

BM16A Toposmart Cloning Kit

简易操作手册

目录号

CL1071-01、CL1071-02

产品组成

组分	C1071-01 规格 (20 次)	C1071-02 规格 (60 次)
pBM16A Vector (20ng/ μ l)	20 μ l	20 μ l \times 3
10 \times Toposmart	20 μ l	20 μ l \times 3
Control Insert	5 μ l	5 μ l
M13F Primer	0.1OD	0.1OD \times 3
M13R Primer	0.1OD	0.1OD \times 3
pBM16A Vector (20ng/ μ l)	20 μ l	20 μ l \times 3

*线性化载体，可与试剂盒提供的线性化片段重组，排除实验其他影响因素； **线性化片段，可与试剂盒提供的线性化载体重组，排除实验其他影响因素。

保存条件

-20 $^{\circ}$ C保存 12 个月，避免反复冻融。

产品简介

pBM16A 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、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、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的带A尾的PCR产物。试剂盒中的pBM16A载体为线性化的质粒。可以用引物对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，无需蓝白斑筛选

注意事项

- (1)片段的选择：各种DNA聚合酶扩增的PCR产物。
- (2)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。

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
pBM16A Topo载体	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。

注意：此步骤不要在低温条件下（冰水浴）上 操作。

2.反应温度及片段要求

室温下 (20-30 $^{\circ}$ C) 放置 0-5 分钟，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 $^{\circ}$ C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

室温下 (20-30 $^{\circ}$ C) 反应时间 5-30 分钟，如果室温较低，推荐使用PCR 仪器控制温度。可以设置 25 $^{\circ}$ C反应 5 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 0.5-1 μ l PCR 产物原液进行克隆。

3. 阳性对照反应

取 1 μ l 试剂盒提供的 1kb 长度的对照片段 LacZ 基因 α 肽片段进行克隆, 转化具有 α 互补功能的大肠杆菌感受态细胞 (如 DH5 α , TOP10, Mach1-T1 等)。菌液涂布在含有 IPTG, 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 5 μ l 连接产物到 50-100 μ l 刚刚融化的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴 2-30 分钟。
2. 42 $^{\circ}$ C 水浴中热击 30 秒钟。
3. 立刻置于冰水浴中 2 分钟。
4. 加入 300-500 μ l 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB, 37 $^{\circ}$ C, 200-250rpm 振荡培养 60 分钟。

注: 小于 2kb 片段可以不复苏, 直接涂平板。

5. 吸取 200 μ l 菌液涂布。为了得到更多的菌落, 可以先 4000rpm 离心 1 分钟, 去掉部分上清, 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)。

5. 阳性重组子的鉴定

菌落 PCR

(1) 菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆

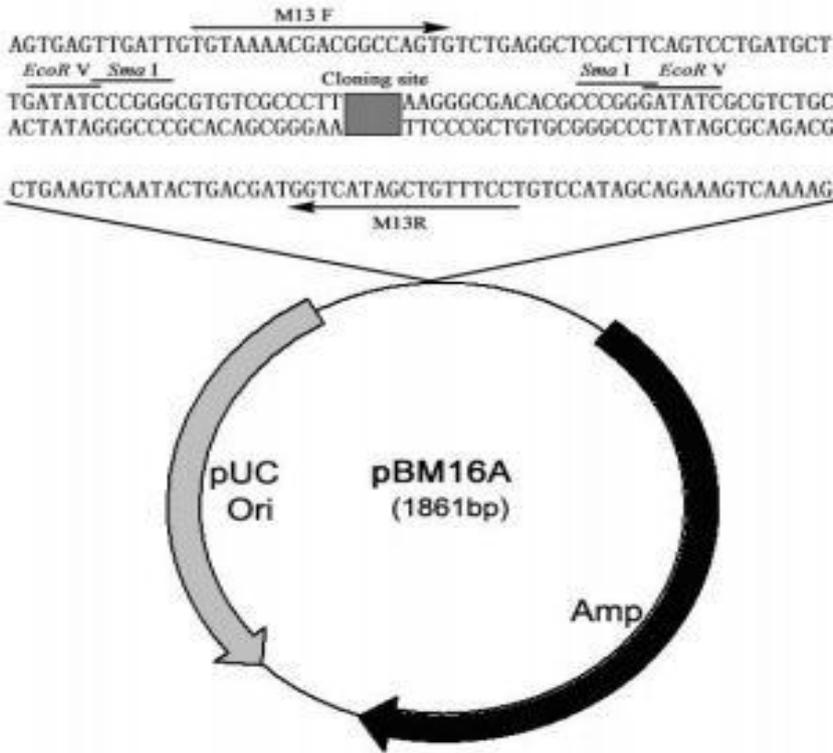
① 用 10 μ l 吸头挑选克隆至预先加有 10 μ l 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中, 吹打混合。

② 25 μ l PCR 反应体系: 取 2 μ l 细菌悬液为模板、加入 5 μ M 浓度的 M13F/M13R 各 1 μ l 进行 PCR 扩增。

③ 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 秒钟, 55 $^{\circ}$ C 退火 10 秒钟, 72 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ 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 (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。

6.pBM16A载体图谱



7.常见问题分析

- (1) 重组子克隆菌少，或阳性率低：
- (2) 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
- (3) 连接反应在低温下（如放碎冰上）操作，应该在室温下操作。
- (4) PCR 片段加入量太多或太少，按照推荐量加入。
- (5) PCR 纯度低，重新扩增或重新纯化PCR 产物。
- (6) PCR 质量低，切胶时在紫外下照射时间长，需重新制备。
- (7) PCR 扩增结束后，应该再延伸5-10 分钟，确保片段延伸完全。
- (8) 转化后没有复苏培养，可以加入SOC 或LB，培养60 分钟。
- (9) 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，或换用低拷贝质粒载体。

载体序列：

>pBM16A Topo

```

AGTGAGTTGATTGTGTAAAACGACGGCCAGTGTCTGAGGCTCGCTTCAGTCCTGATGCT
TGATATCCCGGGCGTGTGCGCCCTT$$$AAGGGCGACACGCCCGGGGATATCGCGTCTGC
CTGAAGTCAATACTGACGATGGTCATAGCTGTTTCTGTTCCATAGCAGAAAGTCAAAG
CCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACTTTACCATAA
TGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGG
AAGCTAAAATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCACTTATTCCGTTTTTTGCGGCATTTTG
CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGT
  
```

TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAG
TTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC
GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTC
AGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTA
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGG
ATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGA
CGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC
GGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATA
AAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA
TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGCTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTA
AGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGGCCC
AAATGTAATCACCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGATGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA
ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
GGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAA
GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACT
ATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGG
CCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGT
TACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
GTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT
CCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCCACCCGTGAAGGTGAGCC