

Version: AK 3.2 (2021.04.01修订)

Spark Zero Background pTOPO-Blunt Simple Cloning Kit

目录号: AK0502

01/产品组分

序号	组分	AK0502-A	AK0502-B
		20 rxn	80 rxn
1	Spark pTOPO-Blunt Simple 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。

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/操作步骤

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 μ L）：

Components	Volume
纯化后的PCR产物或1 μ L 1 kb Control	0.5-5 μ L
Spark pTOPO-Blunt Simple Vector	1 μ L
10 $\times$ Enhancer	1 μ L
灭菌水	X μ L
总体积	10 μ L

▲此步骤不能在冰上进行，只能在室温进行。

▲如果使用5 μ 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℃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℃，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℃。

4. 转化：

a. 取50-100 μ 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 μ 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长片段时，可以按照标准程序进行。

c. 42℃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 μ L LB或SOC培养基（不含抗生素），37℃ 180 rpm振荡培养10-30 min。

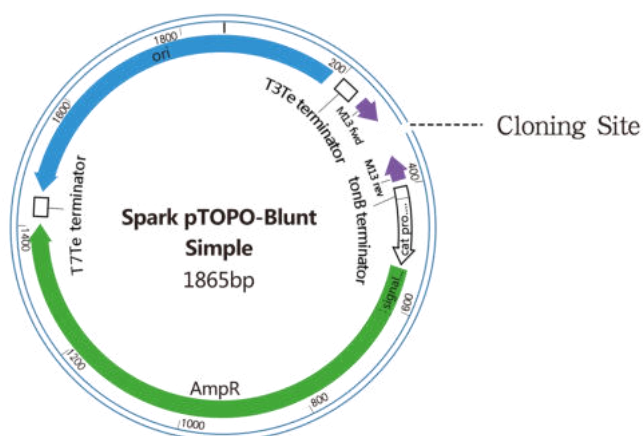
▲一般商品化的感受态细胞在插入片段不超过2 kb的情况下，复苏10-15 min便可得到足够多的转化子，如果使用实验室自制的感受态或插入片段长或转化子少的情况下，可以提高复苏时间到30-60 min。

e. 将200 μ L培养后的菌液涂布在氨苄青霉素（100 μ g/mL）平板上，37℃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 μ L菌液，悬浮后取全部菌液涂板）。

5. 转化子的筛选鉴定：

- u 用上述菌液抽提质粒，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。
- 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 Simple载体图谱:

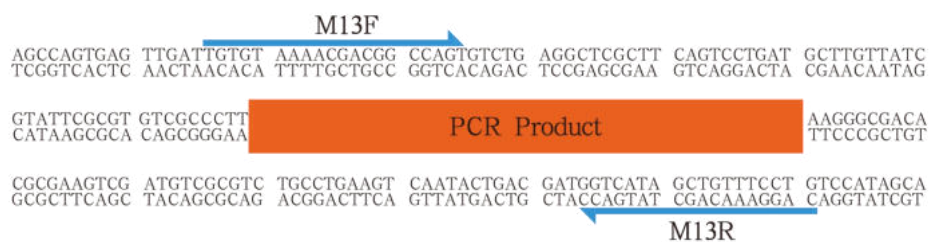


Spark pTOPO-Blunt Simple载体通用测序引物序列:

M13F: TGTAAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

Spark pTOPO-Blunt 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

