

Version: AK 3.2 (2021.04.01修订)

# Spark Zero Background pTOPO-TA Simple Cloning Kit

目录号: AK0402

## 01/产品组分

| 序号 | 组分                                      | AK0402-A | AK0402-B |
|----|---|----------|----------|
|    |   | 20 rxn   | 80 rxn   |
| 1  | Spark pTOPO-TA Simple Vector (30 ng/μL) | 20 μL    | 80 μL    |
| 2  | 1 kb Control (30 ng/μL)                 | 5 μL     | 5 μL     |
| 3  | 10×Enhancer                             | 20 μL    | 80 μL    |

## 02/保存条件

本试剂盒于-20℃保存。

## 03/产品概述

本制品和传统的 T4 连接酶原理不同，它利用 Topoisomerase 可以在瞬间（几秒钟-几分钟）高效（接近 100%）的连接 DNA 片段。无需 1 h 复苏，只需 37℃ 复苏 10 min 便可涂板。从连接到涂板只需 15-20 min。无自连、零背景，无需繁琐的蓝白斑筛选。可以连接长达 10 kb 的片段，是最简单、最快速、零背景免筛选的 TOPO TA 克隆载体。

本制品在克隆插入位点两侧不含多克隆酶切位点，需要在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点。此时如果使用 PCR 扩增引物导入的酶切位点进行 DNA 酶切时，酶切反应将不会受到 T 载体上其它多克隆酶切位点上的限制酶影响，可以大大提高酶切效率，增加克隆成功率。

测序可以采用 M13F/M13R 通用引物（见后面图谱）测序。

## 04/使用方案

1. 连接反应的准备：PCR引物不能磷酸化。连接片段要使用能在PCR产物末端加一个突出的3'-A的酶进行扩增（如Taq、Tth、AmpliTaq、KlenTaq DNA Polymerase），若PCR产物仅有目的条带，无非特异条带和引物二聚体，则无需纯化，可直接进行连接反应，否则建议胶回收纯化（货号：AE0101）。如果是质粒为模板的PCR产物最好进行纯化，因为模板质粒可能长出菌落。

2. 连接反应：

a. 室温配制连接体系（10  $\mu$ L）：

| Components                          | VoLume        |
|-------------------------------------|---------------|
| 纯化后的 PCR 产物或 1 $\mu$ L 1 kb Control | 0.5-5 $\mu$ L |
| Spark pTOPO-TA Simple Vector        | 1 $\mu$ L     |
| 10 $\times$ Enhancer                | 1 $\mu$ L     |
| 灭菌水                                 | X $\mu$ L     |
| Final Volume                        | 10 $\mu$ L    |

▲此步骤不能在冰上进行，只能在室温进行。

▲如果使用5  $\mu$ L体系连接，各成分按照比例减半使用，使用次数可以加倍。

▲不同大小插入片段的推荐用量：

| 插入片段大小 (bp) | 最佳用量 (ng) |
|-------------|-----------|
| 100-1000    | 10-40     |
| 1000-2000   | 40-80     |
| 2000-5000   | 80-180    |

b. 25-37 $^{\circ}$ C连接5 min（建议置于PCR仪上控温）。

▲本载体推荐5 min完成连接，长片段或连接困难的片段可延长连接时间至10-15 min，温度可选37 $^{\circ}$ C，可显著增加转化子数量。

3. 冰上冷却后，进行转化或贮存于-20 $^{\circ}$ C。

4. 转化：

a. 取50-100  $\mu$ L感受态细胞，置于冰上解冻，轻弹几次将细胞均匀悬浮。

b. 加入5  $\mu$ L连接液（最多可全部加入，体积不可超过感受态细胞体积的1/10），轻轻混匀，冰浴放置5 min。

▲本公司载体推荐使用商品化的感受态细胞，如果实验室自制感受态细胞效率较低或连接大片段时，可以按照标准转化程序进行。

c. 42 $^{\circ}$ C水浴热激 60 s，迅速放回冰浴静置 2-3 min，该过程不要摇动离心管。

d. 加500  $\mu$ L LB或SOC培养基(不含抗生素)，37 $^{\circ}$ C 180 rpm振荡培养10-30 min。

▲一般商品化的感受态细胞在插入片段不超过2 kb的情况下，复苏10 -15 min便可得到足够多的转化子，如果使用实验室自制的感受态或插入片段长或转化子少的情况下，可以提高复苏时间到30-60 min。

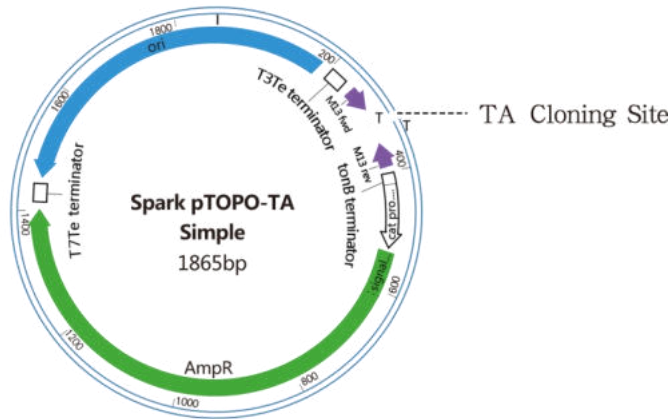
e. 将200  $\mu$ L培养后的菌液涂布在氨苄青霉素（100  $\mu$ g/mL）平板上，37 $^{\circ}$ C倒置培养12-16 h（如果预计转化子少，为得到较多克隆，

可4000 rpm 离心1 min，弃掉部分上清，保留100-150 μL菌液，悬浮后取全部菌液涂板）。

5. 转化子的筛选鉴定：

- ∪ 抽提菌液质粒，直接跑电泳观察质粒大小就可直接鉴定是否有插入的质粒。
- ∪ 挑取菌落直接进行PCR检测（可参见分子克隆第3版本）。
- ∪ 用通用M13F/M13R引物测序来确定是否含有目的克隆。本制品阳性率高，一般情况下，插入片段不超过2-3 kb，而且长出来的菌落正常，基本就包含插入基因。

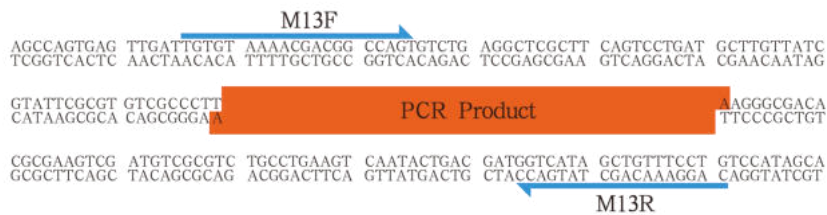
Spark pTOPO-TA Simple 载体图谱：



Spark pTOPO-TA Simple 载体通用测序引物序列：

M13F: TGTAACACGACGGCCAGT  
 M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

Spark pTOPO-TA Simple 载体插入位点序列：



## 05/相关产品

- AD0102 SPARKeasy 高纯度质粒小量快速提取试剂盒
- AE0101 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒
- AF0102 2×Spark Taq PCR Master Mix (with dye)
- AJ0101 Spark 2000 DNA Marker
- AK1001 Spark Universal T-Vector PCR Identification Kit

本产品仅用于科学研究！

TeL: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

