特点:

Tiosbio® Blunt Zero Vector预先偶联TOPO酶，加入PCR扩增产物后可迅速完成连接反应。载体借助自杀基因的表达与否筛选阳性克隆，连接阳性率高，自连背景接近于零。适用于高保真DNA聚合酶扩增后的平端PCR产物连接，载体带有氨苄青霉素和卡那霉素抗性筛选标记，及*Pst* I 和*Not* I 酶切位点。如与带“A”尾的PCR产物连接应选择Tiosbio® Simple TA Vector（Cat.No. TD0101）。

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；载体带有可用于体外转录的T3 Promoter和T7 Promoter。

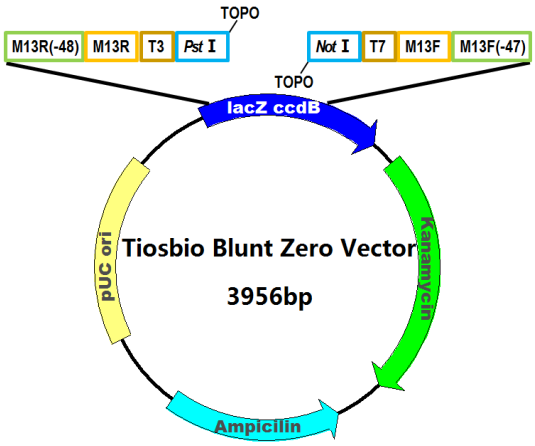
试剂盒组成:

组分	TD0101（20T）
Tiosbio® Blunt Zero Vector（20 ng/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´- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3´；
反向测序引物M13R(-48)：5´- AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3´。

载体图谱:



M13R(-48) M13R T3 Promoter

TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCAGGAATTAACCCTCACTAAAGGGAC
ACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTTTGTCGATACTGGTACTAATGCGGTTCGAGTCCTTAATTGGGAGTGATTTCCCTG

Pst I *Not* I

TAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTGGCCCTTBlunt PCR ProductsAAGGGCCAATTCGCGGCCGCTAAATTCAATTCGC
ATCAGGACGTCCAAATTTGCTTAACCGGGAABlunt PCR ProductsTTCCCGGTTAAGCGCCGGCGATTTAAGTTAAGCG

T7 Promoter M13F M13F (-47)

CCTATAGTGAATCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAA
GGATATCACTTAGCATAATGTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTT

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。

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200μL EP管中依次加入下列试剂，轻轻吹打混匀后，室温（25°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® Blunt Zero 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5μL已连接好的产物，轻弹混匀，冰浴20~30min。

●42℃水浴热激90sec，立即冰浴3~5min。

●向离心管中加入600μL平衡至室温的LB培养基，混匀后37℃，250rpm复苏1h。

●为了得到较多克隆，6000rpm离心1min，弃部分上清，用枪头轻轻地将菌体浮起，取100μL左右的菌液均匀地涂布于含100μg/mL氨苄青霉素抗生素（或50μg/mL卡那霉素抗生素；推荐使用氨苄青霉素抗生素，筛选效果更佳）的LB琼脂平板表面。

●倒扣平板，37℃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10μL Tip头挑取生长良好的单个菌斑，放置于10μL无菌水中吹打几次混合均匀。

●取1μL上述菌液于20μL 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100μg/mL氨苄青霉素或50μg/mL卡那霉素，推荐使用氨苄青霉素抗生素，效果更佳），37°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，更换感受态可改善或解决该问题。含有卡那霉素的平板通常长斑数少于含有氨苄青霉素抗生素的平板，平板制作时加入100μg/mL氨苄青霉素抗生素，筛选效果更佳。

●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*Taq* PCR产物时通常阳性率低于80％

●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。