

EZShuttle™ Recombination Cloning System

EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix

Cat. No. ER011

Cat. No. ER012

EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix

Cat. No. ER013

Cat. No. ER014

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编: 510663

电话: 4006-020-200

邮箱: sales@igenebio.com

网址: www.genecopoeia.com (英文)

www.igenebio.com (中文)

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
- IV. 查错指南
- V. 附录
- VI. 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 II Enzyme Mix是一种由专有酶和缓冲液组成的混合试剂。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 II Enzyme Mix，室温(25℃)反应1小时后用于转化E.coli感受态细胞（图1）。

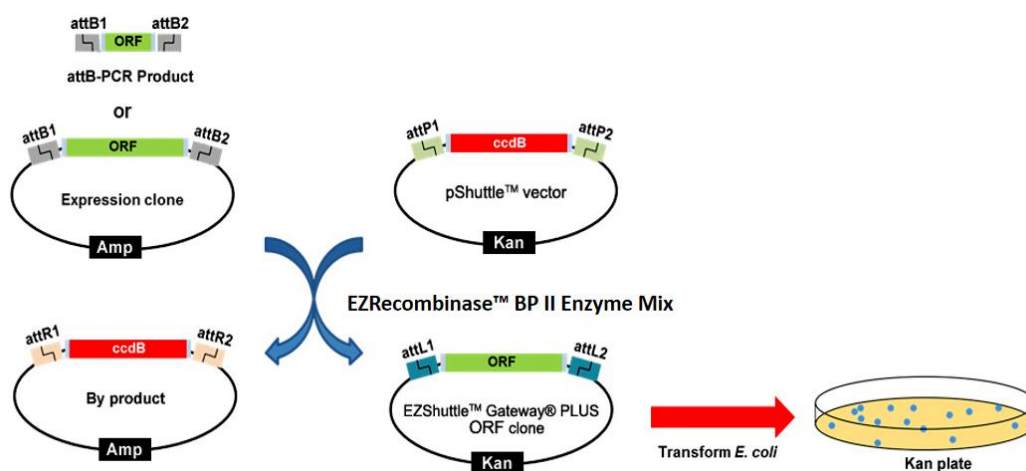


图 1. 一步法将含有 attB 位点的 DNA 片段转移到 pShuttle™载体或 Gateway® pDONR™载体。

EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix是一种由专有酶和缓冲液组成的混合试剂。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 II Enzyme Mix，室温(25℃)反应1小时后即可用于E.coli的转化（图2）。

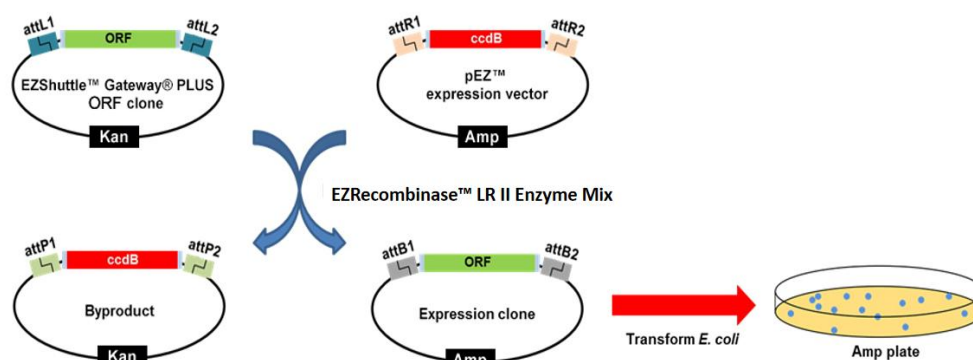


图2. 一步法从EZShuttle™或Gateway®入门克隆转移DNA片段到pEZ™表达载体或Gateway® pDEST载体。

EZShuttle™克隆体系主要包含以下几项内容：

- **EZRecombinase™ Mix:** 是一种由专有酶和缓冲液组成的混合试剂。EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix 催化 attB x attP 重组反应; EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix 催化 attL x attR 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 II Enzyme 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的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 II Enzyme 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。

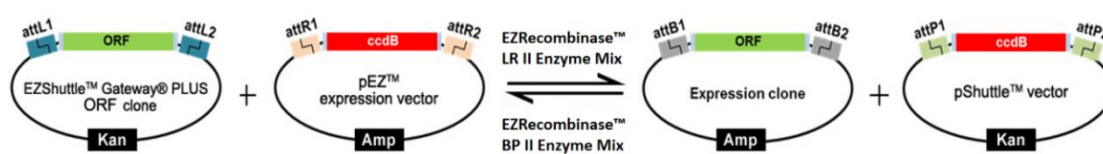


图3. EZShuttle™重组克隆体系是克隆和亚克隆DNA的一种操作方法。BP和LR重组反应使DNA片段在不同的载体间进行转换。

II. 产品信息及储存条件

1. EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix

货号: ER013 (20 reactions), ER014 (100 reactions)

产品信息	组分	组分货号	规格	储存温度
ER013 (20 reactions)	EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix	ER013-01	40 µl	-20℃ 保存 6 个月
	Positive control (attB-PCR Product, ~1.9kb, 100 ng/µl)	ER013-02	10 µl	

Cat. No: ER014 (100 reactions) 由 5 个 ER013 组装。

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: 易锦生物提供 CC001 (DH5α感受态细胞)、CC003 (Stbl3 感受态细胞)、CC007 (2T1 感受态细胞)
- S.O.C 培养基 (配制见附录)

2. EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix

货号: ER011 (20 reactions), ER012 (100 reactions)

产品信息	组分	组分货号	规格	储存温度
ER011 (20 reactions)	EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix	ER011-01	40 µl	-20℃ 保存 6 个月
	Positive control (Shuttle clone eGFPp, 100 ng/µl)	ER011-02	10 µl	

Cat. No: ER012 (100 reactions) 由 5 个 ER011 组装。

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: 易锦生物提供 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 (配制见附录)

III. 产品使用流程

❖ 1. EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix (ER013/ER014)

1.1 BP 重组反应

请根据以下实验步骤进行 attB x attP 重组反应和转化。

- 1) 从-20℃冰箱取出 EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix (ER013-01)，冰上放置 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：

组分	体积
attB-PCR product 或 clone (≥10 ng/μl, 100-300 ng)	1-7 μl
pShuttle™ vector 或 Gateway® pDONR vector (150 ng/μl)	1 μl
TE buffer, pH 8.0	加至 8 μl
总体积	8 μl

注：请使用纯化后的 attB-PCR product。

- 3) 加 2 μl EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix (ER013-01)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℃反应 60 分钟。

***使用后，EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix (ER013-01)应立即放回-20℃冰箱。**

1.2 转化

- 1) 把感受态细胞置于冰中解冻。
- 2) 用移液枪吸取 2 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℃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℃振荡培养 1 小时（200 或 220 rpm）。
- 5) 分别取 50 μl 和 200 μl 培养物涂布到含有与 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℃培养 12-16 小时。

❖ 2. EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix (ER011/ER012)

2.1 LR 重组反应

请根据以下实验步骤进行 attL x attR 重组反应和转化。

- 1) 从-20℃冰箱取出 EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix (ER011-01)，冰上放置 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：

组分	体积
EZShuttle™ (或 Gateway® Entry clone) (100-300 ng)	1-7 µl
pEZ™ vector (或 Gatewayt® pDEST vector) (150 ng/µl)	1 µl
TE buffer, pH 8.0	加至 8 µl
总体积	8 µl

- 3) 加 2 µl EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix (ER011-01)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℃反应 60 分钟。

***使用后，EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix (ER011-01)应立即放回-20℃冰箱。**

2.2 转化

- 1) 把感受态细胞置于冰中解冻。
- 2) 用移液枪吸取 2 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℃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℃振荡培养 1 小时（200 或 220 rpm）。
- 5) 分别取 50 µl 和 200 µl 培养物涂布到含有与 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℃培养 12-16 小时。

IV. 查错指南

问题	造成原因	建议
样本长菌数较少或没有，但阳性对照正常	转化实验抗生素使用错误	检查使用的抗生素是否与入门克隆或表达克隆一致
	att 位点使用错误	入门克隆(attL)和目的载体(attR)用于 LR 反应； 表达克隆（或 attB-PCR product）和 pShuttle™载体 (attP)用于 BP 反应；
	EZRecombinase™ LR 或 BP Enzyme Mix 失活，或未根据推荐用量使用	测试另一份 EZRecombinase™ LR 或 BP Enzyme Mix； 确认试剂盒按标签提示温度储存； EZRecombinase™ LR 或 BP Enzyme Mix 冻融次数不超过 10 次； 严格按照说明书推荐用量进行实验；
	LR 或 BP Enzyme Mix 使用错误	LR Enzyme Mix 用于 LR 反应；BP Enzyme Mix 用于 BP 反应；
	BP 反应中 attB-PCR product 投入过量	减少 attB-PCR product 用量，使用等量（fmol）的 attB-PCR product 和 pShuttle™载体
	attB-PCR product 或线性化的 attB 表达克隆≥5kb	增加 attB-PCR product 的用量； BP 反应时间延长至过夜；
	attB PCR 引物设计不当	核实 attB PCR 引物包含 attB1 或 attB2 位点
	LR 反应中入门克隆投入过量	使用等量（fmol）的目的载体和入门克隆
出现大小不同的菌落	目的载体或入门克隆≥10kb	LR 反应时间延长至过夜； 将目的载体和入门克隆线性化； 使用拓扑异构酶 I 处理目的载体；
	LR 反应：小菌落可能是未反应的入门克隆与表达克隆的共转化结果。	降低入门克隆用量； 降低转化产物的用量； 增加目的载体筛选抗性（Amp ⁺ ）的浓度至 300μg/ml
	BP 反应：pShuttle™ 载体或供体载体的 ccdB 基因存在突变或缺失（阴性对照组出现类似的菌落情况）	重新购买 pShuttle™载体或供体载体
阳性对照长菌数较少或没有	菌落生长过程质粒丢失（通常发生在大片段基因或毒性基因的实验）	筛选平板培养温度调整为 30℃； 确认菌落中的 DNA 是否发生缺失； 使用 StbI3 感受态维持大基因的稳定复制；
	感受态细胞储存不当	感受态细胞应储存于-80℃
	转化操作不当	核对转化操作步骤
	感受态细胞效率低	使用>1.0×10 ⁸ transformants/μg 的感受态细胞

V. 附录

试剂配方

SOC medium (100ml)

2% (W/V)	Bacto Tryptone
0.5% (W/V)	Bacto Yeast Extract
0.05% (W/V)	NaCl
2.5mM	KCl

pH 值调至 7.0, 灭菌后冷却到 60°C以下。加入 MgCl₂ 溶液（终浓度为 10mM）和除菌的葡萄糖溶液（终浓度为 20mM）。

LB 培养基(Luria-Bertani 培养基)

配制 1L 培养基，于 950mL 去离子水中加入：

10g	胰蛋白胨
5g	酵母抽提物
10g	NaCl

摇动容器直至溶质完全溶解。用 5 mol/L NaOH (约 0.2mL) 将 pH 调至 7.0。用去离子水定容至 1L。
15psi(1.05 kg/cm²) 压力条件下液体循环高压蒸汽灭菌 20min。

VI 有限使用许可和保证

有限保证

GeneCopoeia 保证该产品（EZRecombinase™ LR II Enzyme Mix, EZRecombinase™ BP II Enzyme Mix）符合产品手册上的说明。如果证明该产品与产品说明信息不符，购买方须将该产品在 5 个工作日内返还回给 GeneCopoeia，而 GeneCopoeia 将免费替换该产品。如果不能提供替换产品，GeneCopoeia 将退款或 credit 给购买方。此保证仅限于产品的原始购买者，且不得延伸至原始购买者以外的使用者。GeneCopoeia 的责任仅限于替换，退款或 credit（指选择不退款，剩余款项用于后续购买产品的支付）该产品，且退款或 credit 只限于实际的购买价格但不包括寄送费用。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、衍生的或偶然的损失所产生的后果负责。GeneCopoeia 提供此唯一保证。GeneCopoeia 对于产品的适销性以及任何特定使用用途不再提供任何其他保证。

有限使用许可

购买方需同意接受以下有限使用许可条款。GeneCopoeia 的产品仅限于购买方内部研究使用，不可以任何方式转让给第三方；不可用于包括人类或诊断及治疗在内的其他用途。未经 GeneCopoeia 的书面批准，不得对此产品进行更改、重新包装、转售或用于制作商业化产品。此产品须按 NIH 指南用于 DNA 重组和基因研究。对此产品任何使用都构成对以上条款的承诺和接受。

GeneCopoeia 致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果您对我们的产品有任何问题和担忧，请与我们联系：020-28069233。

ER-040225

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。