



pBM23 Toposmart 克隆试剂盒

(pBM23 Toposmart Cloning Kit)

产品信息:

组成	CL112-01 (20次)	CL112-02 (20次×3)
pBM23 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert LacZα	5μl	5μl
M13F(-47) Primer(使用前加入45ul ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
M13R(-48) Primer(使用前加入45ul ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3

保存条件: -20 °C保存一年

产品介绍:

pBM23 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、Taqplus、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的带A尾的PCR产物。试剂盒中的pBM23 载体为线性化的质粒。可以用引物M13F(-47)和M13R(-48)进行菌落PCR鉴定阳性克隆。载体不含LacZ基因,不能进行蓝白斑筛选。

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, 适合单酶切鉴定。
- (5) 载体的多克隆位点两侧具有SP6 和 T7 RNA 聚合酶启动子序列, 可用于体外 RNA 转录。
- (6) 载体具有氨苄青霉素和卡那霉素双抗性基因。

操作步骤:

1.连接反应

成分	体积
DNA 片段	0.5-8μl
pBM23 Vector	1μl
10×Toposmart	1μl
补水至总体积	10μl

按下表, 在一个 0.2ml PCR 管中依次加入加完试剂后, 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 0.5-1μl 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IPTG, X-gal的LB氨苄平板上，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）

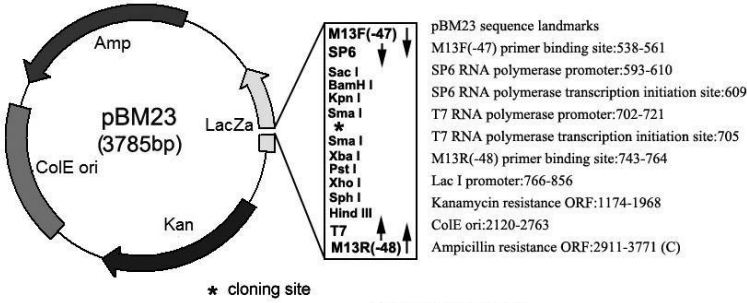
5. 阳性克隆鉴定：

- 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。
 - 在25μl PCR反应体系中加入2μl细菌悬液为模板、M13F(-47)和M13R(-48)各1μl，PCR方法鉴定阳性克隆。
 - M13引物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℃延伸适当时间（根据片段的大小决定延伸时间，通常每1-2分钟/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M13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227bp）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。
- 限制性酶切分析阳性克隆

挑取单菌落接种于3-5mL含氨苄或卡那的LB培养液中，过夜培养，小量制备质粒。参考pBM23图谱，选择合适的限制性内切酶，酶切后电泳鉴定重组质粒。

- 测序：用M13F(-47)和M13R(-48)对质粒进行测序分析。

pBM23载体图谱



* cloning site

M13F(-47) primer binding site

```

CGCTATTAGCCAGCTGCGCAAGGGGGATGTGCTGCAAGGGGATTAAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAGCTGTGTAAGAACAGCGCCAGCCAAATTGAAGC
SP6 promoter primer      Sac I BamH I Kpn I Sma I      cloning site      Sma I Xba I Pst I Xho I Sph I Hind III
TATTTAGGTGACACTATAAATACAGACTCGGATCCATGGTACCCTGGTGTGCGCCCT$$$AAGGGGCGACAGCCCGGGTCTAGACTGCAGCTCGAGGCATGCAAGCTT
TGCCTATAGTAGTGGTATTACAATCCATCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATTCACACACATAGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAGC
T7 promoter primer      M13R(-48) 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/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 纯度低，重新扩增或重新纯化 PCR 产物。
- (5) PCR 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

>pBM23(3785bp)

```

AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAA
TAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATTATATC
ATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTG
AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGAC
AAGCCCGTCAGGGCGCGTACAGCGGTGTTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGC
AGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCA
TCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATT
ACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGTGTCGAAGGCGATTAAGTTGGGTAAAGCCAGGGTTTTCCCAGTC
ACGACGTTGTA AAAACGACGGCCAGCCAATTGAAGCTATTAGGTGACACTATAGAATACGAGCTCGGAT
CCATGGTACCCGGGCGTGTGC CCCTTAAAGGCCGACACGCCCCGGTCTAGACTGCAGCTCGAGGCATGCA
AGCTTTGCCCTATAGTGAGTTCGATTACAAATCCATCCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCT
CACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTGCGTATTGGGCGCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACT
CGCTGCGCTCGGTTCGGTTCGGTTCGGCGAGCGGTATCAGTCACTCTGGACAGCAAGCGAACCGGAATT
    
```

GCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCC
AAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGA
ACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACA
ACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTCCGGCTGTACAGCGCAGGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTC
AAGACCACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAGTGAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG
ACGGGCGTTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGC
GAAGTGCCGGGGCAGGATCTCTGTCACTCACCTTGTCTCTGCCGAGAAAAGTATCCATCATGGCTGATG
CAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCG
ACGAGCAGCTACTGGATGGAAGCCGGTCTTGTGCATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGC
TCGCGCCAGCGAAGTTCGCCAGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCC
ATGGCGATGCCGTCTTGCCGAATATCATGTTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCG
GCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG
CGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATC
GCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTCTCTGATCGGGTATTTTCTCCTTACGCATC
TGTGCGGTATTTACACCCGGGATCTGGCGGTAATACGGTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
AAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGGTTTTTC
CATAGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACA
GGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTCCGACCCTGCCGC
TTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCCGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCAGCCGCT
GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAA
CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGA
GTTGGTAGCTCTGTATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGGTTTGAAGCAGCAGA
TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAA
CGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTACAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAAT
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGAG
ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
CCGGTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGCTCTGCAACT
TTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAAGTAGTTCCGACGTTAATAGTTT
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCACTCAGCT
CCGTTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT
TCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATCTGAGA
ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCCGCCACATAGCAG
AACTTTAAAAGTGTCTCATATTGGA AAAACGTTCTTCCGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTGTG
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTC
TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGA
ATACTCATACTCTTCTTTTTTTC

BM190410