

pClone007 Versatile Simple Vector Kit pClone007 TOPO克隆通用试剂盒

目录号

DLV103

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	DLV103
5xpClone007 Versatile Simple Vector Mix	40 μL×3
Control Template (50 ng/μL) ^a	10 μL
pUC19 (10 pg/μL) ^b	10 μL

- a. 阳性对照片段,用于检测目的产物的质量,大小为1,000 bp;
b. 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≤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

- 1)引物要求:引物不能磷酸化;
- 2)产物末端:平粘末端均可;
- 3)产物鉴定:PCR产物需进行凝胶纯化回收,推荐使用达领DNA凝胶回收试剂盒(安全便捷型)(目录号:DLN801);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
5xpClone007 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

推荐使用达领Trelief®5α感受态细胞(目录号:DLCL101)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

推荐使用达领T5菌P专家(目录号:DLP102)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	
退火	T _m +5°C	10 s	30~35
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。

pClone007 Versatile Simple Vector 局部序列

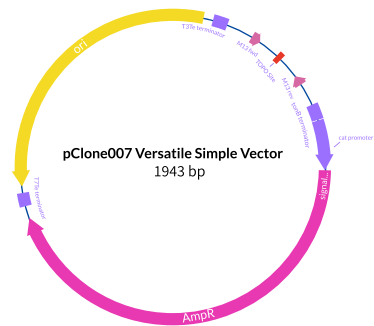
M13F →

GTCACGACTT GATTGTGTA AACGACGGCC AGTTGATCTG AACTCAGGAT CACTCGTTT
CAGTGTGAA CTAACACATT TTGCTGCCG TCAACTAGAC TTGATCTCA GTGAGCACAA

ACACTGCAAT CGCGTGTCCG CCTT AAGGGCGACA CGCGATTGCA GTCTTGATGCCACCTG
TGTGACGTTA CGCGACAGCG GGAA DNA Insert TTCCCGCTGTG CGCTAACGTC AGAACTCAGGTGGAC

AAGGATGCA AACTGTGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTTCC
TTCTCAGT TTGAACCAAT ATCGACAAAAG GACACACTTT AACAAATAG CAAGG

← M13R



pClone007 Versatile Simple Vector

TGGTAGCGGTGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCCGAGAA
 AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCC
 CACCCGTGAAGGTGAGCCAGTCTGCAAGCGGATTAAGTTGGAGCG
 CCAGGGTTTTCCAGTACGACTTGATTGTGTAACGACGCGCCAGT
 TGATCTGAAGTACAGGATCACTCGTTTACACTGCAATCGCGGTGCGCC
CTTAAGGGCGACACGCGATTGCACTCTTGTAGTCCACCTGAAGGATGT
 CAAACTTGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTTCCAT
 AGACACAACATACGAGCCGGAACAGAAAGTCAAAGCCCTCCGACCG
 GAGGCTTTTACTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTCCACATA
 ATGAAATAAGTACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTC

05

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

AGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCAC
 TATCCGTTTTTTTTCGGCATTGTCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAA
 ACGCTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGT
 GGGTTACATCGAATGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
 TTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGC
 TATGTGGCGCGTATTATCCGATTTAGCAGCCGGGCAAGAGCAACTC
 GGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCA
 GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
 CAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACTGCGGCCAACTTACTTC
 TGACAACGATCGGAGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAA
 CATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
 ATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGCATGCCTGTAGCA
 ATGGCAACACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTA
 GCTTCCCGCAACAATAATAGACTGGATGAGGCGGATAAAGTTGCG
 AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTTATGCTG
 ATAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGGGCTCTCGCGGTATCATTCAGCA
 CTGGGGCCAGATGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC
 GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
 ATAGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGCCCCAAATGTAAT
 CACCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCCTTCTGCGTTGCTGGCGTTTT
 CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGATGCTCAA
 GTCAGAGTGGGCAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTT
 TCCCCCTGGAAGCTCCCTCTGTCGCTCTCCTGTTCGACCCCTGCGC
 TTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
 TCTCATAGCTACGCTGTAGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTGCG
 TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCT
 GCGCCTTATCCGGTAACTATCGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACAC

06

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
 CGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
 TACGGCTACACTAGAAGAAGAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG
 CCAGTTACCTCGAAAAAGAGTGGTAGCTCTGTATCCGGCAAAACAA
 ACCACCGC

保存条件

-25~-15℃保存,保质期1年。≤0℃运输。

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	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
	感受态效率低	推荐使用高效转化感受态,如达领Trelief® 5a感受态细胞(目录号:DLC101)
	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,脂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	反应体系未混匀	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
	电泳液长时间不换,切胶仪器没有定期清洁	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
	多数克隆不含正确插入片段	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 ₂ O配制连接体系,实验耗材定期灭菌,利用核酸清洁液(推荐使用Trelief® Solution,目录号:TSPO01)清洁实验环境

07

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

常见问题	可能原因	解决方法
多数克隆不含正确插入片段	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
长时间连接后,涂板后无阳性菌斑	环境中引入的核酸酶消化连接产物	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
阳性克隆测序,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反应没有充分延伸	建议延长最终延伸时间
	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

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。

关联产品推荐

产品名称	货号	应用
FlashPure快速质粒小提试剂盒	DLN702	适用于1-5 mL菌液小量质粒DNA快速提取
T8高保真PCR预混液	DLP201	适用于基因组、cDNA、噬菌体、质粒等模板的扩增
T载体菌检试剂	DLP601	适用于TA克隆载体鉴定实验
Trelief®无缝克隆试剂盒	DLV201	适用于无缝克隆与定点突变等实验
Trelief® 5a感受态细胞	DLC101	适用于常规克隆、蓝白斑筛选等实验



08

地址:鄂州市葛店开发区建设大道216号东湖高新智慧城7栋



1.1.1.20240105