

特点:

Tiosbio® Simple TA Vector 预先偶联 TOPO 酶，加入 PCR 扩增产物后可迅速完成连接反应，连接阳性率高。产品适于连接带“A”尾的 PCR 产物，载体含有氨苄青霉素抗性筛选标记。如与高保真酶扩增得到的平末端 PCR 产物连接应选择 Tiosbio® Blunt Zero Vector (Cat.No. TD0201)。

该载体连接反应时间可短至 5min；操作简单，仅需加入载体和插入片段；无需蓝白斑筛选，阳性率高；不包含任何酶切位点，便于后续亚克隆。

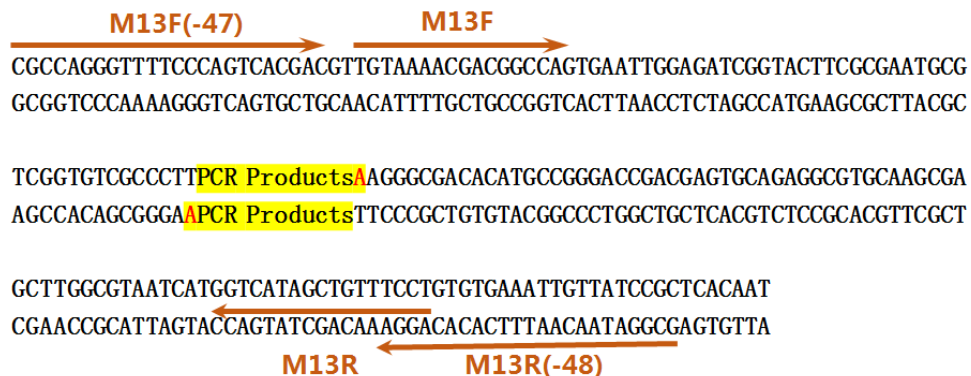
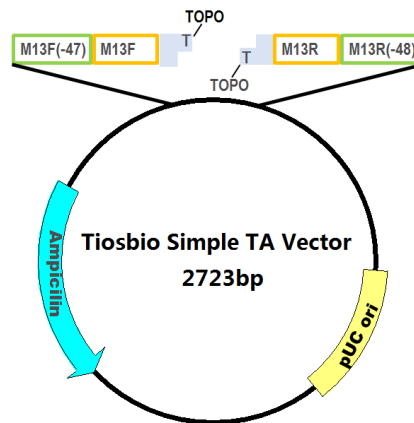
试剂盒组成:

组分	TD0101 (20T)
Tiosbio® Simple TA Vector (20ng/μL)	10μL
M13F(-47) (10μM)	100μL
M13R(-48) (10μM)	100μL
无菌水	1mL

测序引物:

正向测序引物 M13F(-47): 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'；

反向测序引物 M13R(-48): 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'。

载体图谱:

操作步骤:
1. PCR 产物的纯化

- PCR 产物扩增条带单一明亮，可使用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后进行连接。
- 含有非特异性扩增或引物二聚体的 PCR 产物，须经过胶回收方式纯化后，方可进行连接。
- 如 PCR 扩增模板来源于 Amp 抗性质粒，PCR 扩增产物须经胶回收后，方可进行连接。

2. PCR产物用量和连接反应所需时间

	PCR产物长度 (kb)		
	0.1~1	1~3	>3
PCR产物用量 (ng)	5~20	20~60	按每kb添加20ng递增
载体用量 (μL)	0.5	0.5	0.5
连接时间 (min)	5~10	15~20	30
阳性率 (%)	>95%	>90%	>85%

3. 连接反应

向200 μL EP管中依次加入下列试剂，轻轻吹打混匀后，室温（25 $^{\circ}\text{C}$ ）孵育5~30min。

成分	添加量 (μL)
PCR 产物	0.5~4.5（用量参考上表）
Tiosbio® Simple TA Vector	0.5
无菌水	至终体积5

4. 转化

- 取一支感受态细胞在冰上解冻后立即加入5 μL 已连接好的产物，轻弹混匀，冰浴20~30min。
- 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激90sec，立即冰浴3~5min。
- 向离心管中加入600 μL 平衡至室温的LB培养基，混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ ，250rpm复苏1h。
- 为了得到较多克隆，6000rpm离心1min，弃部分上清，用枪头轻轻地菌体浮起，取100 μL 左右的菌液均匀地涂布于含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素抗生素的LB琼脂平板表面。
- 倒扣平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养12~16h，直至形成可见的单菌落。

5. PCR菌检挑选阳性克隆菌落（连接产物条带单一、清晰情况下，阳性率>95%，可无需菌检，直接测序，本步骤可省略）

- 用10 μL Tip头挑取生长良好的单个菌斑，放置于10 μL 无菌水中吹打几次混合均匀。
- 取1 μL 上述菌液于20 μL PCR体系中，用PCR特异性引物或者M13F(-47)和M13R(-48)鉴定阳性克隆。
- 以上述菌液为模板进行PCR扩增，并电泳检测（如载体自连接，则菌检PCR扩增长度为186bp）。

6. 质粒提取及测序

将鉴定为阳性的菌液接种于5mL LB培养基中（含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素），37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡（225rpm）培养过夜，提取质粒。并使用M13F(-47)或M13R(-48)进行测序。

7. 常见问题及分析

- 问题1：平板克隆数少或不长斑
原因：通常是由于感受态效价较低造成，更换感受态可解决该问题。另外平板含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素抗生素，检查抗生素是否用错。
- 问题2：阳性率低
原因：连接PCR产物有引物二聚体，连接产物条带不明亮（浓度不够），连接产物的“A”尾丢失，非Taq酶扩增产物（不带A尾）。
- 问题3：鉴定插入片段大小与预期不符
原因：回收过程中PCR产物发生断裂，形成小片段产物，尤其是大片段回收、连接时尤为严重。菌检产物大小为200bp+目标产物长度，如插入片段为500bp，则菌检阳性克隆应为700bp。