

pBM20S Toposmart 克隆试剂盒

(pBM20S Toposmart Cloning Kit)



产品信息：

组分	CL108-01 (20次)	CL108-02 (20次×3)
pBM20S Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert LacZα	5μl	5μl
M13F(-47) Primer(使用前加入45μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
M13R(-48) Primer(使用前加入45μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3

保存条件：-20℃保存。

产品介绍：

pBM20SToposmart克隆试剂盒利用痘苗病毒的拓扑异构酶I(Topoisoмерase 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、Taq plus、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的带A尾的PCR产物。试剂盒中的pBM20S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。

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) 克隆位点两侧没有酶切位点。
- (5) 载体具有氨苄青霉素和卡那霉素双抗性。

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
pBM20S 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。

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 产物经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 1-3μlPCR 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，转化具有 α互补功能的大肠杆菌感受态细胞（如 DH5α、TOP10、Mach1-T1 等）。菌液涂布在含有 IPTG 和 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

- （1）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。
- （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）。

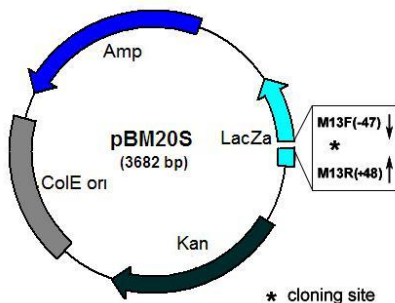
5. 阳性克隆鉴定：

- （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，加入5μM浓度的M13F(-47)和M13R(-48)各1μl，进行PCR扩增。
 - C.PCR扩增条件：94℃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126bp）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。也可以

用PCR方法，使用特异性引物来鉴定阳性克隆。

(2) 测序：用M13F(-47)和M13R(-48)对重组质粒进行测序分析。

pBM20S 载体图谱



pBM20 sequence landmarks

LacZα fragment:332-658(C)
M13 forward (-47) priming site:538-561
M13 reverse (-48) priming site:667-689
Multiple cloning site:581-650
Kanamycin resistance ORF:1098-1892
ColE origin of replication:2044-2687
Ampicillin resistance ORF:2835-3695 (C)

M13F(-47)primer binding site →

GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACG

Cloning site

ACGCCAGTGAATGCGAGCTGCCCTTSSSSAAGGGCAGCACCCTTGGCGTAATCATGTCATAG

CTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAG

← M13R(-48)primer binding site

- (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 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

>pBM20S(3682bp)

AATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTAGAAAAATAAACAAAT
AGGGGTTCCGCGCATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAATTATCATGACATTAACTAT
AAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACATATGCA
GCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGC
GGGTGTTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGTGAGAGTGCACCATATG
CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAA
CTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAG
GCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATGCGAGCTG

CCCTT\$\$\$AAGGGCACGACCGCTTGGCGTATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA
ATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA
ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG
CGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT
CGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTTGGACAGCAAGCGAACGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTG
GTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCTCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATC
AAGCTCTGATCAAGACAGGATGAGGATCGTTTCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGG
CCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGTGTT
CCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTGCAAGACCGACCTGTCGGGTGCCCTGAATGAACTGCAA
GACGAGGCAGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTACT
GAAGCGGAAGGACTGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTACCTTGCTCCTG
CCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGGTACCTGCCATTCCGAC
CACCAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAAGCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG
ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAG
GATCTCGTCGTACCCATGGCGATCCCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTGATC
GACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGACCGCTATCAGGACATAGCTGTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGC
TTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATCTCGACGCATCGCCTCT
CTATCGCTTCTTGACGAGTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTTATTTCTCCTTACGCATC
TGTGCGGTATTTACACCGCGGATCTGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAA
CATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCAGCGTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATA
CCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTGCGGTGAGTCTG
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCCAGCCGTGCGCCTTATCCGGTAAGTATCGT
CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTA
TCTGCGCTCTGCTGAAGCAGTTACCTTCGGAAGAGTGGTAGCTCTTGATCCGCGAAACAAACCCGCT
GGTAGCGGTGTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATC
TTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTAAAGTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAACTTGGTCTGACA
GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAC
GCTCACC GGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGCGGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAAC
TTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCG
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTC
CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCG
TTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCC
ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCACTTGAGAATAGTGTATGCGCGACCCAG
TTGCTCTTGCCGCGGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAGTGCTCATCAATTGGAAAA
ACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGAC
CCAAGTATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA
AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTT

BM20220715