

Version: AK 3.2 (2021.04.01修订)

# Spark pBLUE-T Vector

目录号: AK0102

## 01/产品组分

序号	组分	AK0102-A 20 rxn	AK0102-B 60 rxn
1	Spark pBLUE-T Vector(30 ng/μL)	20 μL	60 μL
2	1 kb Control (30 ng/μL)	5 μL	5 μL
3	10×PEG Enhancer	50 μL	150 μL

## 02/保存条件

本试剂盒于-20°C保存。

## 03/产品概述

许多高温 DNA 聚合酶，如 Taq DNA 聚合酶、Tth DNA 聚合酶等扩增的 PCR 产物在 3'-末端后都带有一个突出的碱基 A，这样的 PCR 产物可以用 3'-末端后带有一个突出碱基 T 的载体进行克隆。Spark pBLUE-T 载体来源于 pBlueScript II SK(+)质粒，在 *EcoR* I 酶切位点处添加了适当序列，经 *XCM* I 酶切后其 3'-末端直接产生未配对的 T 碱基，因此有更高的重组效率。Spark pBLUE-T 载体插入位点两端独特设计的两个 *EcoR* I 位点使插入片段可以用廉价高效的 *EcoR* I 单酶切检测；同时 Spark pBLUE-T 载体不含 *Nde* I 或 *Nco* I 限制性内切酶位点，可方便用于克隆含上述酶切位点的基因。此外，载体连接体系还有背景低（蓝斑小于 10%）、重组率高（白斑中超过 90%有插入片段）、可快速连接等特点。本说明书未列出 Spark pBLUE-T 载体相关的技术资料，其全序列可参照 pBlueScript II SK(+)序列，只是其多克隆酶切位点处序列稍有不同。

测序可以采用 T3、T7 启动子引物和 M13 通用测序引物（见后面图谱）。

## 04/使用方案

1. 连接反应的准备:

▫ PCR产物是否要进行纯化取决于扩增产物的质量。如果PCR产物非常干净，不经纯化就可直接进行连接反应。但如果是以质粒为模板的PCR产物则必须进行纯化。PCR产物可以通过琼脂糖凝胶电泳分离。

▫ Taq、Tth、AmpliTaq、KlenTaq DNA聚合酶扩增的PCR产物，其末端都带有一个突出的3'-A。具有3'-A末端的PCR产物可以直接用Spark pBLUE-T载体进行克隆连接。具有3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶（高保真酶）扩增的PCR产物是平末端，要对这种平末端PCR产物进行克隆，应先进行3'-端加A工作。

## 2. 连接反应:

### ▫ 常规连接反应

a. 连接反应体系配制如下:

Components	Volume
10×Ligation Buffer (用前充分融解混匀)	1 μL
10×PEG Enhancer	1 μL
Spark pBLUE-T Vector	1 μL
纯化后的PCR产物或1 μL 1 kb Control	X μL
无菌水	Y μL
Spark T4 DNA Ligase	0.5-1 μL(5 Weiss Units/μL)
Final Volume	10 μL

▲通常情况下，不需对PCR产物进行精确定量，一般PCR产物与载体的摩尔比优化至2:1~10:1即可得到良好结果，推荐3:1。

b. 16℃连接过夜（一般可在PCR仪器完成）。

▲推荐16℃连接过夜。10 μL体系标准连接酶量为2.5 Weiss Units即可，可以得到最多的转化子。本系统含PEG Enhancer，可以大大提高连接效率。在高连接酶量的情况下，10 μL体系推荐连接酶量为5 Weiss Units。

### ▫ 快速连接反应

a. 连接反应体系配制如下:

Components	Volume
2×Quick Ligation Buffer (用前充分融解混匀)	5 μL
Spark pBLUE-T Vector	1 μL
纯化后的PCR产物或者1 μL 1 kb Control	X μL
无菌水	Y μL
Spark T4 DNA Ligase	1 μL (5 Weiss Units/μL)
Final Volume	10 μL

b. 22℃连接5-10 min（一般可在PCR仪器完成）。

▲2×Quick Ligation Buffer已包含所有优化的快速连接成分，推荐22℃连接10 min（长片段连接可延长至30 min）。此外，本系统也可在16℃连接30 min即可达到一般研究的要求。

3. 冰上冷却后，进行转化或贮存于-20℃。

4. 转化:

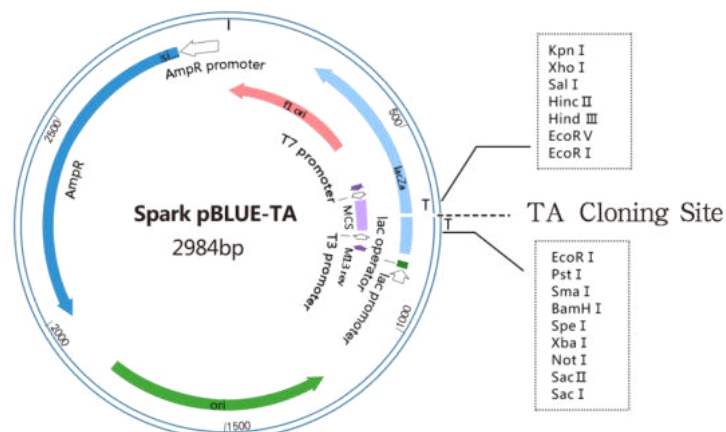
- a. 取50-100  $\mu\text{L}$ 感受态细胞，置于冰上解冻，轻弹几次将细胞均匀悬浮。
- b. 加入4-5  $\mu\text{L}$ 连接液（最多可全部加入，体积不可超过感受态细胞体积的1/10），轻轻混匀。冰上放置30 min。42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激45 s。冰上放置2-3 min。
- c. 加500  $\mu\text{L}$  LB或SOC培养基(不含抗生素)，37 $^{\circ}\text{C}$  180 rpm振荡培养1 h。
- d. 将200  $\mu\text{L}$ 培养后的菌液涂布在预先用16  $\mu\text{L}$  50 mg/mL IPTG和40  $\mu\text{L}$  20 mg/mL X-gal涂布的氨苄青霉素平板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养12-16 h。

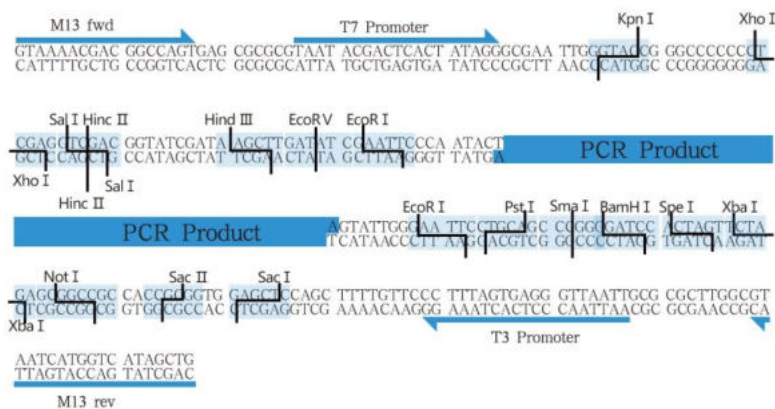
▲ 涂布细菌的用量依连接的效率及感受态细胞的感受率而进行适当调整，如果预计的克隆较少，可通过离心（4,000 rpm，1 min）后吸除部分培养液，留下适量的培养基悬浮菌体后取全部或适量涂布于一个平板中（涂布剩余的菌液可以放置在4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，第2 d如果转化菌落数量少，可将剩余菌液全部涂在一个新培养板上进行培养）。

## 5. 筛选：

- a. 转化子的蓝白斑筛选：当外源DNA片段插入到Spark pBLUE-T中后，由于外源DNA的核酸序列的存在改变了LacZ基因的编码，从而影响了其产物 $\beta$ -半乳糖苷酶 $\alpha$ -片段的活性，因此重组克隆在X-gal/IPTG平板上呈现为白色，而非重组克隆呈蓝色。有时插入片段没有影响LacZ基因读码框，或插入片段太小，这种情况下菌落（重组克隆）呈现淡蓝色或在菌落中心呈现淡蓝斑点，外圈呈白色（鱼眼状蓝斑fish eye）。选择在IPTG/X-gal平板上生长的白色菌落或淡蓝色菌落，用牙签挑至含氨苄青霉素的液体培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养12-16 h。
- b. 转化子的鉴定：
  - v 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒，用EcoR I单酶切或用其它合适的酶进行酶切，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，验证是否含有目的片段。
  - v 挑取白色菌落直接进行PCR检测（可参见分子克隆第3版本）。
  - v 用T3和T7启动子引物或其它合适的引物测序来确定是否含有目的克隆。

Spark pBLUE-T载体图谱、启动子和多克隆位点序列：





如何计算连接反应中需要的 PCR 产物的量？

一般 PCR 产物与载体的摩尔比优化至 2:1-10:1（推荐 3:1）就可以得到良好结果，可采用以下公式计算：

[加入载体的量（ng）×插入片段大小（kb）÷载体大小（kb）]×插入片段和载体的摩尔比=插入片段的量（ng）。例如：插入片段和载体连接的摩尔比例为 3:1，如连接反应中加入

载体 40 ng，插入片段大小为 1000 bp，这时应加入插入片段的量为[40 ng 载体×1 kb 插入片段÷2.984 kb 载体]×3/1=40.2 ng。

## 05/相关产品

AJ0101 Spark 2000 DNA Marker

AJ0205 Agarose

AJ0208 Spark GoldView

AK1001 Spark Universal T-Vector PCR Identification Kit

AK0801 Spark T4 DNA Ligase

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)

