

Version: AK 3.2 (2021.04.01修订)

Spark Zero Background pTOPO-Blunt Cloning Kit

目录号: AK0501

01/产品组分

序号	组分	AK0501-A	AK0501-B
		20 rxn	80 rxn
1	Spark pTOPO-Blunt Vector (30 ng/μL)	20 μL	80 μL
2	1 kb Control (40 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 Blunt 平末端克隆载体。

测序可以采用 M13F/M13R 通用引物测序（见后面图谱）。

04/使用方案

1. 连接反应的准备：PCR引物不能磷酸化。连接片段要使用扩增产物是平末端的高保真聚合酶进行扩增（如Pfu、Vent、Phusion 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 μL):

Components	Volume
纯化后的 PCR 产物或 1 μL 1 kb Control	0.5-5 μL
Spark pTOPO-Blunt Vector	1 μL
10 $\times$ Enhancer	1 μL
灭菌水	X μL
Final Volume	10 μL

▲此步骤不能在冰上进行，只能在室温进行。

▲如果使用5 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ ，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 $^{\circ}\text{C}$ 。

4. 转化:

a. 取50-100 μL 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 μL 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长片段时，可以按照标准转化程序进行。

c. 42 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL LB或SOC培养基 (不含抗生素)，37 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 培养后的菌液涂布在氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)平板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 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:

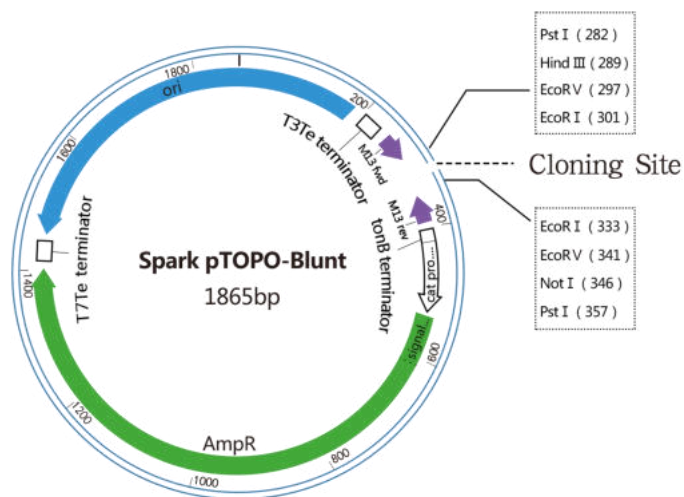
u 抽提菌液质粒，直接跑电泳观察质粒大小就可直接鉴定是否有插入的质粒，还可用EcoR I/EcoR V单酶切释放插入片段或用其它合适的酶切，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，确定是否含有目的片段。

u 挑取菌落直接进行PCR检测 (可参见分子克隆第3版本)。

u 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，连接片段不超过2-3 kb，而且长出来的菌落

正常，基本就包含插入基因。

Spark pTOPO-Blunt 载体图谱：

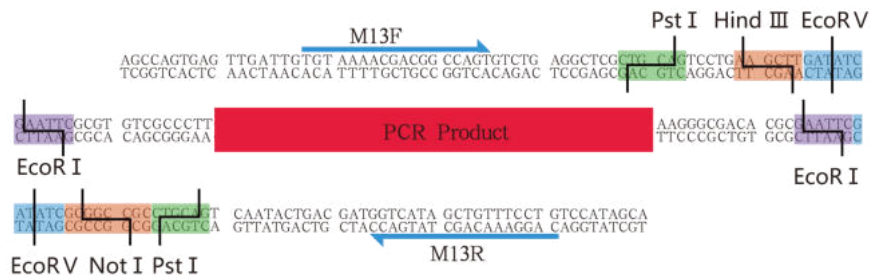


Spark pTOPO-Blunt 载体通用测序引物序列：

M13F: TGTAACACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

Spark pTOPO-Blunt 载体多克隆位点序列：



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

