

Invitrogen Gateway克隆技术

方便在多个表达系统中进行克隆



值得信赖的克隆技术领导者

Invitrogen™ Gateway™ 克隆技术已被生命科学研究人员引用10,000多次。毫无疑问多年来Gateway克隆一直是不同经验水平——从一无所知到经验丰富——的研究人员值得信赖的选择，可用于蛋白质表达、功能分析等应用。

克服了传统限制性内切酶克隆的缺点——无需酶切、连接、亚克隆步骤，也不需要花费数小时筛选菌落。敬请体验Gateway克隆技术。

- **快速反应** — 室温下1小时即可完成克隆反应
- **准确的结果** — 克隆效率>95%，高效提供您所需的克隆
- **通用技术** — 可使DNA材料/插入片段在载体之间轻松穿梭
- **简化的实验方案** — 无需重新测序；从靶点识别到验证均使用相同的克隆

基本克隆方法： 3步获得更高的效率

入门克隆、Clonase酶和目标载体

确定入门克隆

入门克隆是您开始实验的第一步，带有 $attL$ 序列的目的基因或DNA片段，该片段与 $attR$ 序列重组，生成您想要的表达克隆。选择一种Invitrogen™ TOPO™ 克隆载体，构建您的入门克隆。或从我们GeneArt services中合成定制的克隆。

利用Clonase酶介导反应

准备好入门克隆后，将目的基因轻松导入目标载体中。此反应由Invitrogen™ LR Clonase™ 酶混合物介导，从入门克隆中切除目的基因，整合至目标载体中，获得您的表达克隆。其逆反应十分简单：利用Invitrogen™ BP Clonase™ 酶混合物进行BP反应 (在 $attB$ 和 $attP$ 位点之间重组)。

LR Clonase和BP Clonase酶混合物均采用易于使用的预混液形式，确保了反应间的一致性和可靠性。

选择目标载体

将目的基因或DNA片段克隆至Gateway™ 载体后，您可以根据需要将其导入多个具有表达和功能分析的系统中。

Gateway克隆技术可提供多种多样的表达载体。从在大肠杆菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞中的蛋白表达到RNAi研究，从晶体学到蛋白质-蛋白质相互作用的功能研究，总有一种目标载体适合您的应用。对于需要特殊或定制载体的应用领域，Invitrogen™ Gateway™ 载体转换系统可以将任意载体转换为与Gateway克隆兼容的载体。

DNA片段来源：

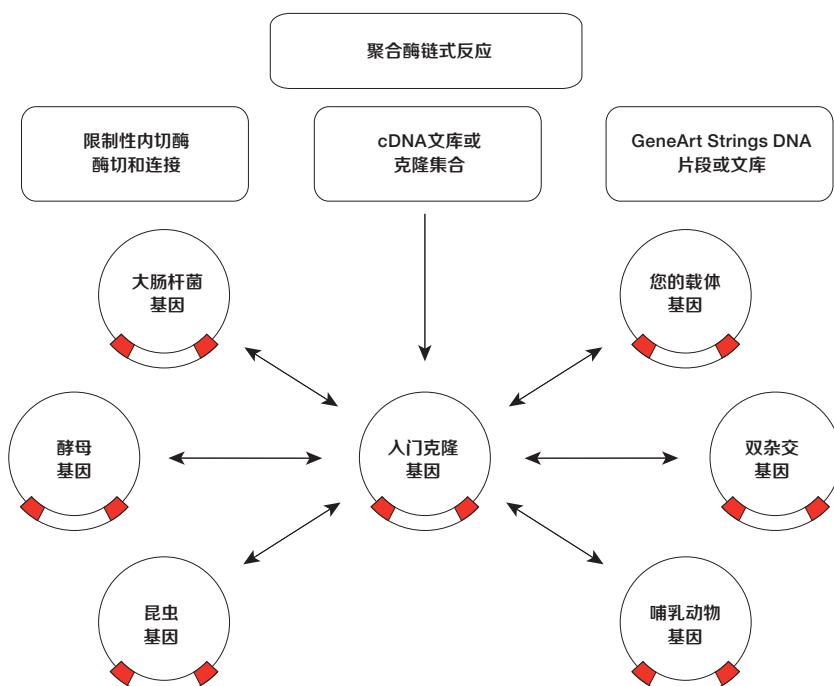


图1. Gateway技术通过位点特异性重组将基因克隆至多个载体内。一旦基因克隆至入门克隆后，您可以将DNA片段同时移至一个或多个目标载体内。

产品选择指南

了解各个阶段使用的产品

构建入门克隆

使用TOPO载体或PCR扩增/限制酶载体是构建入门克隆的最常见方法。

TOPO载体——可实现5分钟克隆和>95%的效率

pCR8/GW/TOPO克隆试剂盒

- 便于测序
- 利用壮观霉素抗性在大肠杆菌中进行稳定地筛选
- 两端有EcoRI位点，便于切除插入DNA

pENTR/D-TOPO载体

- 快速定向TOPO克隆
- 提供方向正确的插入片段
- 包含重组至任意目标载体所必需的attL序列
- 选择带有TEV蛋白酶酶切位点的载体，生成天然蛋白

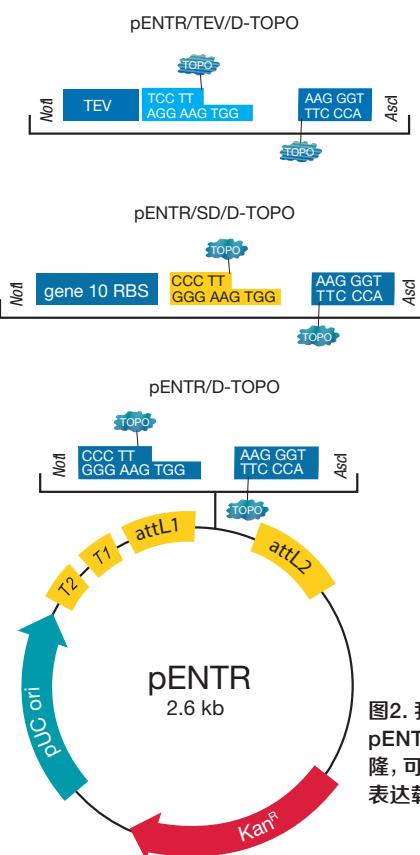


图2. 我们提供了多种Invitrogen™ pENTR™ 载体用于定向TOPO克隆，可以直接使用多种Gateway™ 表达载体。

PCR扩增或限制酶克隆载体

pDONR和pENTR载体

用含有 $attB$ 序列(Invitrogen™ pDONR™载体)或特定限制位点(Invitrogen™ pENTR™载体)的引物扩增获得的PCR产物。使用PCR生成入门克隆，两个短的人工合成的 $attB$ 序列($attB1$ 和 $attB2$)必须插入目的基因的侧翼并添加至用于扩增目的基因的特定引物中。通过BP Clonase II酶催化DNA片段与含有 $attP1$ 和 $attP2$ 序列的供体载体发生结合。

- >90%的菌落包含入门克隆(其中含有方向正确的目的基因)
- 最终的入门克隆可与任意Invitrogen™ Gateway™ 目标载体重组

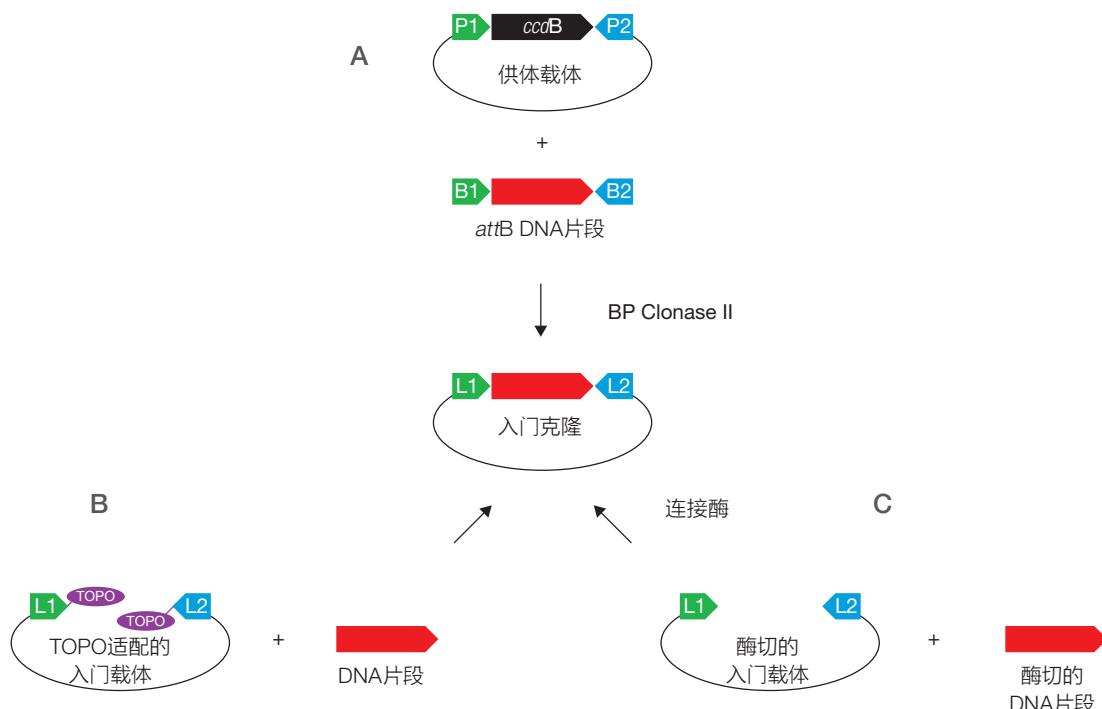


图3. 构建入门克隆的策略。构建入门克隆的方法有三种: (A) BP克隆, (B) TOPO克隆和 (C) 限制酶和连接酶克隆。红色箭头表示目的片段。摘自Katzen F (2007) Expert Opin Drug Discov 2(4):571–589。

Clonase酶混合物选择指南

	BP Clonase II酶混合物	LR Clonase II Plus酶混合物
应用	构建入门克隆	构建表达克隆
参与位点特异性重组的蛋白质	<ul style="list-style-type: none"> Int (整合酶) IHF (整合宿主因子) 	<ul style="list-style-type: none"> Int (整合酶) IHF (整合宿主因子) Xis (切割酶)
活性	<ul style="list-style-type: none"> DNA重组酶 DNA结合蛋白 高效实现入门克隆构建 单一混合物形式无需移液步骤，避免了手动操作错误 	<ul style="list-style-type: none"> DNA重组酶 DNA结合蛋白 最高的单片段和多片段克隆效率 适用于复杂的克隆反应 适用于MultiSite Gateway Pro技术
优点	<ul style="list-style-type: none"> 易于使用的单一混合物形式确保了酶的稳定性 方便的10 μL反应设置 	<ul style="list-style-type: none"> 易于使用的单一混合物形式确保了酶的稳定性 方便的10 μL反应设置

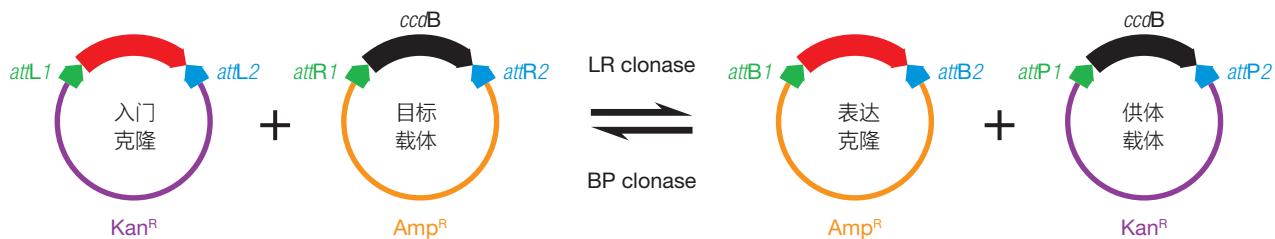


图4. Gateway反应。上图显示了Gateway克隆反应中的四种类型的质粒和酶混合物。红色箭头表示目的片段。摘自Katzen F (2007) Expert Opin Drug Discov 2(4):571–589。

目标载体选择指南

Gateway克隆技术尤其适用于蛋白表达。目标载体和宿主系统选择的灵活性和多样性特别适合多学科蛋白表达研究。

用于蛋白表达的目标载体

用于蛋白表达的宿主系统	Gateway目标载体系列
大肠杆菌	<ul style="list-style-type: none">• pDEST 14、15、17和24• pET160和pET161 DEST载体
酵母	pYES-DEST52
昆虫细胞	BaculoDirect C-末端表达试剂盒
哺乳动物细胞 (组成型表达)	pcDNA哺乳动物表达载体系列
哺乳动物细胞 (调控表达)	pT-Rex-DEST30和pT-Rex-DEST31载体
哺乳动物细胞 (病毒导入)	ViraPower慢病毒表达系统

用于其他应用领域的目标载体

应用	Gateway目标载体系列
抗体或抗原生产	Champion pET表达系统
定位	Vivid Colors pcDNA GFP目标载体系列
蛋白质芯片	Expressway Plus表达系统
蛋白质-蛋白质相互作用研究	利用Gateway技术的ProQuest双杂交系统
报告基因分析	GeneBLAzer pcDNA载体系列
RNAi	GeneBLAzer pcDNA载体系列

MultiSite Gateway Pro技术

高效、定向地组装多达四个DNA片段

MultiSite Gateway Pro试剂盒

如果您可以按照您想要的顺序和方向轻松且准确地组装多个DNA片段会怎么样？该方法称为Invitrogen™ MultiSite Gateway™ Pro技术，可以以协调一致的方式混合并匹配功能片段，生成多片段重组体。利用MultiSite Gateway Pro技术，您可以进行通路重建、多基因表达和调控、蛋白质相互作用研究等。

该方法适用于多种应用领域，包括蛋白质工程、信号通路和细胞工程，其提供了一种高度灵活的功能分析平台。

利用MultiSite Gateway Pro技术可以将多个片段以预定的顺序、方向及阅读框，同时组装至单个载体中，充分发挥Gateway克隆的功能（图5和6）。

1. 使用特定的包含attB的PCR引物对您的目的DNA元件进行PCR扩增。
2. 通过与两侧有attB的PCR片段和适当的pDONR载体进行Gateway BP重组，生成入门克隆。
3. 使用Gateway目标载体（带有attR1和attR2位点）重组入门克隆，生成表达质粒。

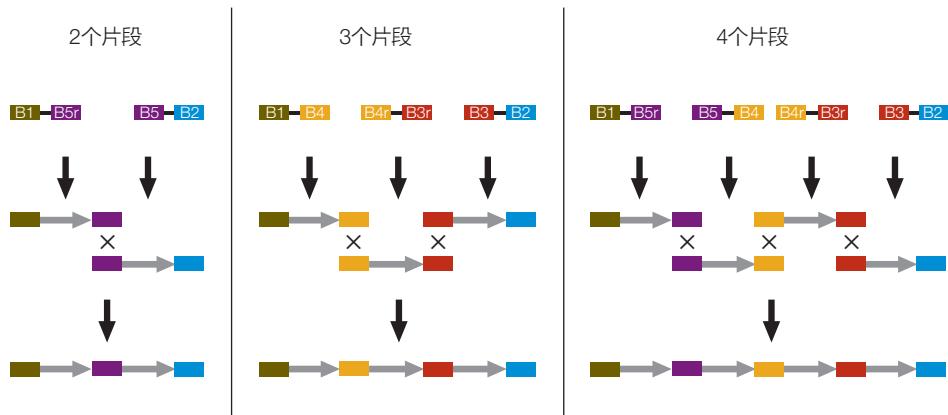


图5. MultiSite Gateway Pro技术的工作原理。

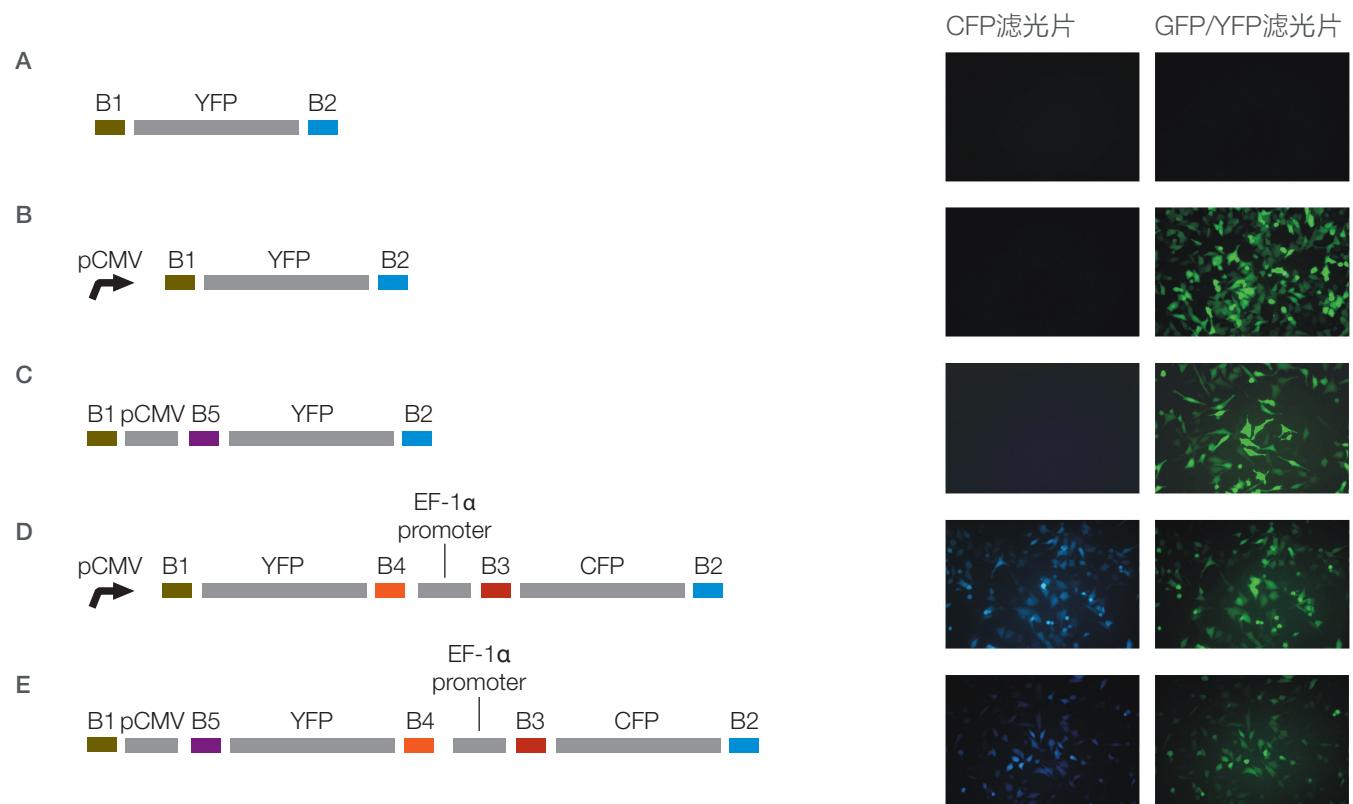


图6. 利用MultiSite Gateway Pro技术研究人细胞中的多种基因表达的范例。将含有YFP和CFP基因及CMV和EF-1 α 启动子的入门克隆重组至Invitrogen™ pcDNA™ 6.2/V5-PL-DEST载体(A、C和E)或Invitrogen™ pcDNA™ 6.2/V5-DEST载体(B和D)中。生成的表达克隆转染HeLa细胞。在荧光显微镜下观察表达。Invitrogen™ pcDNA™ 6.2/V5-PL-DEST载体是Invitrogen™ pcDNA 6.2/V5-DEST载体(携带CMV启动子)的无启动子版本。

订购信息

TOPO TA克隆

产品	说明	规格	货号
pCR8/GW/TOPO TA 克隆试剂盒	高效的TOPO TA克隆试剂盒可简化入门克隆构建	20次反应	K250020
pCR8/GW/TOPO TA 克隆试剂盒	高效的TOPO TA克隆及快速生长的大肠杆菌感受态细胞可缩短入门克隆的构建时间	20次反应	K252020
pCR8/GW/TOPO TA 克隆试剂盒	高效的TOPO TA克隆及快速生长和 PureLink™ 快速质粒小提试剂盒可大大缩短并简化入门克隆的构建，节省时间	20次反应	K252002

定向TOPO克隆

产品	说明	规格	货号
pENTR/D-TOPO 克隆试剂盒	定向TOPO克隆试剂盒生成可直接表达的入门克隆	20 次反应	K240020
pENTR/SD/D-TOPO 克隆试剂盒	定向TOPO克隆试剂盒，包括Shine-Dalgarno序列，可生成直接用于大肠杆菌表达的入门克隆	20 次反应	K242020
pENTR/TEV/D-TOPO 克隆试剂盒	定向TOPO克隆试剂盒，可生成直接用于大肠杆菌表达的入门克隆，带有5' TEV序列用于N-末端标签去除(形成天然蛋白)	20 次反应	K252520
pENTR/TEV/D-TOPO 克隆试剂盒	定向TOPO克隆试剂盒及快速生长的大肠杆菌感受态细胞可缩短入门克隆构建的时间，同时生成可直接表达的入门克隆，带有5' TEV序列用于N-末端标签去除(形成天然蛋白)	20 次反应	K253520

利用BP重组进行PCR克隆

产品	说明	规格	货号
利用Gateway技术的PCR 克隆系统	定向克隆至Gateway载体的全套试剂盒，包含pDONR 221载体及卡那霉素筛选	20次反应	12535029
利用Gateway技术的PCR 克隆系统	定向克隆至Gateway载体的全套试剂盒，包含pDONR/Zeo载体及博莱霉素抗生素筛选	20次反应	12535037
pDONR 221载体	包含pUC起始位点(可以获得高质粒产量) T7启动子、ccdB基因、氯霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因及通用M13测序位点(使用方便)	6 µg	12536017
pDONR Zeo载体	包含pUC起始位点(可以获得高质粒产量) T7启动子、ccdB基因、博莱霉素抗性基因及通用M13测序位点(使用方便)。还提供1.25 mL 博莱霉素选择性抗生素	6 µg	12535035

订购信息

限制酶克隆

产品	说明	规格	货号
pENTR 1A载体	限制酶克隆载体生成框内 (rf = 0)、可直接表达的入门克隆，包括Shine-Dalgarno和Kozak序列	10 µg	A10462
pENTR 2B载体	限制酶克隆载体生成框内 (rf = +1)、可直接表达的入门克隆	10 µg	A10463
pENTR 3C载体	限制酶克隆载体生成框内 (rf = +2)、可直接表达的入门克隆	10 µg	A10464
pENTR 4载体	与pENTR 1A载体相同，除MCS中用NcoI替代DraI，生成框内 (rf = 0)、可直接表达的入门克隆	10 µg	A10465
pENTR 11载体	与pENTR 1A载体相同，除MCS中用NspV替代DraI，生成框内 (rf = 0)、可直接表达的入门克隆	10 µg	A10467

利用Gateway技术进行多片段组装

产品	说明	规格	货号
MultiSite Gateway Pro Plus试剂盒	可将至多4个片段灵活克隆至Gateway目标载体中	20次反应	12537100
pcDNA 6.2/V5 PL-DEST载体	我们最常用的pcDNA载体的无启动子版本，可与任何MultiSite Gateway Pro试剂盒结合使用。载体具有C-末端V5和杀稻瘟菌素筛选	6 µg	12537162

BP Clonase酶

产品	说明	规格	货号
Gateway BP Clonase II酶混合物	专利的Int (整合酶) 和IHF (整合宿主因子) 蛋白混合物，可催化PCR产物或克隆和供体载体中的DNA片段的体外重组。	20次反应	11789020
Gateway BP Clonase酶混合物		100次反应	11789100
		20次反应	11789013
		100次反应	11789021

LR Clonase酶

产品	说明	规格	货号
Gateway LR Clonase II Plus酶混合物	专利的Int (整合酶)、IHF (整合宿主因子) 和Xis (切割酶) 混合物，可催化入门克隆和目标载体的体外重组	20次反应	12538120
Gateway LR Clonase II酶混合物		100次反应	12538200
Gateway LR Clonase酶混合物		20次反应	11791020
		100次反应	11791100
		20次反应	11791019
		100次反应	11791043

感受态细胞

产品	说明	规格	货号
One Shot <i>ccdB</i> Survival 2 T1R 感受态细胞	用于含有 <i>ccdB</i> 基因的质粒的扩增	10次转化	A10460

利用Gateway技术转换您的专利克隆载体

产品	说明	规格	货号
Gateway载体转换系统	使用限制性内切酶和连接酶将任意克隆载体转换为Gateway目标载体	20次反应	11828029

请登录thermofisher.com/gateway，了解最新的Gateway技术。

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588

成都

成都市临江西路1号川投大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

南京

南京市中央路201号金茂广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 010-87946888

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

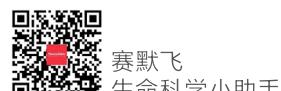
武汉

武汉市高新四路22号58众创光谷产业园A座1楼2~5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号与官方网站。



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC