

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℃ 保存一年

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) 具有凝血酶和肠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

- (1) 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。
- (2) 42°C 水浴中热击 30 秒钟。
- (3) 立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- (4) 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。
- (5) 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：

- (1) 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

- (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)

```
CCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCCGGCGATATAGGGCCGAGCAACCCGACC  
TGTGGCGCCGGTATGCCCGCCAGCGATCGCTCCGGCTAGAGGATCGAGATCGATCGATCCCGC  
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAATAAATTTTG  
TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGC  
GGTTCGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCT  
GGGTACCGACGACGACACAAGGCCATGGTTGTGTCGCCCTTCACCS$AAGGGCGACACCCTCG  
AGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAAACAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGC  
TGCTGCCACCGCTGAGCAATACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTT  
TTTGCTGAAAGGAGGAATATCCGGATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCG  
CGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTGCCAGCCCTAGCACCCTCCCTCT  
TTCGTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCAGTTCGCCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGC  
TCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAAGTTGATTAGGGTGTG  
GTTACGATAGTGGCCATCGCTAGATGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTAATCTTTTGATT  
ATAAGGATTTGCCGATTTCCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTATTAAACAAAAATTTAACCGG  
AATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATTTACAGTTGGCACTTTTCGGGGAAATGTCGCGGAAC  
CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCTTAGAAAAACT  
ATCGAGCATCAAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTACATACCATATTTTTGAAAAAGCC  
GTTTCTGTAATGAAGGAAAAACTACCGAGGCAGTTCATAGATGGCAAGATCGCTGGTATCGGT  
CTCGGATTCGACTCGTCCAACATCAATAACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATC  
AAGTGAGAAATACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTT  
CCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAAACCGTT  
ATTCATTGCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTAACAAC  
AGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAG  
GATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCGGGGATCGCAAGTGTGAGTAACCATGCATCATC  
AGGAGTACGGATAAAATGCTTGTAGTGGCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGAC  
CATCTCATCTGTAACATCATCTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAAGAAACAACCTCGCGCATC  
GGCTTCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCGACATTATCGGAGCCATTTATAACC  
ATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATG  
CTCAATAACCCCTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTT  
AACGTGAGTTTTTCCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAGAAAGATCAAAGGATCTTTGAGATC  
CTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT  
TGCCGGATCAAGACTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGAGAGCCGAGATACCA  
AATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACAT  
ACCTGCTCTGCTAATCTGTTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGCTGCTTACCAGGGTT  
GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACAC  
AGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAGC  
GCCACGCTTCCCGAAGGGAAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGCAGGGCTGGCAACAGGAG  
AGCCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCTTGTCGGGTTTCGCCACC  
TCTGACTTGAAGCTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGC  
AACGCGGCCTTTTACGGTCTTGCCCTTTTGTGTCCTTTTGTCTCATGTTCTTCTTGCCTTATC  
CCCTGATTCTGTGGATAAC
```

BM190328