



pClone007 Simple Vector Kit Ver.2 pClone007 黏末端TA克隆试剂盒

目录号

DLV102

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分钟即可完成连接反应,主要适用于黏末端TA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, 用于克隆菌P鉴定;

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目的片段的黏末端TA克隆。

01

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

产品特点

- 5分钟快速连接;
- 低背景, 阳性率可达95%;
- 无需蓝白斑筛选;
- 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: 粘性末端;
- 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. 配制反应体系: 推荐10 μL体系

组分	用量
PCR产物	1 μL~8 μL
5× pClone007 Simple 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
2000~5000	100~200

02

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

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: 推荐搭配使用达领Trelief® 5a感受态细胞(目录号: DLC101)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® 5a快速转化流程为例:

- 1) 取100 μL冰上融化的Trelief® 5a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45~60 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

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。

03

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

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(CAGGAAACAGCTATGACC)测序。

pClone007 Simple Vector 局部序列

TGAGCCGACG GGTTCCTCCA GTCACGACTT GATTGTGTAA AACGACGGCC AGTGTCTGAG
 ACTCGCGTCC CCAAAGGGT CAGTGTGAA CTAACACATT TTGTCGCGG TCACAGACTC

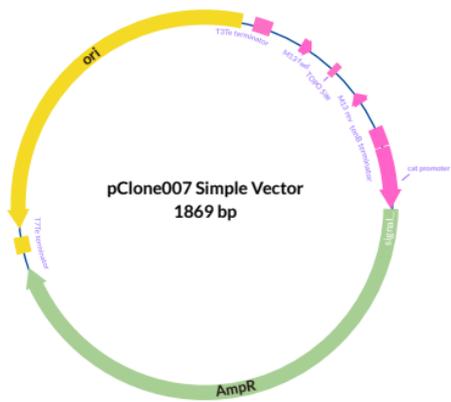
GCTCGTGA ATCGGTGTC GCCCTT DNA Insert AGG GCGACACGG
 CGAGCGCGT TAGCGCACAG CGGGA TTCC CGTGTGCGC

ATTCAGTCATACTGACGATGGTCATAGC TGTTTCTGT GTGAAATGT TATCCGCTTC
 TAACGTCAGT TATGACTGCT ACCAGTATCG ACAAGGACA CACTTAAACA ATAGCGGAAG
 M13R

04

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

载体图谱



pClone007 Simple Vector

TGGTAGCGGTGTTTTTTGTTTGAACGAGCAGATTACGCGCA
GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTTCAACCGAAGA
AAGGCCACCCGTGAAGGTGAGCCAGTGAGCGCCAGGTTTTCC
CAGTCACGACTTGATTGTGTAACGACGCGCCAGTGTCTGAGGC
TCGCTGCAATCGCGTGTG**CCCTTAAGGG**CGACACGCGATTGCA
GTCAATACTGACGATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTT
ATCCGCTTCCATAGCAGAAAGTCAAAGCTCCGACCGAGGGCT
TTTGACTTGATCGGCACGTAAGAGTTCCAACCTTCCACCAATG
AAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTT
CAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGTATCAACATTTCCGTGTC
GCATTTATCCGTTTTTGGCGATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTC
ACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTG

05

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

GGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA
GATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAG
CACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAC
GCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAA
TGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGA
TGCCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGA
GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC
CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA
CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA
AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACATAAAGTGGCGAAGCTTACTCTAGCTTCCCG
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAAGTTGACGAGC
CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCA
CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAG
ACGGGAGTCCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGTAGGTGCCTCACTGATTAAGCAATTTGGTAATGAGGCGCCAA
ATGTAATCACCTGGCTCACCTTCCGGTGGGCTTTCTGCGTTGCT
GGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAA
TCGATGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TCCGACCCCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTC
GGAAAGCTGGCGCTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAG
TTCGGTGTAGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCGTTCAGCCGACCGTGTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCT
TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG
CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGTCT
ACAGATTTCTTGAAGTGGTGGCTCACTACGCTACACTAGAAGA
ACAGATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAA
AAAGAGTTGGTAGCTCTGATCCGGCAAACAACCCCGC

06

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

保存条件

-25~-15°C保存，保质期1年。≤0°C运输。

常见问题分析

常见问题	可能原因	解决方案
克隆数少或者不长克隆	连接体系放冰上或冰箱加入感受态没有立即混匀	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® 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，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
	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	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Trelief® Solution，目录号：TSP001）清洁实验环境
	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
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反应没有充分终止延伸	建议延长终止延伸时间

07

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

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。

关联产品推荐

产品名称	货号	解决方案
FlashPure快速质粒小提试剂盒	DLN702	适用于1~5 mL菌液质粒DNA快速提取
T8高保真PCR预混液	DLP201	适用于基因组、cDNA、噬菌体、质粒等样品的扩增
T载体菌检试剂	DLP601	适用于TA克隆菌落鉴定实验
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

1.1.2.V102.2407