



pClone007 Simple Vector Kit Ver.2

pClone007 TOPO TA克隆试剂盒

■ 目录号

TSV0102

■ 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T-A克隆。

■ 产品组成

组分	规格 (50次)
5×pClone007 Simple Mix	100 µL
V5 Colony Direct PCR Mix (T Vector) ^a	1 mL
Control Template (50 ng/µL) ^b	10 µL
pUC19 (10 pg/µL) ^c	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T-A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;
- 预混Mix,大幅简化加样流程。

■ 使用方法

1. PCR产物准备

- 引物要求:引物不能磷酸化;
- 产物末端:粘性末端;
- 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 Simple Mix	2.0 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
2000~5000	100~200

3. 片段连接

上述连接体系置于PCR仪或金属浴中25℃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感受态细胞(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℃水浴热激45~60 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℃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
模板DNA ^a	见标注	见标注

a. 模板

菌液:吸取1~3 µL的菌液作为模板;

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℃	2 min	1
变性	98℃	10 s	25
退火	60℃	10 s	
延伸	72℃	10 s/kb	1
终延伸	72℃	2 min	
保存	4~12℃	∞	

6. 测序

使用M13F(TGTAAACGACGGCCAGT)及M13R(CAGGAAACAGCTAT-GACC)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	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	推荐使用高效转化的感受态,如Trelief®5α感受态细胞(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	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
	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。低速离心或手甩的方式不足以混匀反应体系

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

04

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

