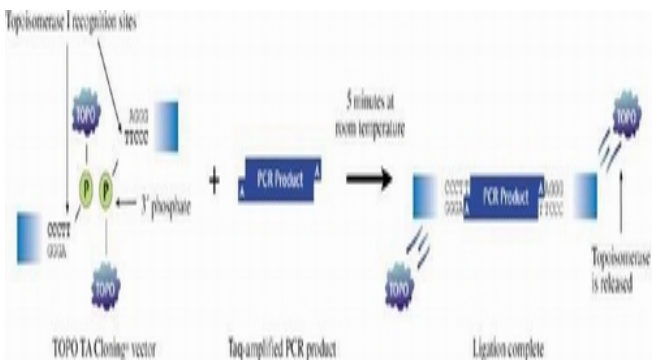


# “飞”一般的克隆

你的克隆速度有多快？人类的百米速度已经跨越了 9 秒 70 的大关，如果你的克隆速度还停留在两天，那似乎是有些 out 了。无论是传统的 TA 克隆，还是改进版的其他克隆，现在都可以实现 5 分钟的快速克隆。

最负盛名的 5 分钟克隆当属 Invitrogen 的 TOPO 克隆了。1997 年上市掀起了一场克隆的革命。至今十余年间，发文无数，一跃成为最常用的克隆方式之一。TOPO 载体的种类还在不断增加，应用范围包括普通的亚克隆、测序、体外转录和表达等。

TOPO 克隆的核心是 DNA 拓扑异构酶 I，它同时扮演了限制性内切酶和连接酶两个角色。它的生物功能是在复制过程中切断并重新连接 DNA。牛痘病毒拓扑异构酶 I 特异性地识别 5'-(C/T)CCTT-3' 序列，与 3'T 的磷酸基团形成共价键，并切断一条 DNA 链，使 DNA 解链。随后它从 DNA 末端撤离。为了利用拓扑异构酶的连接活性，TOPO 载体被线性化，并在每个 3'磷酸基团上连接了拓扑异构酶 I。这样能确保载体与互补末端的迅速连接（图 1）。整个连接过程只需要 5 分钟，



就是这么简单。

如果你用的是 TOPO 版的 TA 克隆，那么基本过程与 TA 克隆相似，注意事项可以参考 TA 克隆的策略。唯一不同的是连接过程。首先是离子浓度。

Invitrogen 的实验证明高盐浓度（200 mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>）能使转化子增加 2-3 倍。因为盐能够防止拓扑异构酶 I 在连接之后，重新结合模板并切割 DNA。结果产生了更多完整的重组子，转化效率自然也提高了。不过电转所需的盐浓度比化学转化低，这一点要特别注意。其次是连接时间。对于大部分实验来说，5 分钟已足够。如果 PCR 产物大于 1 kb，将连接时间延长至 30 分钟能产生更多的克隆。最后强调一下反应温度。T4 连接酶不能超过 16℃，而拓扑异构酶 I 则偏爱室温。这个室温是指 22-23℃，应特别注意。很多时候我们实验室的室内温度并不满足条件。TOPO 克隆得到的菌落可能不如 TA 克隆多，不过质量高，95%左右都是重组子。价格约为 5748 元/20 次，时间就是金钱，这下体会到了吧。

如果你用的是高保真酶，你可以选择在 PCR 之后加 A，或者你直接选择平端克隆试剂盒。由于载体会自连，所以平末端克隆的背景会很高。为了避免这个问题，Invitrogen 开发了 Zero Background（零背景）技术，用在 TOPO 载体上。这个技术将 LacZα 和致死的 ccdB 基因串联在一起。如果载体自连，ccdB 基因表达，菌落就无法生长；如果插入片段，ccdB 基因的表达被破坏，重组子才得以生长。这样，就避免了平端克隆的高背景，使重组效率达到 95% 以上。这个试剂盒的价格更贵一些，20 次的是 6240 元。

TA 克隆以其简单快速而深得人心，不过有利

即有弊。TA 克隆无法定出方向，重组子中正反方向的约各占一半。如果仅仅是克隆也无所谓，表达可就不能这么随便了。因此 TOPO 系列也推出了定向克隆的版本，简称为 D-TOPO。在这个系统中，克隆载体的一端有着 GTGG 的垂悬。PCR 的正向引物上也添加了 CACC 四个碱基。这样，通过碱基互补配对，就锚定了 PCR 产物处于正确的方向。而克隆效率也在 90%或以上。引物设计也不麻烦，只需在正向引物的 5'端加上 CACC 四个碱基即可。不过反向引物的末端可一定不能与 GTGG 配对，否则前功尽弃。仅仅只有一个错配也不行，克隆效率会从 90%降到 50%。为保险起见，最好能与 GTGG 保持两个碱基以上的错配。D-TOPO 主要用在表达载体上，价格约在 4000-6000 元不等。

以往的 TOPO 克隆市场总是 Invitrogen 一家独大。前两年 Stratagene 公司也推出了 5 分钟的 StrataClone 技术，与之抗衡。StrataClone 的原理与 TOPO 克隆类似，但也不完全相同，估计是专利的问题。它也是利用了牛痘病毒的拓扑异构酶 I 的连接功能。不过载体分成了两段，每一段的一端连着拓扑异构酶 I 和 U 尾巴，另一端则包含 loxP 识别序列。PCR 产物通过 A-U 互补而形成一条线性分子（载体臂-PCR 产物-载体臂）。这时转化进表达 Cre 重组酶的感受态细胞。在 Cre 重组酶的作用下，loxP 位点发生重组，产生可复制的环状

分子。这个过程似乎要稍微麻烦一些，而且对感受态细胞还有要求，一定要表达 Cre 重组酶。我们常用的 TOP10、JM109 等就不能用了。不过它胜在价格便宜，20 次的价格为 4084 元，还经常打折。

不花钱购买新载体，也一样能实现 5 分钟的克隆。NEB 公司的快速连接试剂盒就不可小觑。它其中的 T4 连接酶浓度竟然高达 2000 U/ul，是其他厂家的 400 倍。因此连接效率也陡然上了一个新台阶，从原先的过夜孵育缩短到 5 分钟。使用的时候一定要注意了，不要觉得时间太短，自作主张延长一会儿，其实根据 NEB 专家的研究，延长时间并不会带来积极的作用。事实上，2 小时以后连接效率反而开始下降，过夜连接会使效率下降 75%。这个试剂盒的价格是 1009 元/30 次，相对于上面那些大牌来说，这个价格很亲民吧。不过它只含有 T4 连接酶和 buffer，载体和感受态细胞就不包括在内了。

5 分钟的克隆，够快不？还不够？那我们就拭目以待吧，看什么时候有新产品推出，打破 5 分钟的极限，实现 1 分钟或几秒钟的克隆。快速的克隆就谈到这里。下一篇我们会聚焦长片段的克隆，让你轻松应对长片段。

（生物通 余亮）