

# TA 克隆的策略

对于亚克隆来说，酶切-连接可谓是最经典的方式。虽说效果不错，可着实有些麻烦。载体和片段分别酶切、跑胶、回收，再加上连接和转化，一星期转眼就过去了。做表达的那是没办法，载体上只有多克隆位点，那我们只能配合。对于只是想克隆保存或测序的同学来说，快速简便的 TA 克隆则不失为一个好选择。

TA 克隆的 idea 最初来自 1994 年。几位学者发现 Taq DNA 聚合酶会在 PCR 产物的 3' 末端加上一个脱氧腺苷 (A)，而且这种特性与模板无关。之后，Invitrogen 公司发明了 TA 克隆技术，并拥有全球 TA cloning 商标的专利权，直至 2013 年。（这个就够他们赚得盆满钵满了。）线性化的 T 载体在 3' 末端拥有一个脱氧胸苷 (T)，与 PCR 产物的 A 尾巴互补。原理就是这么简单。不过由于价格的原因，Invitrogen 的 T 载体在国内却不是销量最好的。Promega 的 pGEM-T (easy) 和 Takara 的 pMD18-T 因性价比高，更加深入人心。

TA 克隆的步骤无需赘述，相信大家都很清楚。无非就是 PCR、连接、转化、鉴定这几个步骤，不过还有一些不得不说的的问题，值得大家注意。

## 用什么样的聚合酶？

不是所有的聚合酶都会在 PCR 产物末端加 A。具有 3' 到 5' 外切酶活性的高保真酶就不会产生 A 尾巴。如果你下一步想要做基因表达，一定要用高保真酶，那也没问题。只要用 Taq 酶在产物末端加个 A 就 OK。步骤也很简单，根本无需买个什么加 A 试剂盒，几步就搞定了。

1. 用高保真酶扩增完之后，在反应管中加入 0.7-1 unit 的 Taq 聚合酶。无需更换 buffer，其中的 dATP 已经够用。

2. 在 72°C 孵育 8-10 分钟。

3. 立即进行纯化，沉淀、跑胶、或用纯化试剂盒。这一点相当重要，否则高保真聚合酶会将 A 尾巴或 T 载体上的 T 尾巴切掉。

有些高效率的聚合酶其实是 Taq 酶和高保真酶的混合物，大约有一半的产物加了 A 尾巴。所以你在克隆之前最好搞清楚你用的酶到底是否加 A，否则克隆出来白斑太少，又要讨论好久。

## PCR 产物的纯度

如果你的 PCR 产物只有唯一一条带，恭喜你。不过为保险起见，最好还是用 PCR 产物纯化试剂盒来纯化一次。否则白色菌落中的插入片段可能是引物二聚体哦。如果你发现有非特异条带，那最好优化一下 PCR 反应，让非特异条带消失。跑胶纯化是下策，因为胶纯化可能会带走 3' 的 A 尾巴。而且注意不要在紫外灯下暴露太久。只需 5 秒，紫外对 DNA 的伤害就足以检测；而长达 60 秒的照射会让某段序列在测序时无法读取。问题远比你想象中严重。

生物通提示：PCR 产物其实也有保质期。为了保证连接效率，PCR 产物最好不要超过一天。因为上面的 A 尾巴会随着时间逐渐降解，导致连接效率下降。千万不要为了省事，就整个一大管 PCR 产物，每次用一点。最终反而更浪费时间。

## 载体和片段的比例

这往往是影响克隆效果的最大因素。通常来

说，载体与片段的起始摩尔比为 1: 1。计算方法如下：

$$X \text{ ng PCR产物} = (\text{ng 载体} \times \text{kb 片段大小}) / \text{kb 载体大小}$$

如果这样的比例不能令你满意，你可以在 3: 1 到 1: 3 的范围内进行优化，选择最佳的比例。PCR 产物的浓度可以通过与 Marker 比对估算出来。还有一种更准确的方法，用 GE 的 NanoVue 超微量分光光度计。只需要 0.5 ul，就能测量出样品浓度，你再也不用舍不得珍贵的样品了。0.5 ul 而已，小意思。

### 对照

托尔斯泰曾说过：“幸福的家庭总是相似的，不幸的家庭各有各的不幸。”实验也是如此。失败的实验总有各种各样的缘由。对照在实验失败时就凸显其重要性了。

### 阳性对照

一般在购买 TA 克隆的 kit 时，都会附带阳性对照。你应该在第一次实验的时候，就按照说明书上对照反应的步骤，同时进行阳性对照，以检验 PCR 和连接反应是否有问题。而不是在失败了七

八次之后，才想起阳性对照。浪费了时间不说，如果你的样品很珍贵，那谁也无回天。一般说来，起码有 60% 以上的菌落应该是白色的。

### 自连对照

这个对照是检验 T 载体的 T 尾巴是否还在。如果转化后出现大量菌落，这个 T 载体一定有问题。

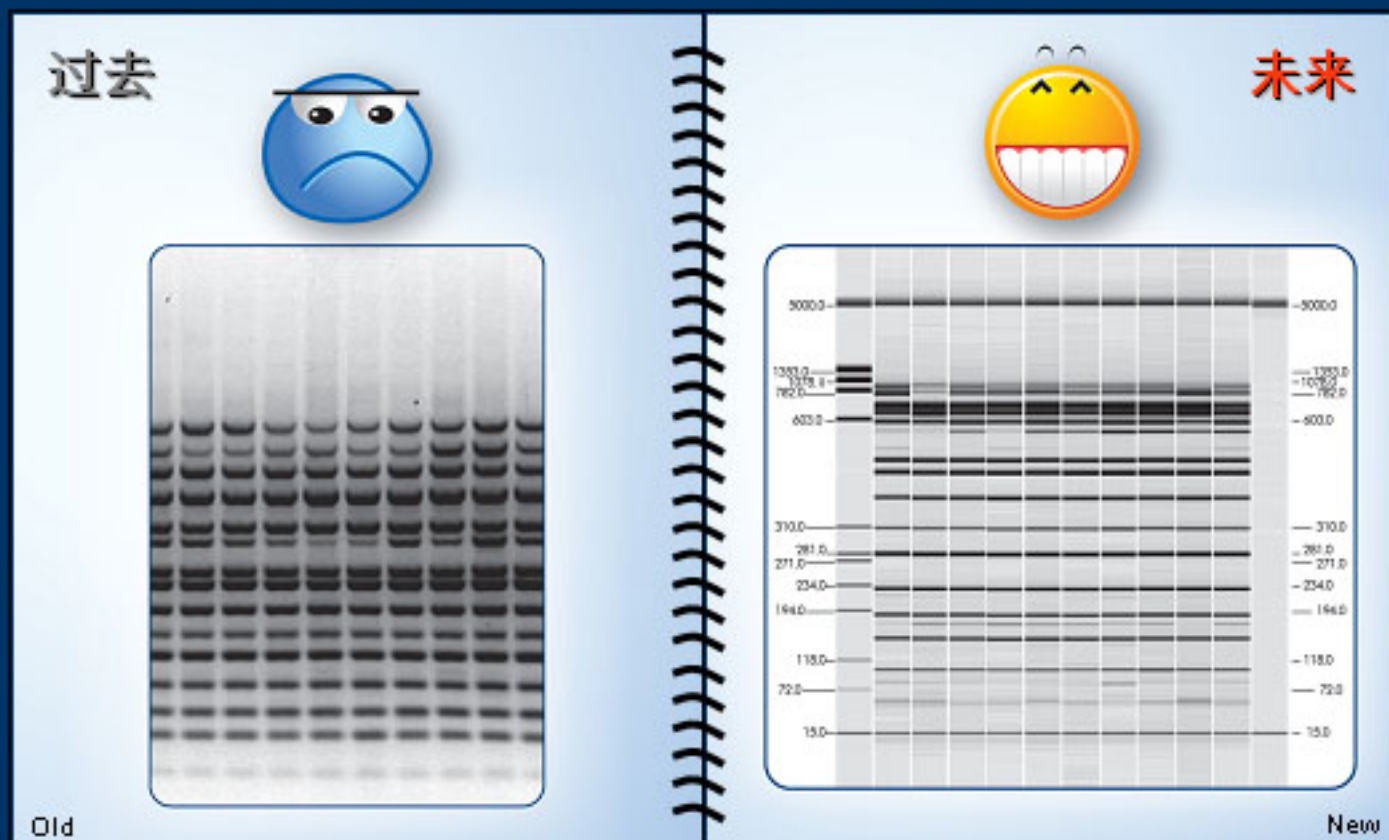
### 转化对照

每一次转化实验都应该设立对照。自家制备感受态细胞是这样，购买现成的感受态更是这样。因为感受态细胞非常敏感，绝对不能冻融。从外地长途运输过来，谁知道中途发生过什么事。为保险起见，一定要转化一个环状的质粒（非 T 载体，因为它们已经线性化了）作为对照。如果没有看到密密麻麻的菌落，这个感受态基本就是不合格的。

TA 克隆的效率主要与片段长短有关，片段越长，效率越低。一般的 TA 克隆试剂盒适用于 3kb 以下的片段。如果你的片段很长，最好选择一些特别的长片段克隆试剂盒，详见后文。

（生物通 余亮）

# Bye-bye了，传统凝胶电泳！



3-5分钟常规片段分离；10分钟高分辨率片段分离……

不用制胶、上样、拍照……

一切尽在鼠标轻点之间……

QIAxcel新一代的核酸片段分析系统，开启凝胶电泳的新篇章！

更多QIAxcel信息请点击进入>>