

pClone007 Versatile Simple Vector Kit

■ 目录号

TSV-007VS
TSV-007VSm

■ 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,结合本公司最新开发的载体制备工艺,能够兼容T-A克隆与平末端克隆。

■ 产品组成

组分	007VSm (10次)	007VS (60次)
5×pClone007 Versatile Simple Vector Mix	20 μL	40 μL×3
Control Template (50 ng/μL) *	10 μL	10 μL
pUC19 (10 pg/μL) **	10 μL	10 μL

* 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

本品适用于≤3000 bp目的片段的T-A克隆与平末端克隆。

■ 产品特点

- 5×Mix,只需补加片段与水。
- T-A克隆与平末端克隆均适用。
- 低背景,阳性率可达95%。
- 无多克隆位点,连接300 bp以下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:平粘末端均可;
- 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. 反应体系配制:推荐10 μL体系

组分	用量
目的片段	1 μL~8 μL
5×pClone007 Versatile Simple Vector Mix	2 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)
<1000	10~50
1000~2000	50~100
2000~3000	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1.5×10¹⁰ 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培养液,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

推荐使用2×T5 Super PCR Mix (Colony) (目录号:TSE005)进行菌落PCR鉴定。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作模板。推荐使用载体通用引物M13F/M13R或M13F-47/M13R-48进行鉴定。

A. 扩增体系

组分	用量(50 μL体系)
2×T5 Super PCR Mix (Colony)	25 μL
Primer-F (10 μM)	2 μL
Primer-R (10 μM)	2 μL
Template DNA	1 μL
ddH ₂ O	20 μL

B. 扩增程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	2 min	1
变性	98°C	10 s	30~35
退火	T _m +5°C	10 s	
延伸	72°C	10 s/kb	
终延伸	72°C	2 min	1
保存	4~12°C	∞	

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 AACGACGCGCCAGT)及M13R (CAGGAAACAGC-TATGACC)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1.5×10¹⁰ cfu/μg;
自制钙转感受态与本产品兼容性不佳,转化效率仅10⁷ 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:TSPO01)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

建议延长终止时间。

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 Versatile Simple Vector 局部序列

```

      M13F
      |
GTCACGACTT GATTGTGTA AACGACGGCC AGTTGATCTG AACTCAGGAT CACTCGTGT
CAGTGCCTGAA CTAACACATT TTGCTGCCGG TCAACTAGAC TTGAGTCTTA GTGAGCACAA

```

```

ACACTGCAAT CGCGTGTGCG CCTT AAGGGCGACA CGCGATTGCA GTCTTGAGTCCACCTG
TGTGACGTTA GCGCACAGCG GGAA DNA Insert TTCCCGCTGTG CGCTAACGTC AGAACTCAGGTGGAC

```

```

AAGGATGCA AACTTGGTCA TAGTGTTC CTGTGTGAAA TTGTATCCG CTTC
TTCTACAGT TTGAACCAAT ATCGACAAAG GACACACTTT AACAAAGG CAAGG

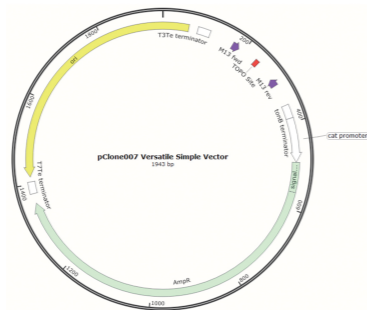
```

M13R

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

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 Versatile Simple Vector

```

TGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGGTCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTCTACCGAAGAAAGGCC
CACCCGTGAAGGTGAGCCAGTGCTGCAAGGCCGATTAAGTTGGAGCG
CCAGGGTTTTCCAGTCACGACTTGATTGTGTAACAAACGACGCCAGT
TGATCTGAACTCAGGATCACTCGTGTACTGCAATCGCGTGTCCG
CTTAAGGGCGACACGCGATTGAGTCTTGAGTCCACCTGAAGGATGT
CAAACCTGGTCATAGCTGTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCCAT
AGACACAACATACGAGCCGGAACAGAAAGTCAAAGCTCCGACCG
GAGGCTTTTGACTTGATCGGCACGTAAGAGTTCCAACCTTACCATA
ATGAAATAAGATCACTACCGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTC
AGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGACT
TATCCGTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAA
ACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGT
GGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
TTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGC
TATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGAAGGACAACTC
GGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCA
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACTGCGGCCAACCCTACTTC
TGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAA
CATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCTGTAGCA
ATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTAATACTGGCGAACTACTACTCTA
GCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC
AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGTGTGTTATTGCTG
ATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCA

```

08

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

```

CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC
GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGGCCAAATGTAAT
CACCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCTTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCAAAAATCGATGCTCAA
GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCGTTCGACCCCTGCCCG
TTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTCCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCTCGC
TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCCAGCCGACCGCT
GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
CGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG
CCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA
ACCACCGC

```

09

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。



网址: www.tsingke.com.cn
地址: 湖北省鄂州市葛店开发区东湖高新智慧城7栋

10

1.1.3.20211110