

pBM28 Toposmart 克隆试剂盒

(pBM28 Toposmart Cloning Kit)



产品信息:

组分	CL122-01 (20次)	CL122-02 (20次×3)
pBM28 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
M13F(-21) Primer(使用前加入60μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
M13R Primer(使用前加入60μl ddH ₂ O)	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pBM28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。pBM28 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) 与pBM27载体相比，pBM28载体无标签序列。
- (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)。
- (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1-3 μ l的PCR产物直接连接。

(6) 若扩增模板为质粒DNA，应注意质粒的抗性。由于pBM28载体为壮观霉素抗性，以壮观霉素抗性的质粒为模板扩增的PCR产物应切胶回收后再连接。

(7) 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CACG四个碱基的全长EGFP基因的平末端产物。

(8) 在M13F(-21)和M13R引物干粉管加60 μ l灭菌水即为10 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
pBM28 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C。

2.转化

(1) 取10 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 $^{\circ}$ C 水浴中热击 30-90 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 $^{\circ}$ C，200rpm 振荡培养 60 分钟。

(5) 4000rpm 离心 1 分钟，去掉大部分上清，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 $^{\circ}$ 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，吹打混匀。

B.在25 μ l PCR反应体系中加入2-3 μ l细菌悬液为模板、M13F(-21)和M13R各0.5 μ l，PCR方法鉴定阳性克隆。

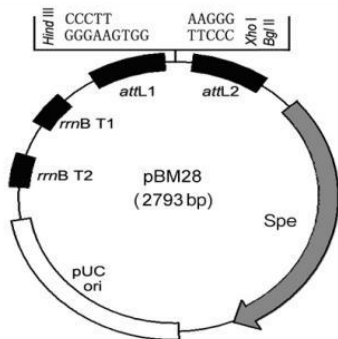
C. PCR扩增条件：95 $^{\circ}$ C预变性5分钟（裂解细胞，失活核酸酶），94 $^{\circ}$ C变性10-30秒钟，55 $^{\circ}$ C退火10-30秒钟（注：使用基因特异性引物做PCR鉴定时，退火温度则需按其最适温度进行调整），72 $^{\circ}$ C延伸（根据片段的大小决定延伸时间，通常每1-2分/1kb），30-35个循环，72 $^{\circ}$ C后延伸5分钟。1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果，有强烈的明显条带的克隆为重组体，与插入片段大小相近（由于扩增引物在克隆位置的两侧，所以PCR扩增出的DNA的长度比插入片段大337bp）可视为阳性克隆。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pBM28图谱，选择合适的限制性内切酶（*Hind* III, *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。

pBM28 载体图谱及多克隆位点序列



pBM28 sequence landmarks

rrnB T2 transcription termination sequence:268-295
 rrnB T1 transcription termination sequence:427-470
 M13 Forward (-21) primer binding site:536-553
 attL1:569-668(C)
 cloning site:691
 attL2:717-816
 T7 primer binding site:833-852(C)
 M13 reverse primer binding site:857-873
 Spectinomycin resistance ORF:986-1996
 pUC origin:2117-2790
 (C): complementary sequence

M13P(-21)primer binding site attL1

CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCAATAATGATTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTT

Hind III cloning site Xho I Bgl II

TATAATGCCAATTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAGCTTGTGTCGCTTCACCS\$AAGGCGACACCTCGAGAGATCTGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTG

ATATTACGGTTGAAACATGTTTTTCTGCCGAGTTCGAACACAGCCGGAACTCG\$STTCGCCGTGCGGAGCTCTCTAGACTGGTTCGAAAGAATGTTTCAAC

attL2

GCATTATAAGAAAGCATGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACCTATCAGTCAAATAAAATCATTATTGCTCATCCAGCTGATATCCCTATAGTGAGCT

T7 primer binding site

GTATTACATGGTCATAGCTGTTTCTCTGGCAGCTCTGGCCCGTGCTCA

M13R 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/ μ g 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:

>pBM28 (2793bp)

CTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAAGTGTGATACCGCTCGCCGAGCCG
AACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCCTCCCGCGCGTTG
GCCGATTCAATAATGCAGCTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGAATTAATACGCG
TACCGCTAGCCAGGAAGAGTTGTAGAAAACGAAAAAGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCGCTTAGTTTGATGCCTG
GCAGTTTATGGCGGGCTCTGCGCCACCCTCCGGGCGTTGCTTACAACGTTCAAATCCGCTCCCGGGGATTT
GTCCTACTCAGGAGAGCGTTACCAGACAAAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTCCGACTGAGCCTTCGTTTT
ATTTGATGCTGGCAGTTCCTACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCAAGCAGTTGTAACAGCAG
GGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCAATAATGATTTATTTGACTGATAGTGACCTGTCGTTGCAACAAATGATGA
GCAATGCTTTTTATAATGCCAAGTTGTACAAAAAGCAGGCTCCAGCTTGTGTCGCTCACCCACCCAGGGCGA
CACCCTCGAGAGATCTGACCCAGCTTCTTGTACAAAAGTTGGCATTATAAGAAAAGCATGCTTATCAATTTGTTGCAA
CGAACAGGTCACATAGTCAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCCCTATAGTGAGTCGATTACAT
GGTCATAGCTGTTTCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATC
ATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATAAAGGGGTGTTATGCGCTCAGCAACTGGTCCAGAAC
CTTGACCGAACGCGAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTATGACTGTTTTTTGGGGTACAGTC
TATGCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGGTTACGCCGTGGTGCATGTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTAC
GCAGCAGGGCAGTCGCCATAAACAAAGTTAAACATCATAGGGAAGCGGTGATCGCGAAGTATCGACTCAACTATC
AGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCATCTCGAACCGAGCTTGTGCGCGTACATTTGTACGGCTCCGCGATGGATGG
CGGCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGTGAAAACAGCGGGCAGCTTT
GATCAACGACCTTTTGGAACTTCGGCTTCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCAACATTGTTGT
GCAGCAGCATCATCCGTGGGTTATCCAGTAAGCGCAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCT
TGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCAGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGC
CTTGGTAGGTCCAGCGCGGAGAACTCTTTGATCCGGTCTGTAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTT
AACGCTATGGAAGTTCGCCCGGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAG
CGCAGTAACCGCAAAAATCGCGCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGCAATGGAGCGCTGCCGGCCAGTATCAGCC
CGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGA
ATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCAACAAGGTAGTCGGCAAAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTG
GCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGAGTTACGCGCTGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGA
AACAAAAAACACCCTACCAGCGGTGGTTGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGG
CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAAGCTGTGAGC
ACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGGATAAGTCGTGCTTACCGGTT
GGACTCAAGACGATGTTACCGGATAAGCGCGACCGTTCGGGCTGAACGGGGGTTGCTGCACACGCCAGCTTGGAG
CGAACGACTACACCGAAGTACCTACAGCTGAGCATTTGAGAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGC
GGACAGGTATCCGGTAAGCGCGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGGAGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGATCT
TTATAGTCTGTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTACGGGGGGCGGAGCCTATG
GAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTCACATGTT

BM20220716