

pBM16K Toposmart克隆试剂盒

(pBM16K Toposmart Cloning Kit)



产品信息:

组 成	CL072-01 (20次)	CL072-02 (20次x3)
pBM16K Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert LacZα	5μl	5μl
M13F Primer(使用前加入60μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
M13R Primer(使用前加入60μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3

保存条件: -20℃保存, 有效期一年。

产品介绍:

pBM16K Toposmart克隆试剂盒利用痘苗病毒的拓扑异构酶I(Topoisomerase I)的切割再连接的特点将片段克隆到载体中。不仅适用于克隆由Pfu、sPfu、KOD、Xerox、Phusion和Q5等高保真DNA聚合酶扩增的平末端PCR产物, 也可克隆由Taq、Taq plus、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的带A尾的PCR产物。试剂盒中的pBM16K载体为线性化的质粒。可以用引物M13F和M13R进行菌落PCR鉴定阳性克隆。

产品特点:

- (1) 连接反应仅需 5 分钟。
- (2) 适用于平末端 PCR 产物和带 A 尾的 PCR 产物。
- (3) 载体采用了新的制备工艺, 零背景, 无需蓝白斑筛选。
- (4) 克隆位点两旁都有 *Sma*I 和 *Eco*R V 酶切位点, 适合单酶切鉴定。
- (5) 载体具有卡那霉素抗性。

操作步骤:

1.连接反应 按下表, 在一个 0.2ml PCR 管中依次加入

成分	体积
DNA 片段	0.5-8μl
pBM16K Vector	1μl
10×Toposmart	1μl
补水至总体积	10μl

加完试剂后, 轻轻混匀低速离心, 使溶液集中在管底。

注意: 此步骤不需要在低温条件下(冰水浴)上操作。

2. 反应温度及片段要求

室温下（20-30℃）放置 5-15 分钟，（推荐使用 PCR 仪控制温度。可以设置 25℃ 反应 5-15 分钟。如果 PCR 产物电泳检测仅有很锐利明亮的条带，无引物二聚体和非特异性条带存在，可直接取 1-3μl PCR 产物原液进行克隆。）然后将离心管放置在冰上。如当天不进行转化实验。请将连接产物置于-20℃保存。

注意：DNA 片段的用量见下表

片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	20-50
1000-2000	50-100
2000-5000	100-200

3. 阳性对照反应

取 1μl 试剂盒提供的 1kb 长度的对照 Control Insert LacZα 片段进行克隆，转化具有 α 互补功能的大肠杆菌感受态细胞（如 DH5α、TOP10、Mach1-T1 等）。菌液涂布在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 卡那平板上，次日蓝色菌落为阳性克隆，说明有片段插入，白色菌落为空载体。

4. 转化

- 取 5μl 连接产物到 100μl 刚刚融化的感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴 20-30 分钟。
- 42℃ 水浴中热击 30 秒钟。
- 立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- 加入 900μl 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB，37℃，200rpm 振荡培养 60 分钟。
- 4000rpm 离心 1 分钟，去掉部分上清，保留 100μl 用移液器轻吹菌体，充分悬浮菌液，取全部菌液涂布，然后 37℃ 培养过夜（12-16 小时）。

5. 阳性重组子的鉴定

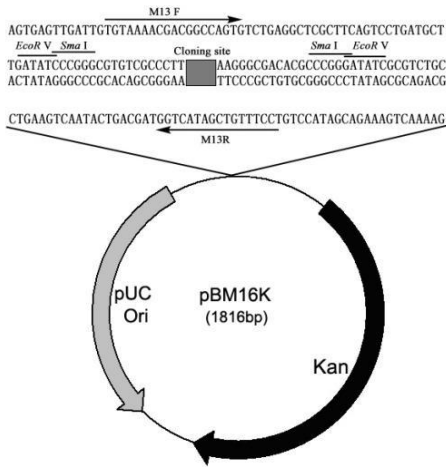
菌落 PCR

- 菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆
 - 用 10μl 吸头挑选克隆至预先加有 10μl 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中，吹打混合。
 - 25μl PCR 反应体系：取 2μl 细菌悬液为模板、加入 5μM 浓度的 M13F/M13R 各 1μl 进行 PCR 扩增。
 - PCR 扩增条件：94℃ 预变性 5 分钟（裂解细胞，失活核酸酶），94℃ 变性 10

秒钟，55℃退火10秒钟，72℃延伸（根据片段的大小决定延伸时间，通常每1min/1kb）X秒，30个循环，72℃后延伸5分钟。1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果，有强烈的明显条带的克隆为重组体，与插入片段大小相近（M13F/M13R引物在克隆位置的两侧，所以PCR扩增出的DNA的长度比插入片段大138bp）可视为阳性克隆。菌落PCR方法鉴定重组子时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

(2) 测序：用M13F、M13R通用引物对阳性质粒进行测序分析。

pBM16K载体图谱



pBM16K sequence landmarks

M13F primer binding site:14-32

M13R primer binding site:139-155

Kanamycin resistance ORF:304-1119

pUC ori:1168-1783

常见问题分析

重组子克隆菌少，或阳性率低：

- (1) 感受态效率低，使用转化效率 $>5 \times 10^7$ cfu/ μ g 的感受态细胞。
- (2) 连接反应不需在低温下（如放碎冰上）操作，应该在室温下操作。
- (3) PCR 片段加入量太多或太少，按照推荐量加入。
- (4) PCR 回收产物纯度低，重新扩增或重新纯化 PCR 产物。
- (5) PCR 回收产物质量低，切胶时在紫外下照射时间长，需重新制备。
- (6) PCR 扩增结束后，应该再延伸 5-10 分钟，确保片段延伸完全。
- (7) 转化后没有复苏培养，可以加入 SOC 或 LB，培养 60 分钟。
- (8) 克隆基因可能对宿主菌有毒性，比如某些编码膜蛋白和 DNA 结合蛋白的基因，某些启动子和调节序列基因，或含有倒置或串联重复序列的基因，选用室温过夜培养平板。

载体序列

>pBM16K (1816bp)

AGTAGTTGATTGTGTA~~AAAA~~ACGACGGCCAGTGTCTGAGGCTCGCTTCAGTCTGATGCTTGATATCCCC
GGCGTGTGCGCCCTT\$\$\$AAGGGCGACACGCCCGGATATCGCGTCTGCCTGAAGTCAATACTGACGAT
GGTCATAGCTGTTCCCTGTCCATAGCAGAAAGTCAAAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCG
GCACGTAAGAGGTTCCAACCTTCCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTAT
CGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAAAGCCATATTCACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCCG
CGATAAAATCCAACATGGATGCTGATTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATC
AGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCGATGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAG
GTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGGCTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTT
CCGACCATCAAGCATTTTATCCGTA~~CT~~CCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCAGGGAA
AACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGCCAGTGT
TCCTGCGCCGGTGCATTTCGATTCTGTTTGAATTGTCCTTTTAACGGCGATCGCGTATTCGTCTC
GCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGGTGCAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGG
CTGGCTGTTGAAACAAGTCTGAAAAGAAATGCATAAGCTCTTGCCATCTCACCGGATTCAGTCGTCA
CTCATGGTGATTCTCACTTGATAACCTTATTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTT
GGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCCTCGGTGAGTTTC
TCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATGCAGT
TTCACTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATGAGGGCCAAATGTAATCACCTGGCTCACCTTCGGGTG
GGCCTTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGATG
CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGC
GTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCTGCCAAGCTGGG
CTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCCACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT
GTAGGGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGG
TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAC
CACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG
AAGATCCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCCACCCGTGAAGGTGAGCC

BM190328