pBM27 Toposmart 克隆试剂盒

（pBM27 Toposmart Cloning Kit）

产品信息：

组分	CL119-01（20次）	CL119-02 (20次×3)
pBM27 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
M13F(-21) Primer(使用前加入60ul ddH2O)	0.1OD	0.1OD×3
M13R Primer(使用前加入60ul ddH2O)	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pBM27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。pBM27载体类似于invitrogen公司的pENTR/D-TOPO入门载体，具有attL1和attL2，为gateway系统中的入门载体。引物M13F(-21)和M13R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）可在基因的 C 端中融合 Flag 标签序列。
（5）载体为壮观霉素抗性。

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（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，一般为 15 分钟。

(4)连接温度：室温 (22℃-37℃)，可使用PCR仪控温。最佳反应温度为25℃。若片段有高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，可以取1-3μl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pBM27载体为壮观霉素抗性，以壮观霉素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。

(7)往M13F(-21)和M13R引物干粉管加120μl灭菌水即为5μM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	0.5-8μl
pBM27 Vector	1μl
10×Toposmart	1μl
补水至总体积	10μl

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

（1）取 10μl 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。

（2）42℃水浴中热击 30 秒钟。

（3）立刻置于冰水浴中 2 分钟。

（4）加入 900μl 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB，37℃，200rpm 振荡培养 60 分钟。

（5）4000rpm 离心 1 分钟，去掉大部分上清，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）。

3. 阳性克隆鉴定：

（1）菌落PCR方法鉴定阳性克隆

A. 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

B. 在25μl PCR反应体系中加入2μl细菌悬液为模板、M13F(-21)和M13R各1μl，PCR方法鉴定阳性克隆。

C.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

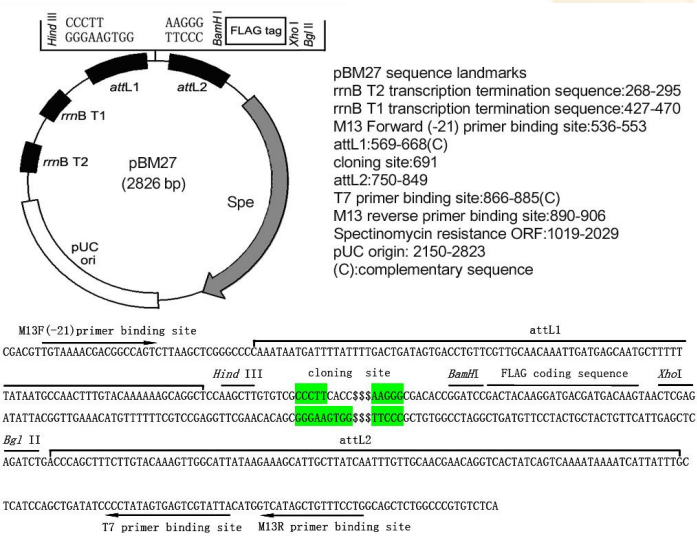
条带的克隆为重组体，与插入片段大小相近（由于扩增引物在克隆位置的两侧，所以PCR扩增出的DNA的长度比插入片段大371bp）可视为阳性克隆。菌落PCR方法鉴定重组体时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

（2）限制性酶切分析阳性克隆

挑取单菌落接种于3-5mL含壮观霉素的LB培养液中，过夜培养，小量制备质粒，参考pBM27图谱，选择合适的限制性内切酶（*Hind* III，*Bam*H I，*Xho* I，*Bgl* II），酶切后电泳鉴定重组质粒。

（3）测序：用M13F(-21)和M13R对质粒进行测序分析。

pBM27 载体图谱及多克隆位点序列



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>5×10^7cfu/μg 的感受态细胞。

（2）连接反应在低温下（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：

>pBM27（2826bp）

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTC
GCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC
GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACT
GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGGAAGAGTTTGTAGAA
ACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCCTGGCAGTTTATGGCGGGC
GTCCTGCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCACAACGTTCAAATCCGCTCCCGGCGGATTTGTCC
TACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTCCGACTGAGC
CTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCCAG
TCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGA
TAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAA
AGCAGGCTCCAAGCTTGTGTCGCCCTTCACC$$$AAGGGCGACACCGGATCCGACTACAAGGATGA
CGATGACAAGTAACTCGAGAGATCTGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCA
TTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCA
GCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTC
TCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTT
ACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGC
AGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGGGGTACAGTCTA
TGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCA
ACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATC
GCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTG
CTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTG
CTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGA
AACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGA
CGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGA
CATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCA
AGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACA
GGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACTCGCCGCCCGACTGGGCTGGCGA
TGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCC
GAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCCAGTATCAGCCCGTCATACTTG
AAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAA
GAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAATCAGAATTGGTTAAT
TGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAAATC
CCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTC
TTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
GGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCA
GATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC
GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT
ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTC
GTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATT
GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG
AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGT
TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAA
ACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

BM20220716