

§ 高新技术快报 §

GATEWAY™——一种新型克隆技术

(美国生命技术公司 北京 100044)

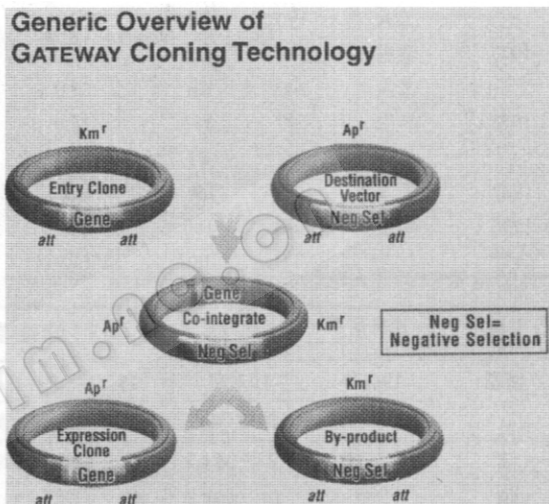
GATEWAY™克隆技术是一种新的通用型克隆系统,它整合了各种载体的技术平台,可加快达到最终研究目标的速度,通过位点特异性的重组整合,专利的 GATEWAY™系统提供基因功能分析、蛋白表达、DNA 片段克隆(亚克隆)最有效和快速的途径。

为了响应日益增长的更快更好地克隆和表达 DNA 序列的要求,Life Technologies (GIBCO / BRL)发展的 GATEWAY™克隆技术克服了许多与两种惯用的方法:酶切和连接、PCR 产品克隆相关的制约因素。GATEWAY™克隆技术乃基于已被详尽研究的λ噬菌体位点特异性重组系统。它使得在不同的克隆载体之间转移 DNA 片段、保持基因定位和阅读框架、及有效地取代使用内切酶和连接酶进行克隆和亚克隆的方法成为可能。它也是一种用于高效地直接克隆 PCR 产物的便利方法。

GATEWAY™技术的工作原理是将置于重组位点(att 位点)的目标 DNA 片段与适当的 GATEWAY™载体和 GATEWAY CLONASE™酶混合(见附图)。在 att 位点之间的位点特异性重组过程中产生了一个“共整合”分子,它可以随即分解成两个分子,其中一个在新的载体骨架中含有目标 DNA 片段(产物)。通过阴性和阳性筛选,只有目标克隆被高效(> 90%)回收。

GATEWAY™具有与其他方法相比明显的优势:

- * 简单快速的反应:在室温 60min 后即可转化 *E. coli*。
- * 克隆效率高: > 90% 甚至 > 99% 的克隆是目标克隆。
- * 快速直接克隆 PCR 产品。
- * 特异性反应:保持阅读框架和基因定位。



GATEWAY™技术可以快速直接地克隆 PCR 产品。通过在 PCR 引物中引入 attB 重组位点,将产物与含有 attP 位点和 GATEWAY BP CLONASE™酶混合,然后转化 *E. coli*。在得到的克隆“入门载体”中目标基因位于重组位点之间,含有目标基因的“入门克隆”也可通过使用内切酶和连接酶的方法得到或者通过在 GATEWAY™兼容的载体中获得的文库中重组而来。

“入门克隆”可用于将 DNA 片段自动地转移到任何数量的期望的目标载体,从而使得启动子、融合位点(N-端或 C-端)和目标载体的骨架与转移的目标 DNA 片段连接。这种转移是高效的并且保持了基因定位和阅读框架。相应的“表达克隆”可进一步通过和含有 att P 位点的载体反应而生成“入门克隆”。