

EZShuttle™ Recombination Cloning System

EZRecombinase™ LR Mix

Cat. No. ER001 (Old Cat. No. RCBM-1001-020, 20 reactions)

Cat. No. ER002 (Old Cat. No. RCBM-1001-100, 100 reactions)

EZRecombinase™ BP Mix

Cat. No. ER003 (Old Cat. No. RCBM-1002-020, 20 reactions)

Cat. No. ER004 (Old Cat. No. RCBM-1002-100, 100 reactions)

User Manual

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive, #101
Rockville, MD 20850
USA

301-762-0888

inquiry@genecopoeia.com
www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司

地址：广州科学城揽月路3号F区F801（510663）

电话：4006-020-200、020-28069288、020-28069233

网站：www.igenebio.com

使用说明书

EZShuttle™ 重组克隆体系

- I. 概述
- II. 产品信息及储存条件
- III. 产品使用流程
- V. 有限使用许可协议及质量保证

I. 概述

GeneCopoeia提供的EZShuttle™ 重组克隆系统应用*E.coli* 和 λ 噬菌体特异位点的重组酶促体系能使DNA片段高效、精确、快速的从一个载体转移到另一个载体；其原理与Gateway®克隆技术相同。

EZRecombinase™ BP mix包含Int (λ Integrase) 和IHF (*E.coli* Integration Host Factor)，催化含有attB位点的DNA片段与pGate™ 载体或Gateway® pDONR™ 载体的attP位点进行重组反应，生成新的EZShuttle™ Gateway® PLUS穿梭克隆或Gateway® Entry clone。将 attB-PCR产物或Expression clone 与 pShuttle™ 载体混合，然后加入 EZRecombinase™ BP mix，室温（25℃）反应 1 小时后用于转化 *E.coli* 感受态细胞（图1）。

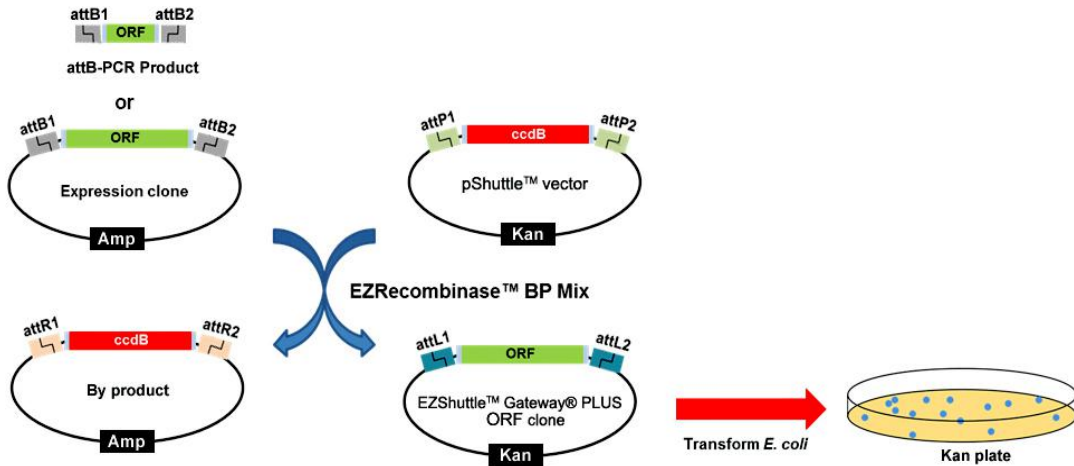


图1、一步法将含有 attB 位点的 DNA 片段转移到 pShuttle™ 载体或 Gateway® pDONR™ 载体。

EZRecombinase™ LR Mix包含Int (λ Integrase)、IHF (*E. coli* Integration Host Factor)和Xis (Excisionase)。EZShuttle™克隆体系将DNA片段从含有attL位点的EZShuttle™或Gateway® Entry clone (入门克隆)转移到含有attR位点的表达载体。将EZShuttle™或Gateway® Entry clone (入门克隆)与表达载体混合,然后加入EZRecombinase™ LR mix,室温(25°C)反应1小时后即可用于*E. coli*的转化(图2)。

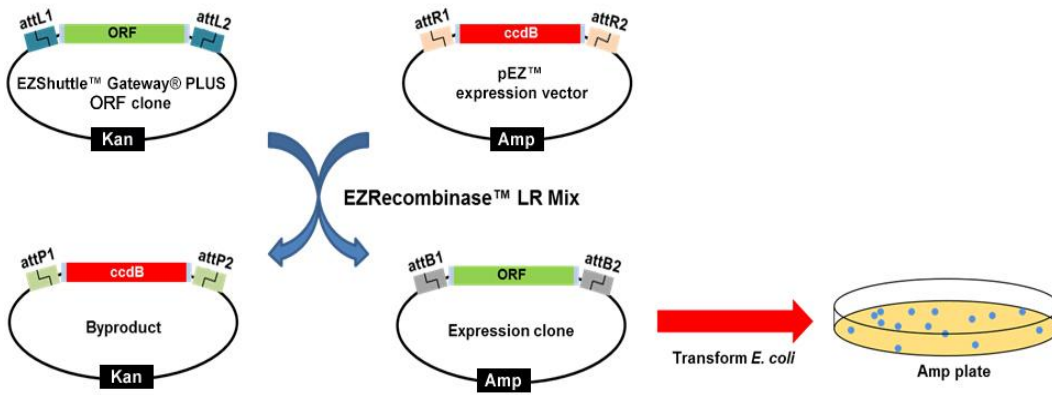


图2、一步法从EZShuttle™或Gateway®入门克隆转移DNA片段到pEZ™表达载体或Gateway® pDEST载体。

EZRecombinase™ LR Cloning Kit是组成EZShuttle™克隆体系的一部分。EZShuttle™克隆体系主要包含以下几项内容:

- **EZRecombinase™ Mix:** EZRecombinase™ BP Mix 催化attB x attP重组反应; EZRecombinase™ LR Mix 催化attB x attP重组反应。
- **pShuttle™ cloning vector:** pShuttle™载体可以高效、快速的与EZShuttle™表达克隆或带有attB位点的DNA片段在EZRecombinase™ BP Mix作用下发生重组反应,生成新的EZShuttle™ Gateway® PLUS穿梭克隆或Gateway® Entry clone,其功能与Gateway® pDONR™载体相同。
- **pEZ™ vectors:**主要用于通过LR重组反应构建即用型表达克隆;与GeneCopeia's Shuttle™ Gateway® PLUS穿梭克隆或Gateway®入门克隆不同,这些载体带有化学筛选标记。
- **EZShuttle™ Gateway® PLUS ORF clones:** GeneCopeia提供约35,000种人和小鼠的EZShuttle™ Gateway® PLUS穿梭克隆,终止密码子可选。EZShuttle™ Gateway® PLUS穿梭克隆与Gateway® Entry clone一样,在EZRecombinase™ LR Mix作用下可以高效、快速地将DNA片段转移到任何pEZ™载体或其它与Gateway®相兼容的目的载体中。EZShuttle™ Gateway® PLUS穿梭克隆带有多克隆位点,也可用于经典的酶切-连接克隆过程。

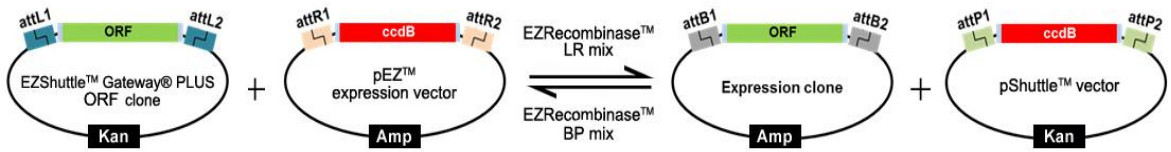


图3、EZShuttle™ 重组克隆体系是克隆和亚克隆DNA的一种操作方法。BP和LR重组反应使DNA片段在不同的载体间进行转换。

II. 产品信息及储存条件

1. EZRecombinase™ LR Mix

货号：ER001 (20 reactions), ER002 (100 reactions)

组分货号	产品内容	包装规格 20 reactions 100 reactions	寄送条件	储存条件
ER001-01	EZRecombinase™ LR Mix	80 µl 80 µlx 5	干冰	-80° C 至少保存1年
ER001-02	5×Reaction Buffer	80 µl 80 µlx 5	干冰	-20° C 至少保存6个月
ER001-03	Positive control (Shuttle clone eGFPp, 100 ng/µl)	20 µl 20 µlx 5	干冰	-20° C 至少保存6个月

试剂盒外必备其它主要试剂

- EZShuttle™ clone 或 Entry clone DNA
- pEZ™ 表达载体或 Destination vector DNA
- TE buffer, pH 8.0
- 感受态细胞【易锦产品货号 CC001 (DH5α 感受态细胞)、CC003 (Stbl3 感受态细胞)、U0104A (2T1 感受态细胞)】
- S.O.C 培养基

2. EZRecombinase™ BP Mix

货号：ER003 (20 reactions), ER004 (100 reactions)

组分货号	产品内容	包装规格 20 reactions 100 reactions	寄送条件	储存条件
ER003-01	EZRecombinase™ BP Mix	80 µl 80 µl x 5	干冰	-80° C 至少保存1年
ER003-02	5× Reaction Buffer	80 µl 80 µl x 5	干冰	-20° C 至少保存6个月
ER003-03	Positive control (attB-PCR Product, ~1.9kb, 100 ng/µl)	20 µl 20 µl x 5	干冰	-20° C 至少保存6个月

试剂盒外必备其它主要试剂

- attB-PCR Product 或 Expression clone DNA
- attP-containing plasmid vector DNA (pShuttle™ cloning vector 或 Gateway® pDONR™ vector)
- TE buffer, pH 8.0
- 感受态细胞【易锦产品货号CC001 (DH5α 感受态细胞)、CC003 (Stbl3 感受态细胞)、U0104A (2T1 感受态细胞)】
- S.O.C 培养基

III. 产品使用流程

1. LR Recombination reaction

请根据以下实验步骤进行attL x attR重组反应和转化。

1. 从-80°C冰箱取出 EZRecombinase™ LR Mix(ER001-01)，冰水放置2分钟，短暂漩涡2次，2秒/次。
2. 在室温下加以下试剂到 1.5 ml EP 管内并混匀：

试剂名称	体积
EZShuttle™ (or Gateway® Entry clone) (100-300 ng)	1-10 μ l
pEZ™ vector (or Gateway® pDEST vector) (150 ng/ μ l)	2 μ l
5x Reaction Buffer	4 μ l
TE buffer, pH 8.0	加至 16 μ l
总体积	16 μl

3. 加 4 μ l EZRecombinase™ LR Mix (ER001-01)到反应管里，充分混匀。
4. 短暂离心，以确保所有试剂在反应管底部。
5. 置 25 °C反应 60 分钟。

*** 使用后，EZRecombinase™ LR Mix(ER001-01) 应立即放回-80 °C冰箱。**

转化

1. 把感受态细胞置于冰中解冻。
2. 用移液枪吸取 4 μ l 反应产物移至灭菌1.5 ml EP管内，加入 50-100 μ l 的感受态细胞，冰浴 30 分钟。
3. 42 °C 热激 45 秒，然后冰浴 2-3 分钟。
4. 加入 500 μ l S.O.C 培养基，于 37 °C振荡培养1小时（200 或 220 rpm）。
5. 分别取 50 μ l 和 200 μ l 培养物涂布含有与 pEZ™ vector (or Gateway® pDEST vector) 一样抗性的琼脂糖平板。

*** 不建议转化物全部涂板，以免长菌太多影响后续筛选工作。**

6. 37 °C培养 12-16 小时。

2. BP Recombination reaction

请根据以下实验步骤进行attB x attP重组反应和转化。

1. 从-80℃冰箱取出 EZRecombinase™ BP Mix(ER003-01)，冰水放置2分钟，短暂漩涡2次，2秒/次。
2. 在室温下加以下试剂到 1.5 ml EP 管内并混匀：

Item	Amount
attB-PCR product or clone (≥10 ng/μl, 100-300 ng)	1-10 μl
pShuttle™ vector or Gateway® pDONR vector (150 ng/ul)	1 μl
5x Reaction Buffer	4 μl
TE buffer, pH 8.0	加至 16 μl
总体积	16 μl

3. 加 4 μl EZRecombinase™ BP Mix(ER003-01) 到反应管里，充分混匀。
4. 短暂离心，以确保所有试剂在反应管底部。
5. 置 25 °C反应 60 分钟。

*** 使用后，EZRecombinase™ BP Mix(ER003-01) 应立即放回-80℃冰箱。**

转化

1. 把感受态细胞置于冰中解冻。
2. 用移液枪吸取 4 μl 反应产物移至灭菌1.5 ml EP管内，加入 50-100 μl 的感受态细胞，冰浴 30 分钟。
3. 42 °C 热激 45 秒，然后冰浴 2-3 分钟。
4. 加入 500 μl S.O.C 培养基，于 37 °C振荡培养1小时（200 或 220 rpm）。
5. 分别取 50 μl 和 200 μl 培养物涂布含有与 pShuttle™ vector（or Gateway® pDONR vector）一样抗性的琼脂糖平板。

*** 不建议转化物全部涂板，以免长菌太多影响后续筛选工作。**

6. 37 °C培养 12-16 小时。

V.有限使用许可协议及质量保证

有限使用许可协议

以下条款适用于GeneCopoeia所有得产品。如果不接受以下条款，所有的产品必须在5个工作日内返回GeneCopoeia。GeneCopoeia的产品仅限购买方内部研究使用，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。GeneCopoeia的产品不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经GeneCopoeia的书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。此产品必须按照国家卫生研究院的DNA重组和基因研究的指导方针使用。

有限质量保证

GeneCopoeia保证您收到的产品符合产品目录上的规格。如果GeneCopoeia的产品未能满足这些规格，GeneCopoeia将替换该产品。如果不能提供替换产品，GeneCopoeia将退款给购买方。这个有限质量保证不得延伸至产品的原始购买者以外的人。如果产品与订购信息不符，所有的产品必须在30天内返回GeneCopoeia。GeneCopoeia的责任仅限于替换产品，且退款只限于实际的购买价格。GeneCopoeia不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。GeneCopoeia不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。

•GeneCopoeia致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果你对我们的产品有任何问题和担忧，请与我们联系，电话：301-762-0888。

© 2020 GeneCopoeia, Inc.