

pClone007 Blunt Vector Kit

■ 目录号

TSV-007B

■ 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 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300~5,000 bp目的片段的平末端克隆(≤300 bp建议使用TSV-007S避免多克隆位点区域形成的发卡结构导致测序中断)。

■ 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;
- 微量外源片段及长片段均适用。

■ 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 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(TGTAACGACGGCCAGT)及M13R(CAGGAACAGCTAT-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

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 Blunt Vector 局部序列

```

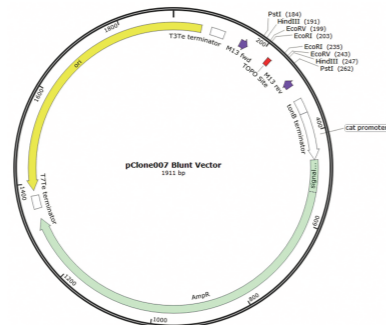
      M13F          PstI   HindIII   EcoRV   EcoRI
GTGTA AACG ACGGCCAGTG TCTGAGGCTC GTCGCAACC TGAAGCTTGA TATCGAATTC
CACATTTTGC TGCCGGTCCAC AGACTCCGAG CGACGCTGCG ACTTCGAACT ATAGCTTAAG
                                     EcoRI
GGGTGTCGCC CTT [DNA Insert] AAGGGG ACACGGCAT
CGCACACGGG GAA [DNA Insert] TTCCCGC TGTGCGCTTA
EcoRV   HindIII          PstI
TCGATATCAA GCTTCAGGTC TGCACTCAAT ACTGACGATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT
AGCTATAGTT CGAAGTCCAG ACGTCAGTTA TGACTGCTAC CAGTATCGAC AAAGGACACA
                                     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

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 Vector

```

TGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTCTACCGAAGAAAGGCCCA
CCCGTGAAGGTGAGCCAGTGAGCGCCAGGGTTTTCCAGTCAAGTCA
TGATTGTGTA AACGACGCGCCAGTGTCTGAGGCTCGTGCAGACCTGA
AGCTTGATATCGAATTCGCGTGTCC CCCTTAAGGGCGACACGCGAATT
CGATATCAAGTTCAGGCTGCAGTCAATACTGACGATGGTCATAGCTG
TTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTTCCATAGCAGAAAGTCAAAGCC
TCCGACCGGAGGCTTTTGACTGTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAATT
TCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCG
AGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGTATTCAACATTTCCGTG
TCGCACTTATCCGTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCAC
CCAGAAACGCTGTTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
ACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTAACAGCGGTAAGATCCTTGA
GAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCA
ACTCGGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA
CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
TGAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTC
TGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAC
ATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAAT
GAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGTGCCTGTAGCAAT
GGCAACAACGTTGCGCAAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAGTTG
ACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAA
ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGACGACTGG
GGCCAGATGTTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA

```

08

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

```

GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTG
CCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGGCCCAAATGTAATCACCTGG
CTCACCTTCGGGTGGGCTTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCT
CCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGATGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTTTCCCTGGA
AGTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCA
CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTGAGGTCGTTCCGTCGAAGCTGGG
TGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT
GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
GGTGTACAGAGTCTTGAAGTGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA
AGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAA
AAAGAGTTGGTAGCTCTGATCCGGCAAAACAACCCCGC

```

09

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

