

## pClone007 Blunt Simple Vector Kit Ver.2

### 目录号

TSV0101

### 产品简介

本产品利用Vaccinia topoisomerase I能在瞬间完成连接反应的特性,可快速完成拓扑连接反应。本产品包含pClone007载体、拓扑异构酶及优化的缓冲液,大幅简化加样流程,5 min即可完成连接反应,主要适用于平末端克隆。

### 产品组成

组分	规格(50次)
5×pClone007 Blunt Simple Mix	100 μL
V5 Colony Direct PCR Mix (T Vector) <sup>a</sup>	1 mL
Control Template (50 ng/μL) <sup>b</sup>	10 μL
pUC19 (10 pg/μL) <sup>c</sup>	10 μL

- a. 含M13F-47与M13R-48通用引物的1×PCR Mix;  
 b. 对照片段,用于验证试剂盒连接效率,大小为1000 bp;  
 c. pUC19标准质粒,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≤5000 bp的平末端克隆。

### 产品特点

- 低背景,阳性率可达95%;
- 5 min快速连接;
- 无需蓝白斑筛选;
- 平末端片段直接连接,无需加A;
- 预混Mix,大幅简化加样流程。

### 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(安全便捷型)(目录号:TSP602);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
PCR产物	1.0 μL~8.0 μL
5×pClone007 Blunt Simple Mix	2.0 μL
ddH <sub>2</sub> 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
2000~5000	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

注:推荐搭配使用擎科Trelief® 5α感受态(目录号:TSC-C01)进行转化实验。连接片段<3000 bp时,推荐采用快速转化流程,可大大加快实验进度;连接片段≥3000 bp时,推荐采用常规转化流程,可获得更高的转化效率。其他感受态转化操作可参考相关产品说明书。

下方流程以Trelief® 5α快速转化流程为例:

- 1) 取100 μL冰上融化的Trelief® 5α感受态细胞,加入10 μL连接产物,轻轻吹打混匀,冰上静置5 min;
- 2) 42°C水浴热激45 s~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min;
- 3) 向离心管中加入700 μL无抗无菌液体培养基(SOB或LB),无需复苏直接吸取合适体积混合液均匀涂布到含Amp抗性培养基上,37°C培养箱倒置培养过夜。

### 5. 阳性克隆检测

推荐PCR反应体系

组分	25 μL体系	50 μL体系
V5 Colony Direct PCR Mix (T Vector)	25 μL	50 μL

菌落:用枪头挑取单菌落置于反应液中,或将挑取的单菌落溶解于10~20 μL的无菌水中,吹打混匀后取1~3 μL的菌液作为模板。

### 推荐PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	2 min	1
变性	98°C	10 s	25
退火	60°C	10 s	
延伸	72°C	10 s/kb	1
终延伸	72°C	2 min	
保存	4~12°C	∞	

### 6. 测序

使用M13F(TGTAACGACGGCCAGT)及M13R(CAGGAACAGCTATG ACC)测序。

### 常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
克隆数少或者不长克隆	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;加入感受态时迅速旋转吹打混匀,以上两点操作可以有效提高克隆数
	感受态效率低	推荐使用高效转化感受态,如Trelief® 5α Chemically Competent Cell(目录号TSC-C01)
	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
	回收产物不纯	纯化过程中,胍盐等杂质的残留抑制反应,重新纯化DNA
	使用错误的紫外波长切胶	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
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	
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。低速离心或手摇的方式不足以混匀反应体系	

多数克隆不含正确插入片段	电泳液长时间不换, 切胶仪器没有定期清洁	定期清洁切胶仪与更换电泳液, 可有效减少小片段污染
	实验耗材污染或实验室整体核酸污染	使用ddH <sub>2</sub> O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
	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
载体连接时间过长, 涂板后无阳性菌斑	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	建议按照说明书的连接时长进行转化, 并且尽量去除环境中的核酸酶污染
阳性克隆送测, 目的片段两端碱基缺失或突变	使用了保真能力较差的酶	建议更换PCR酶重新扩增连接
	PCR反应没有充分终止	建议延长终止时间
	使用错误的紫外波长切胶	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
	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

M13F →

GTCACGACTT GATTGTGTA AAGCAGGCC AGTTGATCTG AACTCAGGAT CACTCGTCTT  
CAGTGCTGAA CTAACACAT TTGCTGCCGG TCAACTAGAC TTGATCTCTA GTGAGCACAA

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

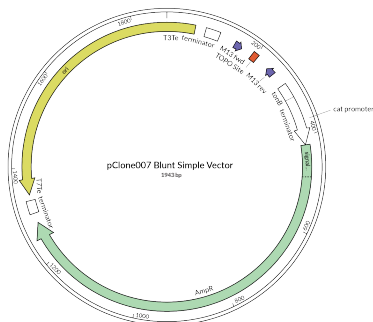
AAGGATGCA AACTTGGTCA TAGCTGTTT CTGTGTGAAA TTGGTTATCCG CTTC  
TTCTACAGT TTGAACAGT ATCGACAAG GACACACTT AACAATAGG CAAGG

← M13R

05

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°C~-15°C保存, 保质期1年。干冰运输。

## ■ 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.

06

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

## ■ pClone007 Blunt Simple Vector

TGGTAGCGGTGTTTTTTTGGTTTGC AAGCAGCAGATTACGCGCAGAA  
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCC  
CACCCGTGAAGGTGAGCCAGTGTGCAAGGCGATTAAGTTGGAGCG  
CCAGGGTTTTCCAGTCAGACTTGATTGTGTAACACGACGCCAGT  
TGATCTGAACACTCAGGATCACTCGTGTACACTGCAATCGCGTGTCC  
**CTTAAGGGCGACACGCGATTGCAGCTT**GAGTCCACCTGAAGGATGT  
CAAACCTGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGTTCCAT  
AGACACAACATACGAGCCGGAACAGAAAGTCAAAAGCCTCCGACCG  
GAGGCTTTTGACTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTACCATA  
ATGAAAATAGATCACTACCGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTC  
AGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGTATTAACACATTTCCGTTGCGACT  
TATTCGTTTTTGTGCGCATTTGCGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAA  
ACGCTGTGTAAGTAAAAGTGTGTAAGTCAAGTGGTGCACGAGT  
GGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGATCTTGAGAGTT  
TTCGCCCGAAGAAGTTTTCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGC  
TATGTGGCGCGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTC  
GGTCCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCA  
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG  
CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTC  
TGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAA  
CATGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGA  
ATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACACGATGCGCTGTAGCA  
ATGGCAACAACGTTGCGCAAATAAAGTGGCGAACTACTTACTCTA  
GCTTCCCGGCAACAATAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC  
AGGACCACCTTGTGCGCTCGGCCCTCCGCGTGGTGGTTATTGCTG  
ATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCTGCGGTTATCAITGACGCA  
CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGATATCTATCTACACGA

07

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

CGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG  
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGGCCAAATGTAATCA  
CCTGGCTCACCTCGGGTGGCCCTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTCCAT  
AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGATGCTCAAGTCAG  
AGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACAGGCGTTTCCCCCT  
GGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCGACCCCTGCCGTTACCGGA  
TACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCTGTGGCGTTTCTCATAGCT  
CACCGTGTAGGTATCTACCTGCGGTAGGCTGTCCGCTCAAGCTGGG  
CTGTGTGACAGCAAAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCCTTATCCGG  
TAACTATCGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG  
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG  
TGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCTAACTACGGTCACTAGAAGA  
ACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACTCGGAAAAGA  
GTTGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACCAACCCCG

## ■ 关联产品推荐

产品系列	产品名称	货号	规格
PCR系列	2×T8 High-Fidelity Master Mix	TSE111	5×1 mL
	金牌 Mix (Green)	TSE101	5×1.125 mL
	2×T5 Super PCR Mix (Colony)	TSE005	5×1 mL
	V5 Colony Direct PCR Mix (T Vector)	TSE0601	5×1 mL
克隆系列	pClone007 Simple Vector Kit Ver.2	TSV0102	50次
	pClone007 Blunt Vector Kit	TSV-007B	20次
	pClone007 Versatile Simple Vector Kit	TSV-007V5	60次
	pClone007 Vector Kit	TSV-007	20次
	Trelief® Seamless Cloning Kit	TSV-S3	20次
感受态细胞	Trelief® 5α Chemically Competent Cell	TSC-C01	10×100 μL
	TSurbo Chemically Competent Cell	TSC-C02	10×100 μL
	TSbl3 Chemically Competent Cell	TSC-C06	10×100 μL
	DH5α Chemically Competent Cell	TSC-C14	10×100 μL



08

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



11.2.2023.019