pBM22 快速克隆试剂盒

产品信息：

组成	CL115-01 (20次)	CL115-02 (20 次×3)
pBM22 Vector (40ng/μ l)	20μl	20μl×3
2×T4 DNA ligase master mix	100μl	100μl×3
Blunting Enzyme	20μl	20μl×3
Control Insert EGFP	5μl	5μl
PBM22F Primer (使用前加入60ul ddH2O)	0.1OD	0.1OD ×3
PBM22R Primer(使用前加入60ul ddH2O)	0.1OD	0.1OD ×3

保存条件：-20℃保存

产品介绍：

pBM22快速克隆试剂盒为一种阳性选择克隆系统，克隆区域位于pBM22质粒的自杀基因（lethal gene）内部。当连接产物转化大肠杆菌后，有外源片段的插入的重组质粒导致载体上的自杀基因功能丧失，细菌存活，无片段连接（载体自连）时，自杀基因表达的毒蛋白使细菌不能存活。该试剂盒利用T4 DNA 连接酶（T4 DNA ligase）的连接活性将平末端DNA片段克隆到具有磷酸化末端的线性化载体pBM22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产物或各种方法产生的平末端双链DNA片段。由Taq、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的非平末端PCR产物，可通过平末端化酶（Blunting Enzyme）处理成为平末端DNA用于连接。阳性克隆可以用试剂盒提供的引物PBM22F和PBM22R进行菌落PCR或测序鉴定。

产品特点：

（1）连接反应仅需5-30分钟。

（2）适用于平末端PCR产物和平末端双链DNA片段。

（3）适用于磷酸化或非磷酸化的DNA片段，克隆位点两侧无酶切位点。

（4）pBM22为氨苄抗性，具高拷贝复制起始子。

操作步骤：

1.片段的准备

（1）平末端PCR产物以及平末端的酶切产物。

（2）非平末端PCR产物和粘性末端酶切产物的平末端化处理。PCR扩增结束后，往反应管中加入1μl的Blunting Enzyme，继续在72℃保温15-30分钟；酶切完成后，往反应管中加入终浓度为0.2μM的dNTPs以及1μl的Blunting Enzyme，72℃保温30分钟。

（3）琼脂糖凝胶电泳分离DNA片段，切胶回收目的片段。

2.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	Xμl
pBM22 Vector	1μl
2×T4 DNA ligase master mix	5μl
补水至总体积至	10μl

轻轻混合，离心数秒。25℃反应5分钟，反应结束后，将离心管置于冰上，若暂时不做转化实验，可将连接产物-20℃冻存。**注意：**1.PCR产物的末端为羟基，不能够自连。平末端酶切产物由于存在5′磷酸基团，片段之间能够自连，如果连接体系中片段量过多，可能有多聚体产物产生。如果插入片段长度大于3kb，可以将反应时间最大延长至30min。

（4）片段用量：DNA片段一般使用量为50-100ng左右。载体与片段的摩尔比控制在1:3-1:10，对照片段为727bp全长EGFP基因的平末端产物。

3.转化

（1）将连接产物加到刚刚化冻的感受态细胞中，轻轻混匀，冰水浴20-30分钟。

（2）42℃水浴热击90秒钟，切勿晃动水面。热击结束后立即置于冰水浴中保持2分钟。

（3）往管中加500μl的SOC或LB培养基，放入37℃摇床中200rpm左右培养60分钟。

（4）4000rpm离心1分钟，弃掉部分上清，保留100-200μl，用吸头轻轻吹打菌块重悬细菌，取全部菌液涂布于氨苄或卡那抗性的LB固体培养板上，待液体吸干后，倒置平板入37℃培养过夜（12-16小时）。

备注：若感受态使用方法不同，请按照感受态细胞产品说明书进行操作。

4. 阳性克隆鉴定：

（1）菌落PCR方法鉴定阳性克隆

①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。

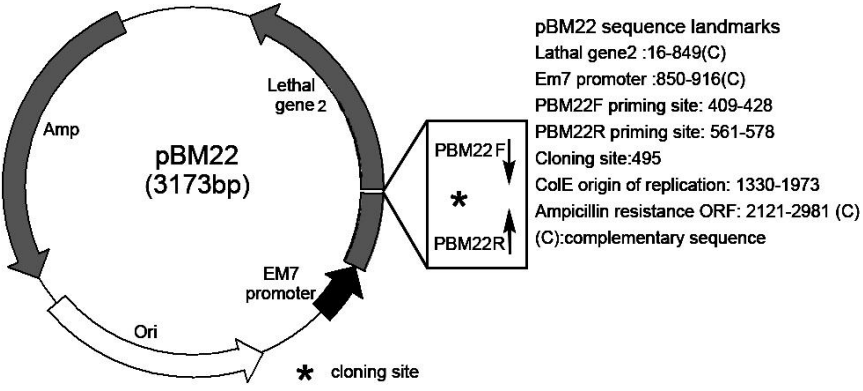
②25μl PCR反应体系：取2μl细菌悬液为模板、加入5μM 浓度倒入PBM22F和PBM22R各1μl进行PCR扩增。

③PBM22引物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 min/1kb）60秒，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PBM22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170bp）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）测序：用PBM22F和PBM22R对阳性质粒进行测序分析。

pBM22 载体图谱及多克隆位点序列



PBM22F

ACTCAGAGAGCATGAAGTTCGCGATTTCAGAAATGTTTTTATGGCTGCGTTCAATAGCGTTGCCTGCGGCCATCAGATCCTGGTCGCCACGC

cloning site

TTACCAACCAGCAGACCGTTACGGATGTTGATGAT***ATCTTTACCTTGGTGTTTCGCTTCCGCAACCAGAACAACACGCCACTCGCCGTA

PBM22R

GTCGTCTTTAACTTCAACGATACCGCCGTCCGGTTTAATAGAAGAATTAGATACGAACAGGGTACCACCCAGGTCTGGGTCGATCTTTTTCA

BM20220716