



## Gateway BP 克隆试剂盒

储存温度 -80°C

组份号	成份	E082	E083
BP-1	2X Gateway BP 克隆酶	100 µl	500 µl
BP-2	阳性对照插入片段	30 µl	150 µl
BP-3	阳性对照载体(抗壮观霉素)	20 µl	100 µl
BP-4	10X 蛋白酶 K	20 µl	100 µl
	规格	20 次反应	100 次反应

## 产品概述

**abm** 生产的 Gateway 克隆系列产品是一种崭新的高通量基因克隆技术，可以简单高效地把入门载体 (The Entry Clone) 克隆到多种目的载体 (Destination vector) 中。Gateway 克隆技术无需依赖限制性内切酶和连接酶的传统克隆技术，而是利用天然的  $\lambda$  噬菌体与大肠杆菌 (*E. coli*) 的染色体之间产生的位点 (att) 特异性的重组整合，使 DNA 片段在不同的克隆载体之间实现转移。Gateway 克隆重组技术具有可靠的稳定性，当基因在重组目的表达载体之间快速简便地穿梭时，可以保证基因以正确的方向插入并保持阅读框架不发生改变。

使用 **abm** 生产的 Gateway BP 克隆酶可以使两端带有 attB 位点的基因片段和供体载体 (pDONR) 接合形成入门载体 (The Entry Clone)。Gateway 克隆体系在细菌转化这个环节使用正向筛选(抗生素)和负向筛选(ccdB 致死基因)两种选择，以确保得到高比例的阳性重组。

## 产品特性与优点

- 灵活便捷：易于把基因克隆到带有不同启动子和标记的多种载体。
- 方便快速：最大化缩短实验前计划时间，无需限制性内切酶和连接酶。
- 准确无误：基因以正确的方向插入并保持阅读框架不发生改变。
- 无需测序：一旦入门载体 (The Entry Clone) 被建立或从 **abm** 购买，就可以使用 Gateway 克隆系统克隆至任意 Gateway 目的载体 (Destination vector)，无需担心引入突变。

## 储存条件

2X Gateway BP 克隆酶需要在-80°C 环境中保存。使用时请置于冰上融解并一直保持低温状态。

## 其它需要但需另行购买的组分：

1. 常规生物试剂包括 LB 琼脂(Cat. No. G247)，抗生素如氨苄青霉素 Ampicillin (Cat. No. G021) 或卡那霉素 Kanamycin (Cat. No. G022)，LB 细菌培养液。
2. 感受态细菌 ProClone<sup>TM</sup> Competent Cell (Cat. No. E003)。
3. DNA 凝胶染色试剂 SafeView<sup>TM</sup> DNA Stain (Cat. No. G108)。
4. 目的载体 DNA。

## 操作手册

## 1. 扩增供体载体 pDONR：

Gateway 供体载体 pDONR 包含负向筛选 ccdB 致死基因，需要在具有抗 ccdB 毒性的细菌中培养繁殖，否则会导致细菌死亡。

## 2. PCR 引物设计和扩增：

attB1 正向引物设计: 5' - GGGGACAACCTTGACAAAAAGTTGGC-(模板特异序列) - 3'  
attB2 反向引物设计: 5' - GGGGACAACCTTGACAGAAAGTTGGC-(模板特异序列) - 3'

3. 根据 DNA 聚合酶生产厂商的说明并采用适合引物和模板的退火温度建立 PCR 反应。在琼脂糖凝胶上电泳验证 PCR 产物的大小及得率，使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (D507) 回收提取 PCR 片段。

## 4. 冰上融解 2X Gateway BP 克隆酶，在无菌反应管中建立下述反应体系：

反应组成	设立阳性对照体	体积
2X Gateway BP 克隆酶	2X Gateway BP 克隆酶	5 µl
目的基因 attB-PCR 产物 (50 ng/µl)	阳性对照插入片段	3 µl
pDONR 供体 (0.5 µg/µl)	阳性对照载体 (抗壮观霉素)	2 µl
总体系		10 µl

5. 充分混匀上述反应体系后快速离心后，于 25°C 孵育不少于 5 个小时，或孵育过夜。长时间孵育有助于得到更多的克隆。

6. 在每个反应管里加入 1 µl 的 10X 蛋白酶 K，混匀后 37°C 孵育 10 分钟。

7. 将上述克隆反应加入 60 µl 感受态细菌进行转化反应后铺平板。

8. 次日查看克隆生长情况，挑选 2-3 个菌落，摇菌后可用质粒提取试剂盒 (D504) 提取质粒 DNA 后，筛选正确克隆。阳性对照可以用 *Xba*I 和 *Eco*RV 酶切后琼脂糖凝胶电泳验证，可见 1.2 kb 和 2.6 kb 两个片段。