

Version: AK 1.0 (2023.10.17修订)

# Spark Zero Background pTOPO-TA/Blunt Cloning Kit

目录号: AK0503

## 01/产品组分

| 序号 | 组分                                     | AK0503-A | AK0503-B |
|----|----------------------------------------|----------|----------|
|    |                                        | 20 rxn   | 80 rxn   |
| 1  | Spark pTOPO-TA/Blunt Vector (30 ng/μL) | 40 μL    | 160 μL   |
| 2  | 1 kb Control (30 ng/μL)                | 5 μL     | 5 μL     |
| 3  | 10×Enhancer                            | 20 μL    | 80 μL    |
| 4  | M13 Forward Primer (10 μM)             | 100 μL   | 400 μL   |
| 5  | M13 Reverse Primer (10 μM)             | 100 μL   | 400 μL   |

## 02/保存条件

本试剂盒于-20℃保存。

## 03/产品概述

本产品为零背景 pTOPO-TA/Blunt 通用克隆试剂盒，和传统的 T4 连接酶原理不同，该产品利用拓扑异构酶（Topoisomerase）进行 DNA 片段的快速高效连接；使用独特的载体制备工艺，可以兼容 A 末端和平末端克隆，且载体上带有自杀基因，载体通过自杀基因是否表达筛选阳性重组子，无需繁琐的蓝白斑筛选，实现零背景，并提高了克隆阳性率，是简单、快速、通用型 TOPO 克隆试剂盒。

试剂盒中带有阳性对照片段，M13F/M13R 测序引物。

## 04/操作步骤

### 1. PCR产物的制备：

- (1) 引物要求：引物5'端不能磷酸化。
- (2) 产物要求：扩增产物可为平末端或带 A 尾的 PCR 产物，建议电泳检测产物的亮度及质量，然后进行胶回收纯化。

### 2. 连接反应：

- (1) 室温下（25°C-37°C）配制10 μL连接体系（建议用0.2 mL PCR管）：

| Components                     | Volume   |
|--------------------------------|----------|
| 纯化后的 PCR 产物或 1 μL 1 kb Control | 0.5-5 μL |
| Spark pTOPO-TA/Blunt Vector    | 2 μL     |
| 10×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（注意插入片段不要过量，过量会导致转化子的数量减少）：

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

- (2) 轻弹混匀，瞬时离心收集至管底，25-37°C连接5 min（建议置于PCR仪上控温），反应结束后，连接产物置于冰上备用。

▲ 推荐室温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°C，可显著增加转化子数量。

### 3. 转化：

#### (1) 常规转化

将 5 μL 连接产物（最多可全部加入，只要体积不超过感受态细胞的 1/10）加入到 50 μL 常规化学感受态细胞中，转化条件参考所使用感受态说明书。

#### (2) 快速转化

- a. 取 5 μL 连接产物（最多可全部加入，只要体积不超过感受态细胞的 1/10）加入至 50 μL 感受态细胞中，轻弹管壁混匀，冰上放置 5 min；
- b. 42°C水浴热激 60 sec，冰上孵育 2-3 min，该过程不要摇动离心管；
- c. 加入 300-500 μL LB 培养基或者 SOC 培养基（不含抗生素），37°C，200 rpm 振荡培养 10 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，如果使用的感受态效率低、或着转化子少、插入片段长的情况下可以提高复苏时间到 30-60 min 以得到更多的转化子。

- d. 取 100-200 μL 菌液涂布在氨苄青霉素（100 μg/mL）平板上，37°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  $\mu$ L 菌液，悬浮后取全部菌液涂板）。

#### 4. 阳性克隆鉴定：

- 菌落/菌液 PCR 鉴定：挑取单克隆，推荐使用 2 $\times$ Spark Taq PCR Master Mix (with dye) (货号：AF0102) 进行扩增鉴定；
- 酶切鉴定：选择合适的限制性内切酶进行鉴定；
- 质粒大小鉴定：提取质粒，琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒大小；
- 测序：测序引物可选择本产品提供的M13F/M13R引物或者自备引物。

▲ “M13通用引物”有多种不同的序列，不同公司默认的M13引物可能与本载体所用的M13序列有差异，合成使用前请务必先核对序列。

## 05/相关产品

AD0102 SPARKeasy 高纯质粒小量快速提取试剂盒

AE0101 胶回收/PCR 产物纯化试剂盒

AF0102 2 $\times$ Spark Taq PCR Master Mix (with dye)

AF0802 2 $\times$ SparkHiFi Max Master Mix (with dye)

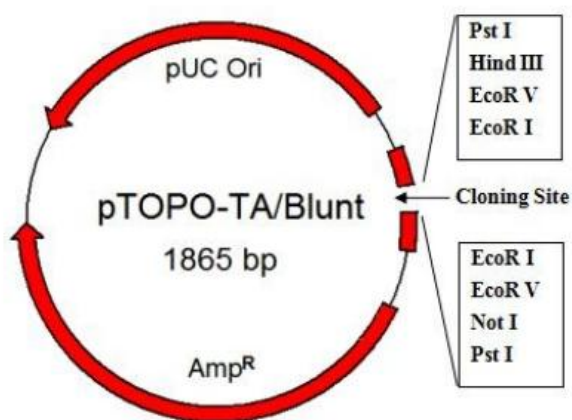
AK0603 Spark HiFi Seamless Cloning Kit (单片段)

AJ0101 Spark 2000 DNA Marker

AJ0208 Spark GoldView

AJ0206 Spark 50 $\times$ TAE Buffer

#### 附：Spark pTOPO-TA/Blunt 载体信息：

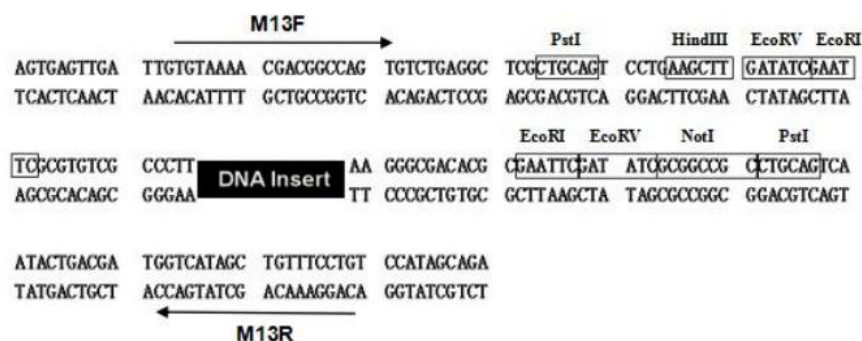


Spark pTOPO-TA/Blunt 载体通用测序引物序列：

M13F: TGTAACACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

Spark pTOPO-TA/Blunt 载体多克隆位点序列:



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)

