

Gateway 系统构建双元表达载体

徐远涛, 郑雄杰, 曾云流, 徐强*

园艺植物生物学教育部重点实验室, 园艺林学学院, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: xuqiang@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 徐远涛, 郑雄杰, 曾云流, 徐强. (2018). Gateway 系统构建双元表达载体. *Bio-101* e1010201.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010201.

实验原理: Gateway 技术是基于已研究的非常清楚的 λ 嗜菌体位点特异重组系统 ($\text{attB} \times \text{attP} \rightarrow \text{attL} \times \text{attR}$)。BP 和 LR 两个反应就构成了 Gateway™ 技术。BP 反应利用一个 attB DNA 片段或表达克隆和一个 attP 供体载体之间的重组反应, 创建一个入门克隆。LR 反应是一个 attL 入门克隆和一个 attR 目的载体之间的重组反应。LR 反应用来在平行的反应中转移目的序列到一个或更多个目的载体。Gateway 利用了位点特异重组, 所以在构建入门载体后, 不再需要使用限制性内切酶和连接酶。一旦拥有一个入门克隆, 就可以多次使用它, 转移目的基因到 Gateway 改造过的各种表达载体。

实验目的: 利用 Gateway 技术构建双元表达载体, 主要包括超量表达载体、干涉载体以及启动子活性分析载体等, 用来进行转基因功能验证。本实验以构建甜橙基因 Cs7g29500 的超量表达载体为例。

关键词: Gateway, 载体构建, BP 反应, LR 反应

材料与试剂

1. 目的基因质粒
2. 目的基因正反向引物
3. BP 酶
4. LR 酶
5. 入门载体 (pDONR207, 庆大霉素抗性)
6. Gateway 超量表达终载体 (pK7WG2D, 壮观霉素抗性)
7. Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (诺唯赞, catalog number: P505-d1)

8. 大肠杆菌 Db3.0 感受态细胞
9. 其它材料试剂参见“PCR 扩增及克隆基因” (徐远涛和徐强, 2018)
10. 60%甘油 (见溶液配方)

仪器设备

1. 低温水浴锅
2. 其他设备参见“PCR 扩增及克隆基因” (徐远涛和徐强, 2018)

实验步骤

1. 目的基因 Cs7g29500 的克隆

1.1 根据基因 Cs7g29500 的 CDS 序列设计如下引物:

attB1_Cs7g29500-ox-F: AAAAAGCAGGCTCCAT**TGGCAATTCAGCATT****CAG**
AG

attB2_Cs7g29500-ox-R: AGAAAGCTGGGTT**TCATTGAAACTGTCTCT**

Adapter attB1: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT

Adapter attB2: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

绿色背景序列为 Cs7g29500 的 CDS 序列正反向引物, 同时加了接头序列 (下划线部分序列)。克隆其它任何基因时, 一般截取 CDS 起始密码子开始的 20 个碱基替换 attB1_Cs7g29500-ox-F 引物中的绿色背景序列, 截取 CDS 终止密码子往前 20 个碱基的反向互补序列替换 attB2_Cs7g29500-ox-R 引物中的绿色背景序列, 下划线部分序列不变。

1.2 第一轮 PCR 反应:

20 μl 体系:

双蒸水	7.7 μl
2xPhanta Max Buffer	10 μl
dNTPs (2mM each)	0.4 μl
attB_Cs7g29500-ox_F	0.5 μl
attB_Cs7g29500-ox_R	0.5 μl
目的基因质粒	0.5 μl
Phanta Max 酶	0.4 μl

PCR 程序:

Step 1: 95 °C	3 min
Step 2: 95 °C	15 s
Step 3: 55 °C	15 s
Step 4: 72 °C	30-60 s/kb
Step 5: goto Step 2-4, 34 个循环	
Step 6: 72 °C	5 min
Step 7: 12 °C	30 min

1.3 一轮 PCR 反应完成后, 取部分 PCR 产物跑胶检测用否清晰目的带。如有, 则取 1 μ l 剩余 PCR 产物作为模板, 进行第二轮反应。

1.4 第二轮 PCR 反应:

50 μ l 体系:

双蒸水	17 μ l
2xPhanta Max Buffer	25 μ l
dNTPs (2mM each)	1 μ l
attB_ Cs7g29500-ox_F	2.5 μ l
attB_ Cs7g29500-ox_R	2.5 μ l
一轮 PCR 产物	1 μ l
Phanta Max 酶	1 μ l

PCR 程序:

Step 1: 95 °C	3 min
Step 2: 95 °C	15 s
Step 3: 55 °C	15 s
Step 4: 72 °C	30-60 s/kb
Step 5: goto Step 2-4, 34 个循环	
Step 6: 72 °C	5 min
Step 7: 12 °C	30 min

1.5 50 μ l 反应产物全部在大孔胶上样, 跑胶, 切目的带回收, 用 Nanodrop 测回收产物浓度, 标记名为 attB-Cs7g29500-ox 以准备下步实验。

2. BP 反应

2.1. BP 反应及体系:

4 μ l BP反应体系	
attB-citA9-ox/ns	X
pDONR207	Y
ddH ₂ O	3.5-vol(X+Y)
BP clonase	0.5

其中, $X=(\text{质粒的大小} \times 16.5) / \text{质粒浓度}$; 质粒大小用 kb 表示, 比如 Cs7g29500 大小为 1.6 kb, 而浓度为 10 ng/ μ l, 则 $X=16.5 \times 1.6 / 10$; $Y=(\text{质粒的大小} \times 16.5) / \text{质粒浓度}$ (计算同 X, 但是 pDONR207 大小为约 5.5 kb), 一般质粒载体浓度调整为 150 ng/ μ l 使用。

2.2. 反应液在 25 °C 水浴至少 4 h 或过夜, 不需要终止反应而直接用于大肠杆菌转化, 方法参照“PCR 扩增及克隆基因” (徐远涛和徐强, 2018)。转化后 37 °C 培养过夜长出单克隆。PCR 鉴定阳性后, 挑单克隆菌液送测序, 确认序列正确无误后扩繁提质粒用于做 LR 反应 (质粒名称定为 pDONR207_Cs7g29500-ox)。

3. LR 反应

3.1. LR 反应及体系:

4 μ l LR反应体系	
pDONR207_CitA9-ox/ns	X
pK7WG2D	Y
ddH ₂ O	3.5-vol(X+Y)
LR clonase	0.5

其中, $X=(\text{质粒的大小} \times 16.5) / \text{质粒浓度}$; 质粒大小用 kb 表示, 比如 pDONR207-Cs7g29500-ox 大小约为 6kb, 而若质粒浓度为 100 ng/ μ l, 则 $X=16.5 \times 6 / 100$; $Y=(\text{质粒的大小} \times 16.5) / \text{质粒浓度}$ (计算同 X, 但是 pK7WG2D 大小约为 13 kb)。

3.2. 反应液在 25 °C 水浴至少 4 h 或过夜, 不需要终止反应而直接用于大肠杆菌转化, 方法参照“PCR 扩增及克隆基因”。转化后 37 °C 培养过夜长出单克隆。PCR 鉴定阳性后, 挑单克隆菌液送测序, 确认序列正确无误后扩繁提质粒 (质粒名

称定为 pK7WG2D_Cs7g29500-ox)。

注意事项

1. 常用入门载体主要有：pDONR207 (庆大霉素抗性)、pDONR201 (卡那霉素抗性)、pDONR221 (卡那霉素抗性)。载体上含有 *ccdB* 致死基因，不能通过常用 Trans 5 α *E. coli* 感受态细胞来扩繁，需要用抗 *ccdB* 致死基因的感受态 Db3.0 来扩繁。
2. Gateway 载体非常丰富，可以满足各种转基因需求，可以在专业网站：<https://gateway.psb.ugent.be/search> 查询载体详细信息。
3. Gateway 系统中载体一般都为壮观霉素和抗性，做克隆时确保使用含相应抗生素的平板。
4. 在 BP 反应后，检测单克隆阳性所用引物为目的基因引物或者 attB1 和 attB2 或者组合引物；测序所需引物为：PDONR-F: TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC；PDONR-R: GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC。此为公共引物，测序公司可以会免费提供。pDONR221 载体也可用 M13 引物检测阳性和测序。
5. 在 LR 反应后，检测单克隆阳性所用引物为目的基因引物或者 attB1 和 attB2 或者组合引物；测序所需引物为：最好选择载体上的正向引物和基因本身的反向引物，比如：正向引物用 35S，反向引物用 attB2_Cs7g29500-ox-R。也可以用 attB1、attB2 测序。
6. 获得序列正确的入门载体和终载体克隆之后，质粒保存于 -20 °C 冰箱，同时将菌液与 60%甘油等体积 2:1 混合，甘油终浓度为 20%，-80 °C 超低温冰箱保存。

溶液配方

1. 60%甘油

300 ml 甘油与 200 ml 双蒸水在 500 ml 蓝盖瓶中混合，121 °C、15 min 灭菌，常温无菌保存备用

参考文献

1. 徐远涛，徐强. (2018). [PCR 扩增及克隆基因](#). *Bio-101* e1010202. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010202.