

pBM30 Toposmart 克隆试剂盒

(pBM30 Toposmart Cloning Kit)



产品信息:

组分	CL110-01 (20次)	CL110-02 (20次×3)
pBM30 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
T7Primer(使用前加入54μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
T7t Primer(使用前加入54μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3

保存条件: -20℃保存一年

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pBM30原核表达载体中。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。引物T7和T7t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 具有 T7 启动子，类似于 pET30 载体，具备原核表达所需的所有调控元件。适用于外源基因在大肠杆菌中的高水平表达。
- ⑤ 带 His.tag 和 S.tag 两种纯化标签。
- ⑥ 具有凝血酶和肠激酶两种蛋白酶酶切识别序列。
- ⑦ 载体具有卡那霉素抗性。

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。如果表达蛋白需 C 端带 6His 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 6His 标签的终止密码子TGA 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℃-30℃)，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 pBM30 载体为卡那抗性，以氨苄抗性的模板质粒扩增的 PCR 产物直接连接后的产物可涂布在卡那抗性的 LB 平板上。以卡那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，表达产物大小为 32.6kD。
- ⑦ 往 T7 和 T7t 引物干粉管加 100μl 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
pBM30 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

- 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）。

3. 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、T7和T7t各1μl，PCR方法鉴定阳性克隆。
- 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（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

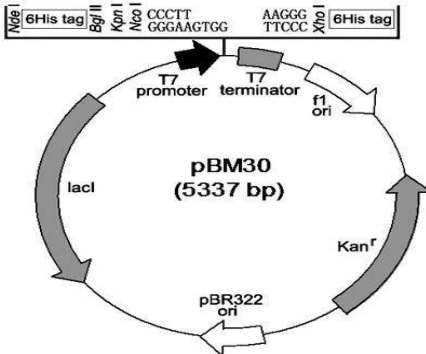
条带的克隆为重组体，与插入片段大小相近（由于扩增引物在克隆位置的两侧，所以PCR扩增出的DNA的长度比插入片段大349bp）可视为阳性克隆。菌落PCR方法鉴定重组体时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

(2) 限制性酶切分析阳性克隆

pBM30为低拷贝质粒。挑取单菌落接种于8mL含卡那的LB培养液中，过夜培养，小量制备质粒，参考pBM30图谱，选择合适的限制性内切酶（*Nde*I, *Bgl* II, *Kpn* I, *Nco*I, *Xho* I），酶切后电泳鉴定重组质粒。

(3) 测序：用T7和T7t对质粒进行测序分析。

pBM30 载体图谱



pBM30 sequence landmarks

T7 Promoter:138-154
His tag sequence:229-246; 397-414
S tag sequence:280-324
Cloning site: 375
T7 terminator:482-528
f1 origin:564-953
Kan coding sequence:1046-1861(C)
pBR322 origin: 2571
lacI coding sequence:4001-5083(C)
(C):complementary sequence

T7 promoter primer
T7 promoter

GC CGGTGATGCGCGGCACGATGCGTCGCGGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGGAAATTAATAACGACTCACTATAGGGGAATTGTG
lac operator Xba I RES Nde I His tag
AGCGGATAACAATTTCCTCTAAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATCTTCTTGTGCTG
MetHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeu
Bgl II Kpn I
GTGCCAGCGGCTCTGCTATCAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAAAGCCACACATGGACAGCCACATCTGGGTACCGACGACGAC
ValProArgGlySerGlyMetLysGluThrAlaAlaAlaLysPheGluArgGlnHisMetAspSerProAspLeuGlyThrAspAspAspAsp
Thrombin S. tag
Nco I cloning site Xho I His tag
AAGGCATGGTGTGTGCTCCCTTCACCGGCAAGGGCGACACCCCTCGAGCACACCAACCAACACATGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCG
LysAlaMetValValSerProPheThrLysGlyAspThrLeuGluHisHisHisHisHis
Enterokinase T7 terminator
AAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGACCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGCTCTTAGGGGTTTTTTGCTGA
T7 terminator primer

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

(注：部分序列，若看全部序列请到博迈德官网查阅，网址：www.biomed168.com)

>pBM30(5337bp)

```

CCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACC
TGTTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATCGGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCCG
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAAGAAATAATTTTG
TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATCTTCTTCTGGTCTGGTGCCACGC
GGTCTCGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCT
GGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGTTGTGTGCGCTTACCCTCACC$$$AAGGGCGACACCCTCG
AGCACCACCACCACCACCTAGCATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAGGAAGCTGAGTTGGC
TGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTT
TTTGCTGAAAGGAGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCG
CGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCACGCGCCCTAGCGCCCGCTCTCT
TTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCAGCTTCGCCGGCTTTCCCGTGCAAGCTCTAAATCGGGGCG
TCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAATTGATTAGGGTGATG
GTTACAGTAGTGGGCCATCGCTAGATGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTTCTTTGATTT
ATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTAACGCG
AATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAAATTTACAGTTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCTTAGAAAAAATC
ATCGAGCATCAAAATGAAATCGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGAAGAAAGCC
GTTCTGTAATGAAGGAGAAACACTCACCAGCGAGTTCCATAGGATGGCAAGATCTGGTATCGGT
CTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAAAGGTTATC
AAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTATGCATTCTTT
CCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAAACCGTT
ATTCATTCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAAC
AGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAG
GATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATC
AGGAGTACGGATAAAAAATGCTTGTAGTGGTCGGAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGAC
CATCTCATCTGTAACATCTGTAATGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACATCTGCGCATCG
GGCTTCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCC
ATATAAATCAGCATCTGATGTTGAATTTAATCGCGGCCATAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGG
CTCATAAACACCCCTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTT
AACCGTAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATC
CTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACAT
ACTCGCTCTGTAATCTGTTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGCTGTGCTTCTTACCGGGT
GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC
AGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC
GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCGAGGGTCGGAACAGGAG
AGCGCACGAGGGAGCTTCAGGGGAAACGCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACC
TCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGC
AACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTCTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTGCGTTATC
CCCTGATTCTGTGGATAAC
  
```

BM190328