

pBM26 Toposmart 克隆试剂盒

(pBM26 Toposmart Cloning Kit)



产品信息:

组分	CL109-01 (20次)	CL109-02 (20次×3)
pBM26 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
M13F(-21) Primer(使用前加60μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
M13R Primer(使用前加60μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3

保存条件: -20℃ 保存

产品介绍:

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PCR产物定向克隆到线性化的pBM26载体中。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。pBM26载体类似于invitrogen公司的pENTR/D-TOPO入门载体，具有attL1和attL2，为gateway系统中的入门载体。引物M13F(-21)r和M13R可用于菌落PCR和测序鉴定。

产品特点:

- (1) 连接反应仅需 5 分钟。
- (2) 只适合平末端 PCR 产物的快速、高效、定向克隆。
- (3) 载体采用了新的制备工艺，零背景，无需蓝白斑筛选
- (4) 可在基因的 C 端中融合 Flag 标签序列。
- (5) 载体为卡那霉素抗性。

注意事项:

- (1) 引物要求: PCR 引物 5'端不能进行磷酸化修饰，普通商业化引物即可。上游引物的 5'端添加 CACC 四个碱基 (CACC 为真核表达所必需的 Kozak 序列)。如果目的蛋白需要在 C 端带 FLAG 标签，下游引物则需要去掉基因本身的终止密码子(3个碱基)，目的蛋白的翻译终止由 FLAG 标签的终止密码子 TAA (位于 Xho I 酶切位点前) 来实现。
- (2) DNA 聚合酶: 选用 Pfu、sPfu、Phusion、Q5、KOD 和 Xerox 等高保真 DNA 聚合酶用于 PCR 扩增。

(3)连接时间：5-15 分钟，一般为 15 分钟。

(4)连接温度：室温 (22℃-30℃)，可使用PCR仪控温。最佳反应温度为25℃。若片段有高GC等复杂结构，可在37℃反应。

(5)产物要求：为保证PCR产物完整，建议72℃后延伸5-10分钟。连接前使用琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物的质量和纯度，如PCR产物为非单一性条带，目的片段一定要切胶回收。如PCR产物为单一条带，无引物二聚体，可以取1-3μl的PCR产物直接连接。但若扩增模板为质粒DNA，应注意质粒的抗性。由于pBM26载体为卡那抗性，以氨苄抗性的模板质粒扩增的PCR产物直接连接后的产物可涂布在卡那抗性的LB平板上。以卡那抗性的模板质粒扩增的PCR产物应切胶回收后再连接。

(6)片段用量：胶回收的DNA片段一般使用量为50-100ng。对照片段为5'端带CACC四个碱基的全长EGFP基因的平末端产物。

(7)在M13F(-21)和M13R引物干粉管中加120μl灭菌水即为5μM浓度的引物。

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
pBM26 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。PCR 仪控温 25℃反应 15 分钟，反应结束后，将离心管置于冰上，等待细菌转化。如暂时不转化，可冻存于-20℃。

2. 转化

(1)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。

(2)42℃水浴中热击 30 秒钟。

(3)立刻置于冰水浴中 2 分钟。

(4)加入 900μl 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB，37℃，200rpm 振荡培养 60 分钟。

(5)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）。

3. 阳性克隆鉴定：

(1) 菌落PCR方法鉴定阳性克隆

A.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

B.在25μl PCR反应体系中加入2μl细菌悬液为模板、加入5μM浓度的M13F(-21)和M13R各1μl，进行PCR扩增。

C.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（注：使用基因特异性引物做PCR鉴定时，退火温度则需按其最

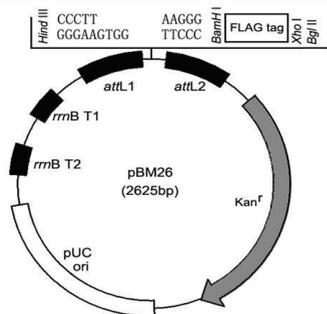
适温度进行调整), 72℃延伸(根据片段的大小决定延伸时间, 通常每1-2分/1kb), 30-35个循环, 72℃后延伸5分钟。1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果, 有强烈的明显条带的克隆为重组体, 与插入片段大小相近(由于扩增引物在克隆位置的两侧, 所以PCR扩增出的DNA的长度比插入片段大325bp)可视为阳性克隆。菌落PCR方法鉴定重组体时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

(2) 限制性酶切分析阳性克隆

挑取单菌落接种于3-5mL含卡那的LB培养液中, 过夜培养, 少量制备质粒, 参考pBM26图谱, 选择合适的限制性内切酶(*Hind* I, *Bam*HI, *Xho*I, *Bgl*II), 酶切后电泳鉴定重组质粒。

(3) 测序: 用M13F(-21)和M13R对质粒进行测序分析。

pBM26 载体图谱



pBM26 sequence landmarks:

rrmB T2 transcription termination sequence: 268-295

rrmB T1 transcription termination sequence: 427-470

M13 Forward (-21) primer binding site: 536-553

attL1: 569-668(C)

Cloning site: 691

attL2: 750-849

T7 primer binding site: 866-885(C)

M13 reverse primer binding site: 890-906

Kanamycin resistance ORF: 1019-1826

pUC origin: 1949-2622

```

M13F(-21) primer binding site                                     attL1
CGACGCTGTAAACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCAATAATGATTTTATTTTGTACTGATAGTGACCTGTCGTGCAACAAATGATGCAATGCTTTTT
                                     Hind III      cloning site      BamHI      FLAG coding sequence      XhoI
TATAATGCCAACCTTGTGACAAAAGCAGGCTCCAAGCTTGTGTGCTCTTACC$$$AAGCGCAGACCGGATCCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGTCTGAG
ATATTAGCTGGTGAACAATGTTTTTTCGTCCGAGGTTGGAACACAGC$$$CGAAGTGG$$$TCCGCTGTGGCTAGGCTGATGTTCTCACTGCTACTGTTCATTGAGCTC
Bgl II                                     attL2
AGATCTGCCAGCTTCTGTGACAAAAGTGGCATTATAAGAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGTCCACTACGTCAAAAATAAATCATTATTTCG

TCATCCAGCTGATATCCCTATAGTGAGTGTATTATCATGCTGATAGCTGTTTCCCTGCAGCTCTG6CCCGTCTCTCA
T7 primer binding site      M13R primer binding site
    
```

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 > 5×10^7 cfu/μg 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，选室温过夜培养平板。

载体序列

>pBM26 (2625bp)

```

CTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTC
GCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC
GCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTGTGGCCGATTCATTAATGACAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACT
GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACCGCTACCGCTAGCCAGGAAGAGTTGTAGAA
ACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCCTGGCAGTTTATGGCGGGC
GTCTGCCCGCCACCCCTCCGGCCGTTGCTTACAAACGTTCAAATCCGCTCCCGGGCGGATTTGTC
TACTCAGGAGAGCGTTACCCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGCTTCCGACTGAGC
CTTTCGTTTTATTGTATGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAG
TCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTGACTGA
TAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAATTTGTACAAAA
AGCAGGCTCCAAGCTTGTGTCG CCCTTCACCS$AAGGGCGACACCGGATCCGACTACAAGGATGA
CGATGACAAGTAACCGAGAGATCTGACCCAGCTTCTTGTAACAAGTTGGCATTATAAGAAAGCA
TTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCATCAGTCAAATAAAAATCATTATTTGCCATCCA
GCTGATATCCCCTATAGTGAGTCTGATTACATGGTCAATAGCTGTTTCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGC
TCAAATCTCTGATGTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTT
ACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCATATCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTA
ATCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGC
GACAATCTATCGTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAG
CGTTGCCAATGATGTATACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTAGCGCAATTATGCTCTCCG
ACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCTGATGATGCATGGTTACTACCACCTGGATCCCGGAAAAA
CAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGT
CCTGCGCCGGTTGCATTGATTCCTGTTTGTAAATTGCTTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCG
CTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGTTGATGCGAGTGATTTGATGACGAGCGTAATG
GCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAATTTTCCATTCTCACCGGATTCAGTCG
TCACTCATGGTGATTTCTACTTGATAACCTTATTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATGAT
GTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACAGGATCTTGCCATCCTATGGAATGCCTCGGTGAG
TTTTCTCCTTACATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATGAATAAATT
GCAGTTTCAATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAG
AGCATTACGCTGACTGACGGACCGCGCGCAAGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGC
GTCGTTCCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCT
GCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTGTTGCTCCGGATC
AAGAGTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATAACTGTCC
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTGTAGCACCCTACATACTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGTGTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAG
ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCT
TGGAGCGAACGACCTACCCGAAGTACAGTACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTT
CCCGAAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGTTCCGGAACAGGAGAGCGCACG
AGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTACAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGGGC
CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
    
```

BM20220716