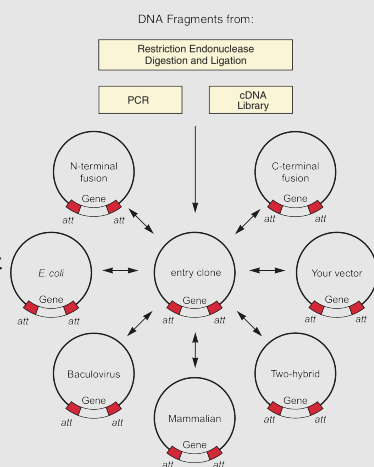


# Gateway 分子构建

Gateway 是利用同源重组高效进行分子构建的一种策略, 实验室使用 Thermo 提供的 Gateway® Technology (Catalog nos. 12535-019 and 12535-027), 本 Protocol 参照说明书, 实验室使用体系减小。

实验室 BP 反应所使用 Entry clone 为 pDONR221, LR 反应所使用载体包含 gLap(Flp-In 体系)、pGCS 系列载体、大肠杆菌蛋白表达质粒、pDest 四段 LR 慢病毒载体、pUGW/pUWG 自制载体、HushLap 慢病毒载体等 (详细载体查表)



- BP 反应提前设计带有 attB 同源臂的引物, PCR 扩增基因并完成胶回收; LR 反应需要提前提取 Entry Clone 质粒

attB1: 5' - GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC - 3'

attB2: 5' - GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC - 3'

**TE Buffer, pH=8.0:** 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA

- 在 1.5 mL 管中搭建分子克隆反应体系, 完成后短离、混匀

## BP 反应体系 (5 $\mu$ L)

样品	使用量
attB PCR 纯化产物	150 ng
pDONR221	150 ng
TE Buffer, pH=8.0	补齐至 4.5 $\mu$ L
BP Clonase™ enzyme	0.5 $\mu$ L

## LR 反应体系(5 $\mu$ L)

样品	使用量
Entry clone	150 ng
Destination vector	150 ng
TE Buffer, pH=8.0	补齐至 4.5 $\mu$ L
LR Clonase™ enzyme	0.5 $\mu$ L

- 酶最后冰盒取用, 用完后立刻放回冰箱, 混匀后短离, 25°C金属浴 1 小时, 提前打开 37°C水浴锅
- 加入 5  $\mu$ L Proteinase K, 吸打混匀, 37°C水浴 10 min
- 转化 DH5 $\alpha$ , BP 反应后 Entry Clone 为 Kan 抗性, LR 反应后 Destination vector 均为 Amp 抗性

修订日期 2024-04-23