

# pBM40 Toposmart 克隆试剂盒

(pBM40 Toposmart Cloning Kit)



## 产品信息:

组成	CL111-01 (20次)	CL111-02 (20次×3)
pBM40 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
CMVforward Primer(使用前加入50μl ddH <sub>2</sub> O)	0.1OD	0.1OD×3
SV40PolyArev Primer(使用前加入50μl ddH <sub>2</sub> 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pBM40哺乳动物表达载体中。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。引物CMVforward和SV40PolyArev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 CMV 启动子，适用于外源基因在哺乳动物细胞中的表达，带新霉素抗性基因，便于稳转细胞株的筛选。C 端带 FLAG 标签序列便于表达的目的蛋白质的检测。
- (5) 相对于 pcDNA3.1 等其它哺乳动物表达载体，pBM40 载体具有更小的质粒骨架，转染效率高。
- (6) 载体具有卡那霉素和新霉素抗性。

## 注意事项:

- (1) 引物要求: PCR 引物 5'端不能进行磷酸修饰，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，通常用 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℃。若片段存在高 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, 可取 1-3 $\mu$ 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 pBM40 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 26.9kD。
- (7) 分别往 CMVPforward 引物干粉管和 SV40PolyArev 引物干粉管加入 100 $\mu$ l 和 108 $\mu$ l 灭菌水就可以得到 5 $\mu$ 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 $\mu$ l
pBM40 Vector	1 $\mu$ l
10 $\times$ Toposmart	1 $\mu$ l
补水至总体积	10 $\mu$ 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℃ 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

- 取 5 $\mu$ l 连接产物到 100 $\mu$ l 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 900 $\mu$ l 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 100 $\mu$ 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℃ 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

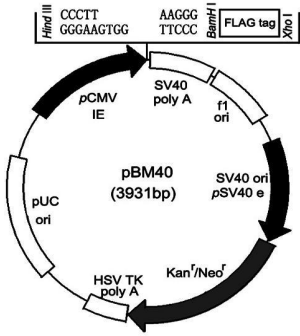
- 用 10 $\mu$ l 吸头挑选克隆至预先加有 10 $\mu$ l 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中, 吹打混合。
- 在 25 $\mu$ l PCR 反应体系中加入 2 $\mu$ l 细菌悬液为模板、5 $\mu$ M 浓度的 CMVPfor 和 SV40PolyArev 各 1 $\mu$ l, PCR 方法鉴定阳性克隆。
- PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 5 分钟 (裂解细胞, 失活核酸酶), 94℃ 变性 10 秒钟, 55℃ 退火 10 秒钟 (注: 使用基因特异性引物做 PCR 鉴定时, 退火温度则需按其最适温度进行调整), 72℃ 延伸 (根据片段的大小决定延伸时间, 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，小量制备质粒，参考pBM40图谱，选择合适的限制性内切酶（*Hind* III, *Bam*HI, *Xho* I），酶切后电泳鉴定重组质粒。

(3) 测序：用CMVPfor和SV40PolyArev对质粒进行测序分析。

**pBM40 载体图谱**



**pBM40 sequence landmarks**

CMV immediate early promoter:1-589  
 CMV promoter forward primer binding site:519-539  
 Cloning site:625  
 FLAG coding sequence:644-667  
 SV40 early mRNA polyadenylation signal:818-868  
 SV40 PolyA reverse primer binding site:824-843  
 f1 single-strand DNA origin:915-1202  
 Bacterial promoter for expression of Kanamycin:1264-1392  
 SV40 origin of replication:1643-1778  
 SV40 early promoter:1476-1744  
 Kanamycin/neomycin resistance gene:1827-2621  
 HSV TK polyadenylation signal:2857-2875  
 pUC plasmid replication origin:3206-3849

**CMV forward primer binding site**

CGTAAACAACCCGCCCCATTGACGCCAAATGGGCGGTAGCGGTGTACGGTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGAT

*Hind* III cloning site *Bam*HI flag tag coding sequence *Xho* I  
 CCGTAGCGGCTACCGGAAGCTTGTGTGCCCTTACC\$\$\$AAGGGCGACACCGGATCCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAACTCGAGA  
 GGGCATCGCGATGGCCTTCGAAACACAGCGGAAGTGG\$\$\$TTCCCGCTGTGGCTAGGCTGATGTTCTACTGCTACTGTTCAATGAGCTCT

GATCTCTATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGA

ATGCAATTTGTTGTTAACTGTTTATTTCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAAATAGCATCACAAAATTCACAAAATAAAGCA

SV40 PolyA reverse 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 $>5 \times 10^7$ cfu/ $\mu$ 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**

>pBM40 (3931bp)

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT  
 AAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA  
 CGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCCAGTACATCAAG  
 TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACAT

GACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG  
CAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGG  
GAGTTTTGTTGGCAGCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACATCCCGCCCATTAGCGCAAAATGGG  
CGTAGGCGTTGACGGTGGAGGCTTATATAAGCAGAGCTGTTAGTAGAACCTCGAGTCAGTCCGTCAGGCTACCGTACC  
GGAAAGCTTGTGTGCGCCCTTACCSS\$AAGGGCGACACCGGATCCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAACCT  
GAGAGATCCTCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCT  
GAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAA  
TAGCATCACAAATTTCCAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATC  
TTAAGGCGTAAATTTGAAGCGTTAAATTTTGTAAAATTCGCGTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCA  
ATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGCTAGA  
TGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCCAGGTTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACC  
CTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAG  
CGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCAGTAAACCACACCCGCCCGCG  
CTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCCGCGAACCCCTATTTGTTTATT  
TTTCTAAATACATCAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAAATAATATGAAAAAGAA  
GAGTGTAGGCGGAAAGAACCGCTGTGGAATGTGTGCTAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCGAGGCTCCCCA  
GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG  
CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCG  
CCCTAACTCCGCCAGTTCGGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGAGAGGCGGAG  
GCCGCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCG  
ATCAAGAGACAGGATGAGGATGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGAATGCACGCAGGTTTCCGGCCCTGG  
GTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCAACAACAGACAATCCGCTGCTGATCCCGCGGTGTTCCGCGCTG  
CAGCGCAGGGGCGCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGTTGCCCTGAATGAAGTCAAGACGAGG  
CAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCAGACGGGCTTCTTGGCAGCTGTGCTGCAGCTTGTCACTGAAGCGG  
GAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTGTCTCTGCCGAGAA  
AGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCAACA  
GCAAACTCGCATCGAGCAGCAGCTCGGATGGAAGCCGCTTGTGCATCAGGATGATCGCAGAAAG  
GCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGACGACGCGAGGATCTCGT  
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTCCGCAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTG  
GCCGGCTGGGTGTGGCGGACCCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG  
CGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTGCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATGCGCTTCTATCGCC  
TTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGACTCTGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGCCCAACCTGCCATCA  
CGAATTTGATTTCCACCGCGGCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCCGAATTTTCCGGGACCCGCTGGAT  
GATCTCCAGCGCGGATCTCATGTGAGTCTTTCGCCACCTCAGGGGGAGGCTAACTGAAACCGGAAG  
GAGACAATCCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTT  
TGTTCAAAACGCGGGTTCGTTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAA  
TAGCCCGCGTTCCTCTTTTCCCAACCCACCCCAAGTTCCGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACG  
TCGGGGCGGACGCCCTGCCATAGCTCAGGTTACTCATATATACTTAGATTGATTTAAAATCTATTTTTAATTT  
AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACCGTGAATTTTCGCTTCCACTGAG  
CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA  
CAAAAAACCCACCGTACCAGCGGTGGTTTGTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC  
GGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT  
GTAGCACCGCTACATACCTCGCTGTCTAATCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTT  
ACCGGTTGGACTCAAGCAGATAGTACCAGGATAAGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGTTCCGTCACA  
CAGCCCGCTTGGAGCGAACGACTTACCCGAACCTAGACCTACAGCTGAGTACCTATGAGAAAGCGCCACCG  
TTCCCGAAGGGAGAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACAGGGAG  
CTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTATAGTCTGTGGGTTTCCGCCCTCTGACTTGAGCGTGGATTTTTG  
TGATGCTGTCAGGGGGGCGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTT  
GCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

BM190328