

# M5 HiPer Gateway BP Clone Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Gateway BP Clone Kit	20T	MF961-01
M5 HiPer Gateway BP Clone Kit	4x20T	MF961-04

## 【储存条件】

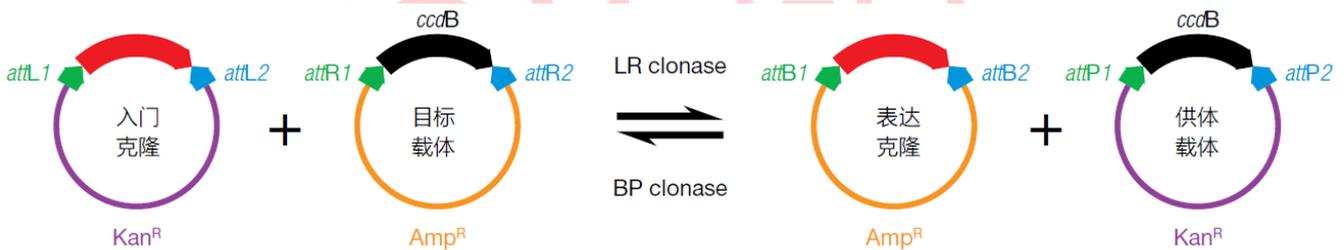
在-80°C 环境中保存。使用时请置于冰上融解并一直保持低温状态。

## 【产品简介】

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 EntryClone) 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 Gateway BP Clone Enzyme 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。

方便快捷：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，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。

## 【产品组分】

	MF961-01	MF961-04
2X Gateway BP Clone Enzyme mix	100 $\mu$ l	4x100 $\mu$ l
Positive Control Insert	30 $\mu$ l	4x30 $\mu$ l
Positive Control Vector	20 $\mu$ l	4x20 $\mu$ l
10X Proteinase K Solution	20 $\mu$ l	4x20 $\mu$ l

## 【使用方法】

### 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。

a. PCR 引物设计和扩增:

attB1 正向引物设计: 5' – GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGC-(模板特异序列) – 3'

attB2 反向引物设计: 5' – GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGCA-(模板特异序列) – 3'

b. 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 凝胶回收试剂盒回收提取 PCR 片段。

### 2. 冰上融解 2X Gateway BP Clone Enzyme mix, 在无茵反应管中建立下述反应体系:

反应体系	体积
2X Gateway BP Clone Enzyme mix	5 $\mu$ l
目的基因 attB-PCR 产物( 50 ng/ $\mu$ l) or Positive Control Insert	3 $\mu$ l
pDONR 供体 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) or Positive Control Vector (抗壮观霉素)	2 $\mu$ l

a. 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。

b. 在每个反应管里加入 1  $\mu$ l 的 10X Proteinase K Solution, 混匀后 37°C 孵育 10 分钟。

c. 将上述克隆反应加入 60  $\mu$ l 感受态细菌进行转化反应后铺平板。

d. 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提取质粒 DNA 后, 筛选正确克隆。阳性对照可以用 AflIII 和 EcoRV 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。

## 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。