

权 利 要 求 书

1、一种基于酶切的 TA 克隆载体，其特征在于，所述基于酶切的 TA 克隆载体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，命名为 pTA03 载体。

~~2、一种如权利要求 1 所述的基于酶切的 TA 克隆载体的构建方法，其特征在于，其构建方法~~包括以下步骤：取 3-5 μ g pTA03 载体，37 $^{\circ}$ C 条件下用限制性内切酶 AhdI 酶切消化 3-18 小时，酶切结束后补加少量 EcoRV-HF 内切酶消化 30 分钟，65 $^{\circ}$ C 保持 20 分钟，酶切产物采用酶切试剂盒直接过柱回收，或者用 DNA 凝胶回收试剂盒回收；回收产物-20 $^{\circ}$ C 保存，该产物即为制备好的 TA 克隆载体。

32、一种如权利要求 1 所述的基于酶切的 TA 克隆载体的使用方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1、制备基于酶切的 TA 克隆载体：取 3-5 μ g pTA03 载体，37 $^{\circ}$ C 条件下用限制性内切酶 AhdI 酶切消化 3-18 小时，酶切结束后补加少量 EcoRV-HF 内切酶消化 30 分钟，65 $^{\circ}$ C 保持 20 分钟，酶切产物采用酶切试剂盒直接过柱回收，或者用 DNA 凝胶回收试剂盒回收；回收产物-20 $^{\circ}$ C 保存，该产物即为制备好的 TA 克隆载体；

步骤 2、将步骤 1 制备好的基于酶切的 TA 克隆载体与目的 PCR 片段混合配制连接反应体系，混匀后短暂离心 3-5 秒，将混合液于 22 度反应 5 分钟，反应结束后置冰上，进行后续的转化反应。

43、根据权利要求 32 所述的基于酶切的 TA 克隆载体的使用方法，其特征在于，步骤 1 中的酶切反应体系具体为：10xCutSmart Buffer (NEB) 10 μ L，10U/ μ L 的限制性内切酶 AhdI 2 μ L，1 μ g/ μ L 的基于酶切的 TA 克隆载体 5 μ L，余量为 H₂O，以上体积总量为 100 μ L。

54、根据权利要求 32 所述的基于酶切的 TA 克隆载体的使用方法，其特征在于，步骤 2 中的连接反应体系具体为：10xT4 DNA ligase Buffer(NEB) 1 μ L，400U/ μ L 的 T4 DNA ligase 0.5 μ L，50ng/ μ L 的 TA 克隆载体 1 μ L，目的 PCR 片段与 TA 克隆载体的摩尔比为 3~7: 1，余量为 ddH₂O，以上体积总量为 100 μ L。

65、根据权利要求 54 所述的基于酶切的 TA 克隆载体的使用方法，其特征在于，连接体系中的基于酶切的 TA 克隆载体的添加量为 0.03pmol，当目的 PCR 片段的长度在 2000bp 以下时，目的 PCR 片段：TA 克隆载体的摩尔比为 7: 1，22℃连接 5 分钟；当目的 PCR 片段的长度在 2000bp 以上时，目的 PCR 片段：TA 克隆载体的摩尔比为 3: 1，22℃连接 30 分钟。

76、根据权利要求 54 所述的基于酶切的 TA 克隆载体的使用方法，其特征在于，目的 PCR 片段的用量(μl)= $[660 \times A \times 0.03 \times B(\text{ng})] \div [1000 \times \text{目的 PCR 片段浓度}(\text{ng}/\mu\text{l})]$ ，其中 A 是目的 PCR 片段的碱基对数 (bp)，B 是 PCR 片段：TA 克隆载体的摩尔比。