

S6 HiPer Gateway BP Clone Kit

使用说明书 (Version 2)

产品名称	单位	货号
S6 HiPer Gateway BP Clone Kit	20T	S6961-01
S6 HiPer Gateway BP Clone Kit	4x20T	S6961-04

因为本产品和 thermo 的 BP 酶稍微有点不同，请严格按照我们的说明书操作，而不是 thermo 的说明书!!!

【使用前须知】

一、用 Gateway BP 酶时，在实验设计上，注意：

- A、引物设计：确保在 PCR 产物两端引入的 attB1 和 attB2 位点序列要正确无误。
- B、选择合适的供体载体，如 pDONR 系列载体。注意供体载体的可复制效率、还有抗生素抗性标记，以便后续筛选和扩增

二、在 BP 反应时，注意：

- A、BP 酶对温度敏感：试剂平时保存是在-80 度冰箱，使用时，需要在冰上融化 BP 酶，使用时混合均匀。避免酶在室温下长时间暴露，防止其失活。
- B、反应体系：按照我们 protocol 推荐的比例设置反应体系，包括 attB-PCR 产物、供体载体和 BP 酶，所有组分充分混合。
- C、反应条件：在 25℃ 孵育不少于 5 个小时，对于较大的 PCR 产物，需要延长孵育时间以提高重组效率。我们一般是 25℃，反应 16h。

三、推荐 BP 体系，可供参考：

BP 体系：

PCR 产物（带 attb 位点）	150ng
入门质粒 pDONR 带 attp 位点）	1ug
2xBP 酶 mix	根据上面 2 项体积总和加入

反应条件：25℃，反应 16h 后加入 1/10 体积的蛋白酶 K，37℃，15min

【储存条件】

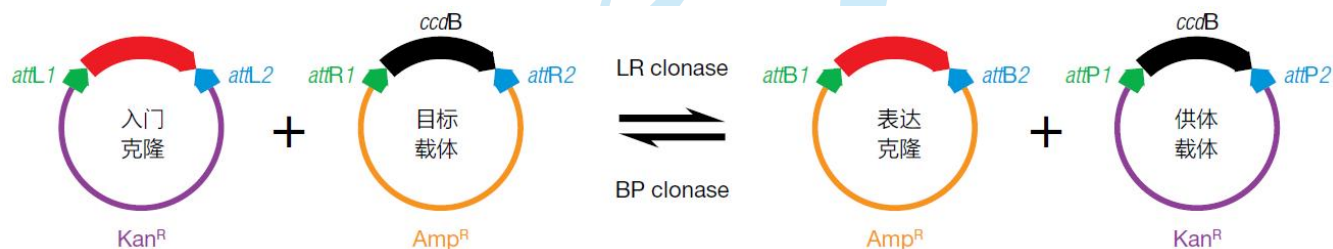
在-80°C 环境中保存。使用时请置于冰上融解并一直保持低温状态。用完后请仍然放入-80°C 环境中保存。

【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 λ 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。



【产品特色】

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】

	S6961-01	S6961-04
2X Gateway BP Clone Enzyme mix	100 μ l	4x100 μ l
Positive Control Insert	30 μ l	4x30 μ l
Positive Control Vector	20 μ l	4x20 μ l
10X Proteinase K Solution	20 μ l	4x20 μ 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， 在无菌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 μ l
目的基因 attB-PCR 产物(50 ng/ μ l) or Positive Control Insert	3 μ l
pDONR 供体 (0.5 μ g/ μ l) or Positive Control Vector (抗壮观霉素)	2 μ l

- 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。
- 在每个反应管里加入 1 μ l 的 10X Proteinase K Solution，混匀后 37°C 孵育 10 分钟。
- 将上述克隆反应加入 60 μ l 感受态细菌进行转化反应后铺平板。
- 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 AflII 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。

Science Tool

【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。