



# pBM21 快速克隆试剂盒

## 产品信息：

组成	CL114-01 (20次)	CL114-02 (20次×3)
pBM21 Vector (40ng/μl)	20μl	20μl×3
2×T4 DNA ligase master mix	100μl	100μl×3
Blunting Enzyme	20μl	20μl×3
Control Insert	5μl	5μl
PBM21F Primer	0.1OD	0.1OD×3
PBM21R Primer	0.1OD	0.1OD×3

**保存条件：** -20℃保存一年

## 产品介绍：

pBM21快速克隆试剂盒为一种阳性选择克隆系统，克隆区域位于pBM21质粒的自杀基因（lethal gene）内部。当连接产物转化大肠杆菌后，有外源片段的插入的重组质粒导致载体上的自杀基因功能丧失，细菌存活，无片段连接（载体自连）时，自杀基因表达的毒蛋白使细菌不能存活。该试剂盒利用T4 DNA 连接酶（T4 DNA ligase）的连接活性将平末端DNA片段克隆到具有磷酸化末端的线性化载体pBM21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产物或各种方法产生的平末端双链DNA片段。由Taq、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的非平末端PCR产物，可通过平末端化酶（Blunting Enzyme）处理成为平末端DNA用于连接。阳性克隆可以用试剂盒提供的引物PBM21F和PBM21R进行菌落PCR或测序鉴定。

## 产品特点：

- （1）连接反应仅需5-30分钟。
- （2）适用于平末端PCR产物和平末端双链DNA片段
- （3）适用于磷酸化或非磷酸化的DNA片段
- （4）pBM21为氨苄抗性，具高拷贝复制起始子

## 操作步骤：

### 1.片段的准备

- （1）平末端PCR产物或者平末端酶切产物。
- （2）非平末端PCR产物和粘性末端酶切产物的平末端化处理。

PCR扩增结束后，往反应管中加入1 $\mu$ l的Blunting Enzyme，72 $^{\circ}$ C继续保温15-30分钟；酶切完成后，往反应管中加入终浓度为0.2 $\mu$ M的dNTPs以及1 $\mu$ l的Blunting Enzyme，72 $^{\circ}$ C保温30分钟；

(3)1%的琼脂糖凝胶电泳分离DNA片段，切胶回收目的片段。

(4)片段用量：DNA片段一般使用量为50-100ng左右。载体与片段的摩尔比控制在1:3-1:10，对照片段为727bp全长EGFP基因的平末端产物。

(5)往PBM21F和PBM21R引物干粉管加90 $\mu$ l灭菌水即为5 $\mu$ M浓度的引物。

## 2.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	X $\mu$ l
pBM21 Vector	1 $\mu$ l
2 $\times$ T4 DNA ligase master mix	5 $\mu$ l
补水至总体积至	10 $\mu$ l

轻轻，离心数秒。25 $^{\circ}$ C反应5分钟，反应结束后，将离心管置于冰上，若暂时不做转化实验，可将连接产物-20 $^{\circ}$ C冻存。

**注意：**1.PCR产物的末端为羟基，不能够自连。平末端酶切产物由于存在5' 磷酸基团，片段之间能够自连，如果连接体系中片段量过多，可能有多聚体产物产生。如果插入片段长度大于3kb，可以将反应时间最大延长至30min。

## 2. 转化

- (1) 将连接产物加到刚刚化冻的感受态细胞中，轻轻混匀，冰水浴20-30分钟。
- (2) 42 $^{\circ}$ C水浴热击90秒钟，切勿晃动水面。热击结束后立即置于冰水浴中保持2分钟。
- (3) 往管中加500 $\mu$ l的SOC或LB培养基，放入37 $^{\circ}$ C摇床中200rpm左右培养60分钟。
- (4) 4000rpm离心1分钟，弃掉部分上清，保留100-200 $\mu$ l，用吸头轻轻吹打菌块重悬细菌，取全部菌液涂布于氨苄或卡那抗性的LB固体培养板上，待液体吸干后，倒置平板入37 $^{\circ}$ C培养过夜（12-16小时）。

**备注：**若感受态使用方法不同，请按照感受态细胞产品说明书进行操作。

## 3. 阳性克隆鉴定：

(1) 菌落PCR方法鉴定阳性克隆

- ①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。
- ②25 $\mu$ l PCR反应体系：取2 $\mu$ l细菌悬液为模板、加入5 $\mu$ M 浓度倒入PBM21F和PBM21R各1 $\mu$ l进行PCR扩增。
- ③PBM21引物PCR扩增条件：95 $^{\circ}$ C预变性5分钟（裂解细胞，失活核酸酶），94 $^{\circ}$ C变性10 秒钟，55 $^{\circ}$ C退火10秒钟（注：使用基因特异性引物做PCR鉴定时，退

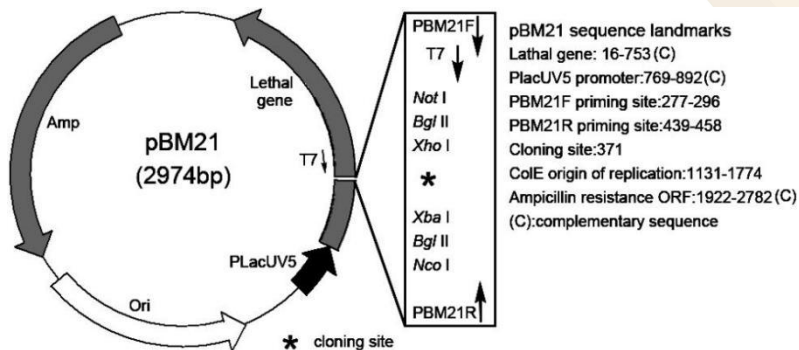
火温度则需按其最适温度进行调整），72℃延伸（根据片段的大小决定延伸时间，通常每1-2 min/kb）60秒，30-35个循环，72℃后延伸5分钟。1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果，有强烈的明显条带的克隆为重组体，与插入片段大小相近（由于PBM21引物在克隆位置的两侧，所以PCR扩增出的DNA的长度比插入片段大182bp）可视为阳性克隆。菌落PCR方法鉴定重组体时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

(2) 限制性酶切分析阳性克隆

挑取单菌落接种于3-5mL含氨苄或卡那的LB培养液中，过夜培养，小量制备质粒，参考pBM21图谱，选择合适的限制性内切酶，酶切后电泳鉴定重组质粒。

(3) 测序：用PBM21F和PBM21R对阳性质粒进行测序分析。

**pBM21 载体图谱及多克隆位点序列**



```

          PBM21F                T7 promoter primer           Not I   Bgl II
          →                    →                             ↓       ↓
ACACTTCTGCCTGAACACCATATCCATCCGGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGCCGCCAGATCT
          Xho I                cloning site             Xba I Bgl II           Nco I
TCCGGATGGCTCGAGITTTTCAGCAAGAT***ATCTTTCTAGAAGATCTCTACTAATATTCTCAGCTGCCATGG
          ←
          PBM21R
AAAATCGATGTTCTCTTTTATCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAGACTATAT
    
```