# pBM16K Toposmart克隆试剂盒

（pBM16K Toposmart Cloning Kit）

| 组 成 | CL072-01 (20次) | CL072-02 (20次x3) |
|---|---|---|
| pBM16K Vector (20ng/μl ) | 20μl | 20μl×3 |
| 10×Toposmart | 20μl | 20μl×3 |
| Control Insert LacZα | 5μl | 5μl |
| M13F Primer(使用前加入60μl ddH2O) | 0.1OD | 0.1OD×3 |
| M13R Primer(使用前加入60μl ddH2O) | 0.1OD | 0.1OD×3 |

**产品信息：**

**保存条件：**-20℃保存，有效期一年。

**产品介绍：**

pBM16K Toposmart克隆试剂盒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pBM16K载体为线性化的质粒。可以用引物M13F和M13R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）克隆位点两旁都有 *Sma*I 和 *EcoR* V 酶切位点，适合单酶切鉴定。

（5）载体具有卡那霉素抗性。

**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 |
| pBM16K 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 1-3μl PCR 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 卡那平板上，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.阳性重组子的鉴定**

菌落 PCR

（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。

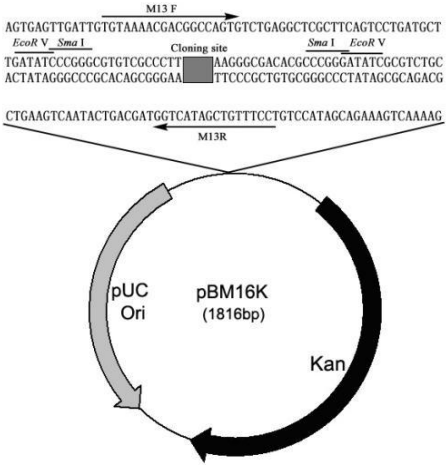
B.25μl PCR反应体系：取2μl细菌悬液为模板、加入5μM浓度的M13F/M13R各1μl进行PCR扩增。

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，72℃延伸（ 根据片段的大小决定延伸时间，通常每1min/1kb）X秒，30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（M13F/M13R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138bp）可视为阳性克隆。菌落PCR方法鉴定重组子时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

（2）测序：用M13F、M13R通用引物对阳性质粒进行测序分析。

**pBM16K载体图谱**




**pBM16K sequence landmarks**

M13F primer binding site:14-32

M13R primer binding site:139-155

Kanamycin resistance ORF:304-1119

pUC ori:1168-1783

**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×$10^7$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

>pBM16K(1816bp)

AGTAGTTGATTGTGTAAAACGACGGCCAGTGTCTGAGGCTCGCTTCAGTCCTGATGCTTGATATCCCG
GGCGTGTCGCCCTT$$$AAGGGCGACACGCCCGGGATATCGCGTCTGCCTGAAGTCAATACTGACGAT
GGTCATAGCTGTTTCCTGTCCATAGCAGAAAGTCAAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCG
GCACGTAAGAGGTTCCAACTTTCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGAGTTAT
CGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCCG
CGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATC
AGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAG
GTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGGCTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTT
CCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCCAGGGAA
AACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGT
TCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACGGCGATCGCGTATTTCGTCTC
GCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGGTGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGG
CTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTCTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCA
CTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTT
GGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTC
TCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGT
TTCACTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATGAGGGCCCAAATGTAATCACCTGGCTCACCTTCGGGTG
GGCCTTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGATG
CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGC
GTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGG
CTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT
GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGG
TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAC
CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAG
AAGATCCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCCCACCCGTGAAGGTGAGCC

BM190328