

pClone007 Blunt Simple Vector Kit

■ 目录号

TSV-007BS

■ 产品简介

本产品利用Vaccinia topoisomerase I能在瞬间完成连接反应的优良特性,结合本公司独创的载体制备工艺,完美解决传统T-A克隆的各种缺陷,实现克隆技术的革命飞跃。

■ 产品组成

| 组分 | 规格 (20次) |
|------------------------------------------|----------|
| pClone007 Blunt Simple Vector (15 ng/μL) | 20 μL |
| 10× Topo Mix | 20 μL |
| Super PCR Mix (green)* | 500 μL |
| Control Template (50 ng/μL)** | 10 μL |
| pUC19 (10 pg/μL)*** | 10 μL |

* 菌落及菌液鉴定 PCR试剂,浓度1×,为PCR Mix与M13F-47/M13R-48通用引物的混合物;

** 阳性对照片段,用于检测目的产物的质量,大小为1,000 bp;

*** 阳性对照质粒,用于检测感受态细胞的质量,抗性为Amp。

■ 产品应用

本产品适用于≤5,000 bp目的片段的平末端克隆。

■ 产品特点

- 低背景,阳性率可达95%;
- 5分钟连接;
- 无需蓝白斑筛选;
- 无多克隆位点,连接300 bp以下的小片段可避免测序中断的情况发生。

■ 使用方法

1. 目的片段准备

- 引物要求:引物不能磷酸化;
- 产物末端:平末端;
- 产物鉴定:PCR产物需进行凝胶纯化回收,推荐使用擎科DNA凝胶回收试剂盒(目录号:TSP601);胶回收产物经电泳检测质量与浓度后再进行连接反应。

2. 配制反应体系:推荐10 μL体系

| 组分 | 用量 |
|-------------------------------|-------------|
| 目的片段 | 1 μL~8 μL |
| pClone007 Blunt Simple Vector | 1 μL |
| 10×Topo Mix | 1 μL |
| ddH ₂ O | Up to 10 μL |

注:所有溶液直接加入管底后用移液器吹打混匀。

插入片段推荐用量

| 插入片段大小(bp) | 最佳用量(ng) |
|------------|----------|
| <300~<1000 | 10~50 |
| 1000~2000 | 50~100 |
| 2000~5000 | 100~200 |

3. 片段连接

上述连接体系置于PCR仪或金属浴中25°C反应5 min(若片段较大时,可加长连接时间至20 min以提高连接效率),反应完成后立即转化,请勿置于冰上或冰箱中,否则会降低连接效率。

4. 转化

推荐使用擎科Trelief® 5α Chemically Competent Cell(目录号:TSC-C01)进行转化,转化效率可达 1.5×10^{10} cfu/μg。转化步骤如下:

- 1) 取100 μL冰浴上融化的感受态细胞,加入10 μL连接产物,轻轻混匀,冰上静置25 min。
- 2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min(冰上静置过程中请勿晃动样品,否则会降低转化效率)。
- 3) 向离心管中加入700 μL无抗性LB培养基,混匀后37°C,200 rpm复苏1 h。
- 4) 根据实验需要,吸取不同体积的复苏液均匀涂布到含Amp抗生素的LB培养基上,将平板倒置放于37°C培养箱过夜培养。

5. 阳性克隆检测

1) PCR检测

用枪头挑取白色单菌落到10 μL的无菌水中,吹打混匀后取1 μL到20 μL Super PCR Mix (green) 中轻微搅动即可。

PCR程序如下

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|-----|--------|---------|-------|
| 预变性 | 98°C | 2 min | 1 |
| 变性 | 98°C | 10 s | 25~30 |
| 退火 | 58°C | 10 s | |
| 延伸 | 72°C | 10 s/kb | 1 |
| 终延伸 | 72°C | 2 min | |
| 保存 | 4~12°C | ∞ | |

若插入片段大于3,000 bp,为保证鉴定稳定有效,建议提质粒进行酶切鉴定或者直接测序。

2) 限制性酶切分析

挑取单克隆接种于LB/Amp液体培养基中,37°C 250 rpm过夜摇菌,提取质粒,选择合适的限制性内切酶酶切后电泳鉴定。

6. 测序

使用M13F(TGTA AAAACGACGCCAGT)及M13R(CAGGA AACAGCTAT-GACC)测序。

■ 常见问题及解决方案

Q1. 克隆数少或者不长克隆?

- 1) 连接体系放冰上或冰箱中,加入感受态时没有立即混匀低温会显著降低Topo酶连接效率,连接反应结束后及时转化,不能置于冰上或冰箱中;加入感受态时迅速吹打搅拌均匀,以上两点操作可以有效提高克隆数。
- 2) 感受态效率低
推荐Trelief® 5α Chemically Competent Cell(目录号:TSC-C01),转化效率可达 1.5×10^{10} cfu/μg;

自制钙转感受态与本产品兼容性不佳,转化效率仅 10^7 cfu/μg;

感受态保存不当,如放置于-20°C或反复冻融会进一步降低转化效率。

3) 感受态细胞中加入过多的连接产物

连接产物的体积不宜超过感受态细胞体积的1/10,否则会显著降低转化效率。

4) 回收产物不纯

不推荐多管样品过一个柱子的方式回收DNA,会造成更多的EDTA、胍盐等杂质残留,抑制反应;

胶回收产物请勿使用TE进行保存。

5) 出现连接抑制效应

用于连接的DNA浓度太高时,会降低连接效率。请严格参照说明书确定DNA的加入量。

6) 反应体系未混匀

推荐将所有溶液直接加入管底后用移液器吸打混匀。低速离心或手甩的方式不足以混匀反应体系。

Q2. 多数克隆不含正确插入片段?

- 1) 电泳液长时间不换,切胶仪器没有定期清洁定期更换电泳液,擦拭切胶仪可有效减少小片段污染。
- 2) 实验耗材污染,或者是实验室整体核酸污染
使用ddH₂O配制连接体系,实验耗材(如枪头、离心管)定期灭菌。必要时对实验室污染情况进行排查,利用核酸清洁液(推荐Trelief® Solution,目录号:TSP001)清洁整个实验环境。
- 3) 使用错误的紫外波长切胶
强烈建议在长波长(365 nm)紫外条件下切胶,切胶时间不宜超过5 min。短波长(254 nm)紫外易造成DNA不可修复的损伤。
- 4) PCR产物混有大量非特异扩增产物
建议优化PCR体系程序,提高扩增特异性;
PCR产物点胶鉴定并切胶回收;

增加鉴定的克隆数量。

5) 电泳时间过短可能导致非特异扩增片段未能被分离,可延长电泳时间。

Q3. 载体连接时间过长,对实验是否有影响?

理论上连接时间对连接效果没有影响。但是环境中(不洁净的枪头、离心管)引入的核酸酶会消化连接产物,故推荐即时连接转化。

Q4. 阳性克隆送测,目的片段两端碱基缺失或突变?

1) 使用了保真能力较差的酶

建议更换PCR酶重新扩增连接。

2) PCR反应没有充分终止延伸

建议延长终止延伸时间。

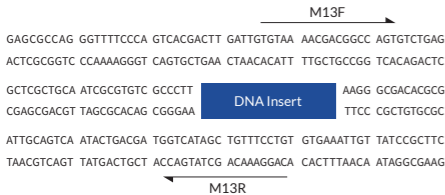
3) 使用错误的紫外波长切胶

强烈建议在长波长(365 nm)紫外条件下切胶,切胶时间不宜超过5 min。

4) 引物质量欠佳

引物化学合成存在一定碱基缺失或突变的几率,建议多挑克隆或者重新合成引物进行实验。

■ pClone007 Blunt Simple Vector 局部序列



06

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 载体图谱



■ 保存条件

-25~-15°C保存1年。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:

product@tsingke.com.cn.

07

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ pClone007 Blunt Simple Vector

TGTTAGCGGTGGTTTTTTTGTGGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
 AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCCCA
 CCCGTGAAGGTGAGCCAGTGAGCGCCAGGGTTTTCCAGTACGACT
 TGATTGTGTA AAACAGCGCCAGTGTCTGAGGCTCGCTGCAATCGCGT
 GTCG **CCCTT**AAGGGCGACACGCGATTGCGAGTCAATACTGACGATGGT
 ATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCCATAGCAGAAAGTCA
 AAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTGACTTGTATCGGCAGTAAGAGGTT
 CAACCTTACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAG
 TTATCGAGATTTTACAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGTATCAACATT
 TCCGTGTCGCACTTATCCGTTTTTTGCGGCATTTTGCCTCCGTTTTT
 GCTCACCCAGAAACGCTGTGTAAGTAAGATGCTGAAGATCAGTTG
 GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTAACAGCGGTAAGATC
 CTTGAGAGTTTTCCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA
 AAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGA
 GCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC
 TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAA
 TTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTAC
 TTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGACACA
 ACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGAAACCGGAGCTGA
 ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAA
 TGGAACAACGTTGCGCAAATTAATACTGGGCAACTACTTACTCTAGC
 TTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGG
 ACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAA
 TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGG
 CCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT
 CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC

08

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

TCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGGCCCAAATGTAATCACCTGGCTC
 ACCTTCGGGTGGGCTTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCG
 CCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGATGCTCAAGTCAGAGGTGGCG
 AAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTCCCTGGAAGCTC
 CCTCTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACC GGATACTGTCC
 GCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTA
 GGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGCA
 CGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCG
 TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
 CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
 GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGACAGTATTT
 GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTA
 GCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGC

09

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

