

pBM40Toposmart 克隆试剂盒

(pBM40 Toposmart Cloning Kit)



产品信息:

组成	CL111-01 (20次)	CL111-02 (20次×3)
pBM40 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
CMVforward Primer(使用前加入50μl ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
SV40PolyArev Primer(使用前加入50μl 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pBM40哺乳动物表达载体中。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。引物CMVforward和SV40PolyArev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 CMV 启动子，适用于外源基因在哺乳动物细胞中的表达，带新霉素抗性基因，便于稳转细胞株的筛选。C 端带 FLAG 标签序列便于表达的目的蛋白质的检测。
- (5) 相对于 pcDNA3.1 等其它哺乳动物表达载体，pBM40 载体具有更小的质粒骨架，转染效率高。
- (6) 载体具有卡那霉素和新霉素抗性。

注意事项:

- (1) 引物要求: PCR 引物 5'端不能进行磷酸修饰，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，通常用 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℃。若片段存在高 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 1-3 μ l 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 pBM40 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 26.9kD。
- (7) 分别往 CMVPforward 引物干粉管和 SV40PolyArev 引物干粉管加入 100 μ l 和 108 μ l 灭菌水就可以得到 5 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
pBM40 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℃ 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 5 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℃ 水浴中热击 30 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℃，200rpm 振荡培养 60 分钟。
- (5) 4000rpm 离心 1 分钟，去掉部分上清，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℃ 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

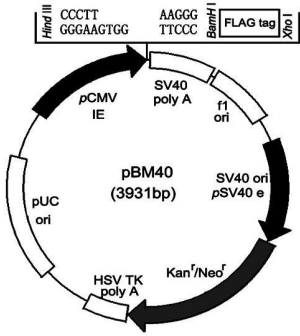
- A. 用 10 μ l 吸头挑选克隆至预先加有 10 μ l 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中，吹打混合。
- B. 在 25 μ l PCR 反应体系中加入 2 μ l 细菌悬液为模板、5 μ M 浓度的 CMVPfor 和 SV40PolyArev 各 1 μ l，PCR 方法鉴定阳性克隆。
- C. PCR 扩增条件：95℃ 预变性 5 分钟（裂解细胞，失活核酸酶），94℃ 变性 10 秒钟，55℃ 退火 10 秒钟（注：使用基因特异性引物做 PCR 鉴定时，退火温度则需按其最适温度进行调整），72℃ 延伸（根据片段的大小决定延伸时间，通常每 1-2 分/1kb），30-35 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 325bp）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含卡那的LB培养液中，过夜培养，小量制备质粒，参考pBM40图谱，选择合适的限制性内切酶（*Hind* III, *Bam*HI, *Xho* I），酶切后电泳鉴定重组质粒。

(3) 测序：用CMVPfor和SV40PolyArev对质粒进行测序分析。

pBM40 载体图谱



pBM40 sequence landmarks

CMV immediate early promoter:1-589
 CMV promoter forward primer binding site:519 -539
 Cloning site:625
 FLAG coding sequence:644-667
 SV40 early mRNA polyadenylation signal:818-868
 SV40 PolyA reverse primer binding site:824-843
 f1 single-strand DNA origin:915-1202
 Bacterial promoter for expression of Kanamycin:1264-1392
 SV40 origin of replication:1643-1778
 SV40 early promoter:1476-1744
 Kanamycin/neomycin resistance gene:1827-2621
 HSV TK polyadenylation signal:2857-2875
 pUC plasmid replication origin:3206-3849

CMV forward primer binding site

CGTAAACAACCCGCCCCATTGACGCCAAATGGGCGGTAGCGGTGTACGGTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGAT

Hind III cloning site *Bam*HI flag tag coding sequence *Xho* I
 CCGTAGCGGCTACCGGAAGCTTGTGTGCCCTTACC\$\$\$AAGGGCGACACCGGATCCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAACTCGAGA
 GGGCATCGCGATGGCCTTCGAAACACAGCGGAAGTGG\$\$\$TTCCCGCTGTGGCTAGGCTGATGTTCTACTGCTACTGTTCAATGAGCTCT

GATCTCTATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAT

ATGCAATGTGTGTGTAACCTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAAATAGCATCACAAAATTCACAAAATAAAGCA

SV40 PolyA reverse 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

>pBM40 (3931bp)

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
 AAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA
 CGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCCAGTACATCAAG
 TGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACAT

GACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG
CAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGG
GAGTTTTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACATCCCGCCCATTAGCGCAAAATGGG
CGTAGGCGGTACGGTGGAGGCTTATATAAGCAGAGCTGTTAGTAGAACCCTCAGATCCGCTAGCGCTACCG
GGAAAGCTTGTGTCG **CCTT** CACC\$\$\$ **AAGGG** CGACACCGGATCCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAACCT
GAGAGATCCTCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCT
GAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAA
TAGCATCACAAATTT CACAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTTAGTTGTGGTTGTGTCAAAACCTCATCAATGTATC
TTAAGGCGTAAATTTGAAGCGTTAAATTTTTGTTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCA
ATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGCTAGA
TGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGTCGAGGTTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACC
CTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAG
CGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCAGTAAACCCACACCCGCCCGCG
CTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATT
TTCTAAATACATCAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAAATAATATGAAAAAGGA
GTTCTAGTGGCGGAAAGAACCGCTGTGGAATGTGTGCTAGTTAGGCTGTGAAAGTCCCGAGGCTCCCCA
GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG
CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCG
CCCTAACTCCGCCAGTTCGGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGACAGAGCGCGAG
GCCGCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCG
ATCAAGAGACAGGATGAGGATGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGAATGCACGCAGGTTTCCGGCCCTGG
GTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTGATCCCGCGTGTTCGGCCTGT
CAGCGCAGGGGCGCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGTTGCCCTGAATGAAGTCAAGACGAGG
CAGCGCGCTATCGTGGCTGCCACGACGGGCTTCTTGGCAGCTGTGCTGCAGCTTGTCACTGAAGCGG
GAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTGTCTCTGCCGAGAA
AGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACACCAAG
GCAAACTCGCATCGAGCAGCAGCTCGGATGGAAGCCGCTTGTGCATCAGGATGATCGCATGGCAAGA
GCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCAGTCCGACGAGGCTGGAGGATCTGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTG
GCCGGCTGGGTGTGGCGGACCCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG
CGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTGCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATGCGCTTCTATCGCC
TTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGACTCTGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGCCCAACCTGCCATCA
CGAATTTGATTTCCACCGCGGCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCGGAATTTTCCGGGACCCGCGCTGGAT
GATCTCCAGCGCGGATCTCATGTGGAGTTCTTCCGCCACCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACCGGAAG
GAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTT
TGTTCAAAACCGGGGTTCCGTTCCCAAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAA
TAGCCCCGCTTTCTTCTTTTCCCAACCCACCCCAAGTTCCGGTGAAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACG
TCGGGGCGGACGCCCTGCCATAGCTCAGGTTACTCATATATACTTAGATTGATTTAAAATCTATTTTTAATTT
AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACCGTGAATTTTCGTTCCACTGAG
CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
CAAAAAACCCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
GGCTTACGACAGCGCAGATACCAAACTACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
GTAGCACCGCTACATACCTCGCTGTCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTT
ACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTACCAGGATAAGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGTTCCGTCACA
CAGCCCGCTTGGAGCGAACGACTTACCCGAACCTAGACCTACAGCTGAGTACCTATGAGAAAGCGCCACCG
TTCCCGAAGGGAGAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACAGGGAG
CTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCCGCCCTCTGACTTGAGCGTGGATTTTTG
TGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTT
GCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

BM190328