

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
pBM40 Toposmart Cloning Kit (TOP0克隆载体 真核表达)	20 次	P-PR1211

保存条件：-20℃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 CMVforward 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°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°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。

C. PCR扩增条件: 95°C预变性5分钟 (裂解细胞, 失活核酸酶), 94°C变性10 秒钟, 55°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°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°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, 选择合适的限制性内切酶 (Hind III, BamHI, 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。