧，所以上游锚定引物使用了 Anchor F1 引物结合位点外侧的 Control Anchor F 引物。

【定点突变用引物的磷酸化】

试剂	使用量
Control Primer Mix (12.5 pmol/ μ l each)	4 μ l
ATP (10 mM)	2.4 μ l
10 \times Reaction Buffer	2 μ l
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l)	2 μ l
灭菌水	9.6 μ l
Total	20 μ l

- ② 37°C反应 30 分钟。
 ③ 70°C加热 10 分钟。

2. 退火反应。

- ① 在 PCR 反应管中配制下列反应液。

试剂	使用量
Control Plasmid (50 fmol/ μ l)	1 μ l
步骤 1 的 Control Anchor F/Anchor R1 磷酸化反应液 (0.4 pmol/ μ l each)	1 μ l
步骤 1 的 Control Primer Mix 磷酸化反应液 (2.5 pmol/ μ l each)	4 μ l
10 \times Annealing Buffer	2 μ l
灭菌水	12 μ l
Total	20 μ l

- ② 99°C加热 3 分钟后，经 30 分钟缓慢降温至 45°C。在 45°C保温 10 秒钟后，再降温至 4°C。本操作请在 PCR 仪上进行。
 注) 退火产物不稳定，请立刻进行下步实验。

3. 延伸、连接反应。

- ① 将下列组份混合后加入到步骤 2 的退火反应液中。

试剂	使用量
10 \times Extension Buffer	3 μ l
T4 DNA Ligase (60 U/ μ l)	1 μ l
T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l)	1 μ l
灭菌水	5 μ l
Total	10 μ l

- ② 25°C反应 1 小时。
 注) 延伸、连接产物不稳定，请立刻进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增反应。

① 按下列组份配制 PCR 反应液，总体积为 50 μ l。

试剂	使用量
步骤 3 的延伸、连接反应液	1 μ l
5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
ETail F (10 pmol/ μ l)	1 μ l
ETail R (10 pmol/ μ l)	1 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
灭菌水	32.5 μ l
Total	50 μ l

② PCR 反应条件如下:

98°C	10 sec	} 30 Cycles
60°C	10 sec	
72°C	30 sec	

③ 取 5 μ l PCR 反应液进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增片段长度为 478 bp。

5. PCR 产物的凝胶回收。

PCR 反应液 (45 μ l) 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收，最后使用 20 μ l 灭菌水洗脱 DNA。此 DNA 即为突变 DNA 片段。

6. 酶切反应及 DNA 片段的纯化。

① 按下列组份配制酶切反应液。

试剂	使用量
步骤 5 的凝胶回收突变 DNA 片段	12 μ l
<i>Nde</i> I (10 U/ μ l) *	1 μ l
<i>Hind</i> III (10 U/ μ l) *	1 μ l
10 \times K Buffer	5 μ l
灭菌水	31 μ l
Total	50 μ l

* 突变点在 pUC19 的 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点之间。

② 37°C 反应 2 小时。

③ 使用 TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 (Code No. 9761) 对酶切 DNA 片段进行纯化，最后使用 20 μ l 灭菌水洗脱 DNA。

7. 克隆载体的制备。

- ① 按下列组成配制酶切反应液，总体积为 50 μl 。

试剂	使用量
Control Plasmid (50 fmol/ μl)	10 μl
<i>Nde</i> I (10 U/ μl) *	1 μl
<i>Hind</i> III (10 U/ μl) *	1 μl
10 \times K Buffer	5 μl
灭菌水	33 μl
Total	50 μl

* 突变点在 pUC19 的 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点之间。

- ② 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜反应。

- ③ 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收酶切载体，最后使用 10 μl 灭菌水洗脱载体 DNA。

8. 载体与酶切突变 DNA 片段的连接。

- ① 按下列组份配制连接反应液。

试剂	使用量
步骤 7 的酶切载体* ¹	1 μl
步骤 6 的酶切突变 DNA 片段* ¹	4 μl
Ligation Solution I* ²	5 μl
Total	50 μl

*¹ 酶切载体 1 μl (50 ng) 约为 0.03 pmol，酶切突变 DNA 片段 4 μl (32 ng) 约为 0.18 pmol，载体与片段的摩尔比约为 1:6。

*² Ligation Solution I 的量应占反应体系的 1/2。

- ② 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。

9. DNA 转化。

- ① 将上述连接液 10 μl 加入至 100 μl JM109 Competent Cell 中，在 1.5 ml Microtube 中迅速轻轻混匀后，在冰上放置 30 分钟。
- ② 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 45~50 秒钟后立刻移至冰上放置 2 分钟。
- ③ 将上述②的细菌溶液移至 15 ml Falcon Tube 中。
- ④ 向 Falcon Tube 中加入 900 μl 的 SOC 培养基后，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡 (约 200 rpm) 培养 1 小时。
- ⑤ 取 100 μl 菌液涂布在含有 Amp⁺ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、IPTG (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、X-Gal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的平板培养基上，37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

10. 实验结果。

质粒种类	蓝菌数 (个)	白菌数 (个)	蓝菌比例 (%) *2
Control Plasmid (100 pg) *1	0	400	0
定点突变后的 Plasmid	815	140	85.3

*1 Control Plasmid (100 pg) 转化后同样取 100 μ l 的菌液涂布平板培养基。

*2 蓝菌比例是指蓝菌占总菌数的百分比。

● 多位点定点突变实验操作方法

1. 锚定引物和定点突变用引物的磷酸化反应。

① 在两个 PCR 反应管中分别配制下列两种引物的磷酸化反应液。

【锚定引物的磷酸化】

试剂	使用量
Anchor F (8 pmol/ μ l) *	1 μ l
Anchor R (8 pmol/ μ l) *	1 μ l
ATP (10 mM)	2.4 μ l
10 \times Reaction Buffer	2 μ l
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l)	2 μ l
灭菌水	11.6 μ l
Total	20 μ l

* 如果需要突变的 DNA 片段克隆于 pUC 系列载体或 pBluescript 系列载体中时，锚定引物可以直接使用 Kit 中提供的 Anchor F1 和 Anchor R1。

如果需要突变的 DNA 片段克隆于其他载体中时，则需要设计锚定引物。锚定引物的设计可根据“引物设计原则”进行。

【定点突变用引物的磷酸化】

试剂	使用量
配制定点突变用引物的混合物 (12.5 pmol/ μ l each)	4 μ l
ATP (10 mM)	2.4 μ l
10 \times Reaction Buffer	2 μ l
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l)	2 μ l
灭菌水	9.6 μ l
Total	20 μ l

② 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。

③ 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟。

2. 退火反应。

① 在 PCR 反应管中配制下列反应液。

试剂	使用量
ds DNA 模板* (50 fmol/ μl)	50 fmol
步骤 1 的 Anchor F/Anchor R 磷酸化反应液 (0.4 pmol/ μl each)	1 μl
步骤 1 的定点突变引物磷酸化反应液 (2.5 pmol/ μl each)	4 μl
10× Annealing Buffer	2 μl
灭菌水	up to 20 μl

* 模板量计算公式:

$$\text{fmol} = \frac{\text{质粒的 ng 数}}{330 \times 2 \times \text{质粒全长的碱基数 (片段 + 载体)}} \times 10^6$$

② 99°C加热 3 分钟后, 经 30 分钟缓慢降温至 45°C。在 45°C保温 10 秒钟后, 再降温至 4°C。本操作请在 PCR 仪上进行。

注) 退火产物不稳定, 请立刻进行下步实验。

3. 延伸、连接反应。

① 将下列组份混合后加入到步骤 2 的退火反应液中。

试剂	使用量
10× Extension Buffer	3 μl
T4 DNA Ligase (60 U/ μl)	1 μl
T4 DNA Polymerase (1 U/ μl)	1 μl
灭菌水	5 μl
Total	10 μl

② 25°C反应 1 小时。

注) 延伸、连接产物不稳定, 请立刻进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增反应。

① 按下列组份配制 PCR 反应液, 总体积为 50 μl。

试剂	使用量
步骤 3 的延伸、连接反应液	1 μl
5×PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
ETail F (10 pmol/ μl)	1 μl
ETail R (10 pmol/ μl)	1 μl
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μl)	0.5 μl
灭菌水	32.5 μl
Total	50 μl

② PCR 反应条件如下:

98°C	10 sec	} 30 Cycles
60°C	10 sec	
72°C	1 min/kb	

③ 取 5 μl PCR 反应液进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 确认 PCR 扩增片段长度。

5. PCR 产物的凝胶回收。

PCR 反应液 (45 μl) 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收, 最后使用 20 μl 灭菌水洗脱 DNA。此 DNA 即为突变 DNA 片段。

6. 突变 DNA 片段的酶切反应及 DNA 片段的纯化。

① 使用适当的限制酶酶切突变 DNA 片段。

② 使用 TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 (Code No. 9761) 对酶切 DNA 片段进行纯化, 最后使用 20 μl 灭菌水洗脱 DNA。

7. 克隆载体的制备。

① 使用适当的限制酶酶切载体 DNA。

② 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762) 进行凝胶回收酶切载体, 最后使用 10 μl 灭菌水洗脱载体 DNA。

8. 载体与酶切突变 DNA 片段的连接。

① 按下列组份配制连接反应液。

试剂	使用量
步骤 7 的酶切载体*1	1 μl
步骤 6 的酶切突变 DNA 片段*1	4 μl
Ligation Solution I*2	5 μl
Total	10 μl

*1 酶切载体与酶切突变 DNA 片段的摩尔比约为 1 : 5~10。

*2 Ligation Solution I 的量应占反应体系的 1/2。

② 16°C 反应 1 小时。

9. DNA 转化。

① 将上述连接液 10 μl 加入至 100 μl JM109 Competent Cell 中, 在 1.5 ml Microtube 中迅速轻轻混匀后, 在冰上放置 30 分钟。

② 42°C 水浴中保温 45~50 秒钟后立刻移至冰上放置 2 分钟。

③ 将上述②的细菌溶液移至 15 ml Falcon Tube 中。

④ 向 Falcon Tube 中加入 900 μl 的 SOC 培养基后, 在 37°C 下振荡 (约 200 rpm) 培养 1 小时。

⑤ 取 100 μl 菌液涂布在含有 Amp^r (100 μg/ml)、IPTG (30 μg/ml)、X-Gal (40 μg/ml) 的平板培养基上, 37°C 过夜培养。

10. 筛选阳性克隆。

① 挑选菌落, 提取质粒 DNA。

② 进行 DNA 测序, 选取目的突变体。

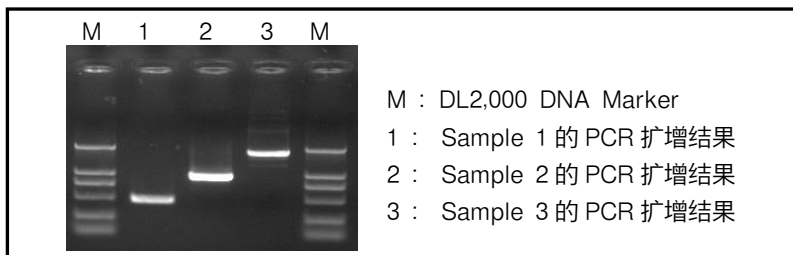
● 实验例

使用本试剂盒，进行了三个多位点定点突变实验。详细实验情况如下：

Sample 1 是 Control 实验，进行了 4 点突变（4 条突变引物）；

Sample 2 是对 pUC18 载体上约 800 bp 的 DNA 片段进行了 6 点突变（6 条突变引物）；

Sample 3 是对 pMD18-T Simple 载体上约 1.5 kb 的 DNA 片段进行了 10 点突变（10 条突变引物）。以上三个多位点定点突变实验例的 PCR 反应结果见下图。



● Q&A

Q1 PCR 扩增得不到特异性条带的原因可能是什么？

- A1
- ① 锚定引物与突变引物的方向不正确，不能退火成同一方向的突变单链，请重新设计合成引物。
 - ② 锚定引物与突变引物的磷酸化反应不充分，未能形成突变单链，请重新将引物磷酸化。
 - ③ 模板量不足，请适当增加模板量或优化 PCR 反应条件。

Q2 PCR 扩增有杂带（无法准确判断主带位置），如何解决？

- A2
- ① 适当优化 PCR 反应条件：可适当提高反应的退火温度，以 2°C 为单位渐进，或者使用两步法进行 PCR 扩增，即 98°C 10 秒，68°C 1 分钟/kb，运行 30 Cycles。
 - ② 适当降低 PCR 反应的延伸时间，以 15 秒或 30 秒为单位递减。
 - ③ 适当减少模板的使用量。

● 参考文献

1. Seyfang A, Jin JH. Multiple site-directed mutagenesis of more than 10 sites simultaneously and in a single round. *Anal Biochem.* 2004; **324**(2): 285–91.
2. Lei Young and Qihan Dong. TAMS technology for simple and efficient *in vitro* site-directed mutagenesis and mutant screening. *Nucleic Acids Res.* 2003 February 1; **31**(3): e11.
3. Kunkel, T. A. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(2): 488–92.
4. Smith, M. (1985) *In vitro* mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* **19**, 423.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 TAKARA BIO INC. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201612Da