

公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！

商品属性：

产品名称	规格	货号
pBM30 Toposmart Cloning Kit (TOP0克隆载体 原核表达)	20 次	P-PR1209

保存条件：-20°C保存

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：

- (2) 只适合平末端 PCR 产物的快速、高效、定向克隆。
- (6) 载体具有卡那霉素和新霉素抗性。
- (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，通常用 15 分钟。

(4) 连接温度：室温 (22°C-30°C)，可使用 PCR 仪控温。最佳反应温度为 25°C。若片段存在高 GC 等复杂结构，可在 37°C反应。

(5) 产物要求：为保证 PCR 产物完整，建议 72°C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 32.6kD。

(7) 往 T7 和 T7t 引物干粉管加 100 μ l 灭菌水即为 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
pBM30 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°C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°C。

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 $^{\circ}$ C 水浴中热击 30 秒钟。
- (3) 立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- (4) 加入 900 μ l 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB, 37 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 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。B. 在 25 μ l PCR 反应体系中加入 2 μ l 细菌悬液为模板、T7 和 T7t 各 1 μ l，PCR 方法鉴定阳性克隆。

C. PCR 扩增条件：94 $^{\circ}$ 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（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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ 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（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（NdeI, Bgl II, Kpn I, NcoI, 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。