

## 人基因开放阅读框(ORF)库

产品编号	产品名称	包装
T0208	人基因开放阅读框(ORF)库	1套

### 产品简介:

- 碧云天的人基因开放阅读框(ORF)库(Human Open Reading Frame library)包含约15,000个人基因ORF克隆, 其中包括已知的基因约12,000种。本人基因ORF库的每一种质粒都来自于单克隆, 并且每一个ORF都经过了测序验证。后续使用Gateway系统或PCR反应即可非常方便地克隆目的基因到新的表达载体中。
- 本人基因ORF库的克隆在供体载体(Donor vector) pDONR223中, 其图谱如图1所示。

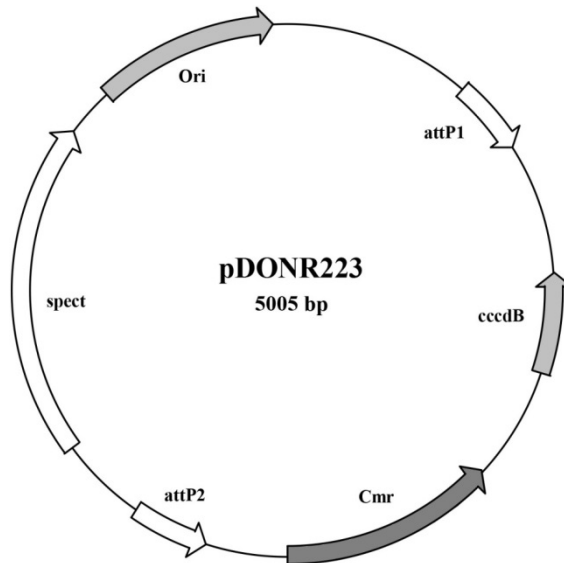


图1. pDONR223质粒图谱。pDONR223的全序列信息: 请参考碧云天网站上本产品的相关信息。

- ORF克隆是指起始密码子和终止密码子之间的编码序列, 而不包含mRNA的5'和3'端的非编码区(untranslated region, UTR)。本ORF库是通过mRNA反转录获得的编码蛋白质的cDNA, 再通过Gateway技术的BP重组反应克隆到pDONR223载体中得到入门载体, 其重组位点的序列如图2所示。为了便于后续利用Gateway系统添加适当的3'标签, 所有的克隆都无终止密码子。在碧云天的人基因ORF库中, 每一个克隆都代表一个独立的插入序列, 随机挑取克隆测序, 准确率为95%, 但较长基因克隆准确率略差。



图2. ORF两侧的重组序列

- 碧云天的人基因ORF库提供的是含有相应ORF质粒的大肠杆菌甘油菌(DH5 $\alpha$ ), 本产品一套共169块96孔板。克隆载体为pDONR223, 载体抗性spectinomycin, 推荐使用终浓度为50 $\mu$ g/ml。正向测序M13F引物序列为GTAAAACGACGGCCAGT, 反向测序T7引物序列为TAATACGACTCACTATAGG。
- 人基因开放阅读框(ORF)库基因清单: 请参考碧云天网站上本产品的相关信息。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
T0208	人基因开放阅读框(ORF)库	1套
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 二年有效。-80 $^{\circ}$ C保存, 五年有效。

### 注意事项:

- pDONR223载体不能直接在细菌或哺乳动物细胞中表达相应蛋白, 需要重新克隆至相应表达载体才能表达。

- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明：

1. 根据所需人基因ORF的名称，查询并选取相应的96孔板及孔进行菌种的接种培养。
  - a. 划平板随后挑取单克隆培养：取出对应的96孔板置于冰上，并在超净台内进行后续操作。等菌液稍融化，撕开封口膜，并小心揭开96孔板盖，注意不要交叉污染。按照如下方法之一划平板接种，随后挑取单克隆接种到含抗生素的LB中培养。
    - (a) 用镊子和塑料枪头操作：镊子的顶端在70%酒精中蘸一下，并且在酒精灯上略略烧一下，使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的200微升塑料枪头，蘸取少量DH5 $\alpha$ 甘油菌，然后把蘸有菌液的塑料枪头，以尽量和LB平板接近平行的角度，在含50 $\mu$ g/ml spectinomycin的LB平板上连续作S形或Z形划动，再用一无菌的200微升塑料枪头，在原先的划线上以90或120度角，再在LB平板上连续作S形或Z形划动。通常换枪头重复操作2-3次即可。37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。
    - (b) 用接种环操作：将接种环在酒精灯上略略烧一下，使接种环处于无菌状态。微冷后，蘸取少量DH5 $\alpha$ 甘油菌，在含50 $\mu$ g/ml spectinomycin LB平板上连续作S形或Z形划动。把接种环再烧一下，微冷后，在原先的划线上以90或120度角，再在LB平板上连续作S形或Z形划动。通常用接种环重复操作2-3次即可。37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。
  - b. 直接培养：取出对应的96孔板置于冰上，并置于超净台内，后续操作都在超净台内操作。把镊子的顶端在70%酒精中蘸一下，并且在酒精灯上略略烧一下，使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的塑料枪头或牙签，蘸取少量DH5 $\alpha$ 甘油菌，然后把蘸有菌液的塑料枪头或牙签放到装有3毫升含50 $\mu$ g/ml spectinomycin 的LB细菌培养试管内或装有100毫升或更大体积LB的细菌培养瓶内。37 $^{\circ}$ C，约200rpm培养过夜。
2. 对于培养的菌液进行质粒的小量、中量或大量抽提。
3. 重组或PCR克隆：人基因ORF库的每一个蛋白质编码序列两端有特异的重组序列。通过LR重组反应可以将ORF转移到特定接收载体中，例如Gateway系统的pDEST系列载体等，从而使目的基因在大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或哺乳细胞等中表达；也可以此ORF库作为模板用PCR或其它常规方法克隆到其它蛋白表达载体中用于在细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞等中的表达。

Version 2019.02.19