

pBM30 Toposmart 克隆试剂盒

(pBM30 Toposmart Cloning Kit)



产品信息:

组分	CL110-01 (20次)	CL110-02 (20次×3)
pBM30 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
T7Primer(使用前加入54μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
T7t Primer(使用前加入54μl 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pBM30原核表达载体中。适用于克隆由Pfu、KOD、Xerox、Phusion和Q5等高保真DNA聚合酶扩增的平末端PCR产物。引物T7和T7t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 具有 T7 启动子，类似于 pET30 载体，具备原核表达所需的所有调控元件。适用于外源基因在大肠杆菌中的高水平表达。
- ⑤ 带 His.tag 和 S.tag 两种纯化标签。
- ⑥ 具有凝血酶和胰激酶两种蛋白酶酶切识别序列。
- ⑦ 载体具有卡那霉素抗性。

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。如果表达蛋白需 C 端带 6His 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 6His 标签的终止密码子 TGA 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°C-30°C)，可使用PCR 仪控温。最佳反应温度为 25°C。若片段有高 GC 等复杂结构，可在 37°C 反应。
- ⑤ 产物要求：为保证 PCR 产物完整，建议 72°C 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，可取 1-3 μ l 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 pBM30 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，表达产物大小为 32.6kD。
- ⑦ 往 T7 和 T7t 引物干粉管加 100 μ l 灭菌水即为 5 μ M 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	0.5-8 μ l
pBM30 Vector	1 μ l
10 \times Toposmart	1 μ l
补水至总体积	10 μ l

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°C 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°C。

2. 转化

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

3. 阳性克隆鉴定：

- 菌落PCR方法鉴定阳性克隆

A. 用 10 μ l 吸头挑选克隆至预先加有 10 μ l 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中，吹打混合

B. 在 25 μ l PCR 反应体系中加入 2 μ l 细菌悬液为模板、T7 和 T7t 各 1 μ l，PCR 方法鉴定阳性克隆。

C. PCR 扩增条件：94°C 预变性 5 分钟 (裂解细胞，失活核酸酶)，94°C 变性 10 秒钟，55°C 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°C 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°C 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

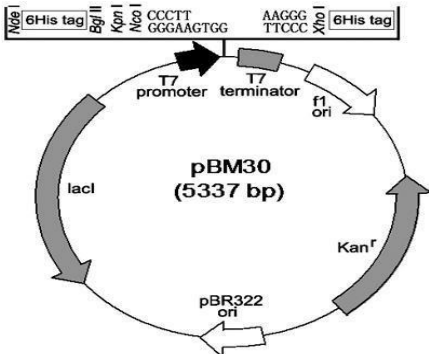
条带的克隆为重组体，与插入片段大小相近（由于扩增引物在克隆位置的两侧，所以PCR扩增出的DNA的长度比插入片段大349bp）可视为阳性克隆。菌落PCR方法鉴定重组体时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

(2) 限制性酶切分析阳性克隆

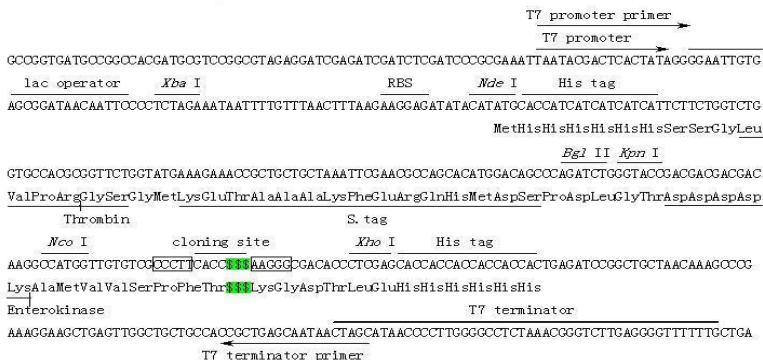
pBM30为低拷贝质粒。挑取单菌落接种于8mL含卡那的LB培养液中，过夜培养，少量制备质粒，参考pBM30图谱，选择合适的限制性内切酶（*Nde*I, *Bgl* II, *Kpn* I, *Nco*I, *Xho* I），酶切后电泳鉴定重组质粒。

(3) 测序：用T7和T7t对质粒进行测序分析。

pBM30 载体图谱



pBM30 sequence landmarks
 T7 Promoter: 138-154
 His tag sequence: 229-246; 397-414
 S tag sequence: 280-324
 Cloning site: 375
 T7 terminator: 482-528
 f1 origin: 564-953
 Kan coding sequence: 1046-1861(C)
 pBR322 origin: 2571
 lacI coding sequence: 4001-5083(C)
 (C):complementary sequence



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

(注: 部分序列, 若看全部序列请到博迈德官网查阅, 网址: www.biomed168.com)

>pBM30(5337bp)

```
CCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACC
TGTTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCCG
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAATAATTTTG
TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGG
GGTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCGATGCT
GGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGTTGTGTGCGCTTACCSS$AAGGGGACACCCCTCG
AGCACCACCACCACCATTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAGCTAAGCTGAGTTGGC
TGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTT
TTTGCTGAAAGGAGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCG
CGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGCACGCCCTAGCCCTAGCCCGCTCT
TTGCTTTCTTCCCTTCTTTCGCCACGTTGCGCGGTTTCCCGCTAAAGCTCTAAATCGGGGC
TCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGTATG
GTTACAGTAGTGGGCCATCGCTAGATGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTTTGTATT
ATAAGGATTTGCCGATTTCCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAACAAAAATTAACCGG
AATTTTAAACAAAATTAACGTTTACAAATTTTCAGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCTTAGAAAACTC
ATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTTATCAATACCATATTTTGA AAAAGCC
GTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCGAGGCAAGTCCATAGGATGGCAAGATCTTGGTATCGGT
CTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAAAGGTTATC
AAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTATGCATTCTTT
CCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAAACCGTT
ATTCATTGCTGATTGGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTAACAAC
AGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAG
GATATCTTCTAAATCCTGGAATGCTGTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATCATCATC
AGGAGTACGGATAAAAATGCTTGTAGTGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCGTTTGTGCTGAC
CATCTCATCTGTAACATCAATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTTGCGCATCG
GGCTTCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCATTATACCC
ATATAAATCAGCATGTTGGAATTTAATTCGCGGCC TAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAAATATGG
CTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTACAGACCCCGTAGAAAGATCAAAAGCTACTTCTTGAGATC
TTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGCGCAGATACCA
AATACTGCTTCTAGTGTAGCCGTAAGTGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACAT
ACCTGCTGTGTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAAGTCGTGTTTACCGGGT
GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACAC
AGCCAGCTTGGAGCGAAGACGACTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAGC
GCCACGCTTCCCAGGGGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCCAGGGTCGGAACAGGAG
AGCGACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACC
TCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGC
AACCGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATC
CCCTGATTCTGTGGATAAC
```

BM20220716