



You Partner in Research & Development

产品说明书

Product description

产品名称: **Fusion-快速同源重组预混液 (多片段)**

目录号: **KF0701**

咨询电话: 15837171623

QQ: 3090544158@qq.com

网站: www.codonx.com

FOR RESEARCH USE ONLY NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

北京密码子生物科技有限公司

1. 产品内容:

组分	KF0701-20 (20T)	KF0701-50 (50T)
Super Fusion Cloning Mix (2×)	100 μ L	250 μ L
Control Plasmid, linearized (50 ng/ μ L)	5 μ L	5 μ L
500 bp Control Fragment (50 ng/ μ L)	5 μ L	5 μ L

注：微量体积试剂请在正式实验开始前进行瞬时离心操作

2. 储存条件:

-20℃保存，两年有效。

3. 产品介绍:

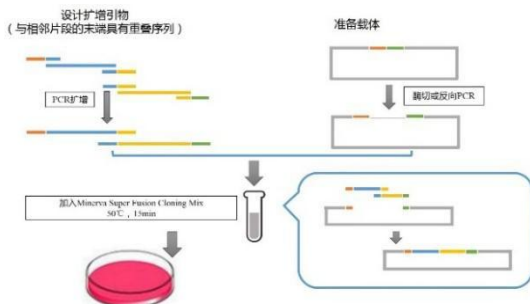
无缝克隆是一种简单、快速并且高效的 DNA 定向克隆技术，可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。通过识别 DNA 片段和线性化载体末端的 15-25 bp 同源序列，50℃反应 15-60 min 即可将 DNA 片段和线性化载体高效精确地融合在一起，完成定向克隆，且克隆阳性率可达 95%以上。

4. 产品特点:

- ① 简单、快速、高效，可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点；
- ② 不依赖于连接酶，无载体自连，阳性率可达 95%以上；
- ③ 无需考虑插入片段自身携带的酶切位点；
- ④ 一次反应可完成单至多个片段重组。

5. 使用方法

流程概要图:



一. 制备线性化克隆载体

选择合适的克隆位点，对载体进行线性化，线性化载体可以通过酶切或者反向 PCR 扩增完成。

(1) 酶切制备

双酶切：线性化完全，转化背景（假阳性克隆）低； 单酶切：线性化程度差，可通过适当延长酶切时间来减少环状质粒的残留。

注（1）双酶切无需去磷酸化，单酶切需要去磷酸化；

（2）酶切完成后，应将快速内切酶失活或对目的产物纯化后再用于重组反应。

(2) 反向 PCR 扩增制备

载体质粒 DNA 为模板，克隆位点为分界点，设计一对反向引物，推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增。

二. 设计插入 PCR 引物片段

PCR 引物的 5' 端必须包含与其相邻片段（插入片段或载体）末端同源的 15~25 nt（推荐 18 nt）序列。假如载体为粘性末端，且 3' 端突出，则引物设计必须包含突出部分；若 5' 端突出，则引物设计可以包含突出部分，也可以不包含。

插入片段扩增引物：

5' — 上游载体末端同源序列+酶切位点（可选）+基因特异性正向扩增序列—3'

3' — 基因特异性反向扩增序列+酶切位点（可选）+下游载体末端同源序列—5'



注：尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆，当载体克隆位点上下游 25 nt 区域内 GC 含量为 40~60%时，重组效率最高

三. 插入片段的 PCR 扩增

插入片段可用任意 PCR 酶 (Taq 酶或高保真酶) 扩增, 无需考虑产物末端有无 A 尾 (重组过程中将被去除, 在最终质粒中不会出现)。建议使用高保真聚合酶进行扩增以减少扩增突变的发生。建议使用纯化后的 PCR 产物进行无缝克隆反应, 若 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物, 可直接可用于无缝克隆反应, 但加样的体积不宜超过反应总体积的 20% 。

四. 无缝克隆反应

冰水浴中配制以下反应体系:

组分	反应体系	阴性对照	阳性对照 (如有必要)
Super Fusion			
Cloning Mix (2×)	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体 1	50-200 ng	50-100 ng	1 μL
插入片段 2	50-200 ng	-	1000 bp, 1 μL
ddH ₂ O	To 10 μL		

1. 最适载体用量 (ng) = 0.02 × 载体碱基对数, 即 0.03 pmol。

2. 插入单片段时, 最适片段用量 (ng) = 0.04 × 片段碱基对数; 插入多片段时, 每片段最适用量 (ng) = 0.02 × 片段碱基对数。

注: (1) 如果插入的单片段长度大于载体, 那么应互换载体与插入片段用量;

(2) 如果插入的片段长度小于 200 bp, 那么要使用 5 倍载体的用量;

(3) 如果按上述公式计算得到的用量低于最低/高于最高值, 那么建议直接按最低/最高用量使用;

(4) 载体或插入片段过长, 片段数量过多, 均会降低阳性率。

体系配制完成后, 轻轻吹吸数次混匀各组分, 避免产生气泡即可, 切勿涡旋。

将反应体系置于 50°C, 反应 15-60 min。

注: (1) 推荐使用温控比较精准的仪器进行反应, 如 PCR 仪, 反应时间不足或过长都会降低克隆效率;

2) 当载体骨架在 10 kb 以上或插入片段在 4 kb 以上时, 建议延长反应时间到 30-60 min;

(3) 50℃反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

1. 将反应液离心管置于冰水浴中冷却, 直接进行转化或储存于-20℃。

注: -20℃储存的重组产物, 建议在 1 周内使用。

五. 克隆产物转化

在 100 μ L 感受态细胞中加入 5-10 μ L 反应液, 轻柔吹吸混匀, 置于冰上 30 min。42℃热激 45~60s, 冰浴 5 min。加入 500 μ L SOC 或 LB 培养基, 37℃振荡培养 40-60 min

(200 rpm) 将菌液均匀涂布在含相应抗生素的平板上, 倒置于 37℃培养箱培养过夜。

注(1)不同感受态细胞最后的克隆阳性率会有所差别, 推荐使用转化效率 $>10^8$ cfu/ μ g 的感受态细胞;

(2) PCR 产物与线性化载体的数量和纯度决定了菌落数;

(3) 阳性对照平板通常生长大量白色单菌落, 阴性对照平板只生长很少的菌落。

六. 阳性克隆检测

菌落 PCR 鉴定: 挑取单菌落置于 10 μ L ddH₂O 中混匀, 95℃裂解 10 min, 取 1 μ L 作模板, 进行菌落 PCR 鉴定, 推荐使用 UE 2×Taq PCR Master Mix (Green)(S2045)

酶切鉴定: 将单菌落接种到抗性培养基中培养过夜, 提取质粒进行酶切鉴定。

注意: (1) 建议菌落 PCR 时, 至少使用一条通用引物, 可有效避免假阳性结果;

(2) 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定

常见问题

问题描述	可能原因	解决方法
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或妥善保存的感受态细胞。
	DNA 片段比率不佳	按照说明书推荐的最用量和比率配制反应体系。常用的吸光测量法易受 DNA 纯度、缓冲液 pH 值等因素影响，测定偏差较大，因此推荐使用琼脂糖电泳测定样品浓度。
	DNA 片段纯度不够	对载体和插入片段进行胶回收纯化。由于 EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应，因此纯化产物应溶解于 ddH ₂ O 中，切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。
	反应产物过量	在转化体系中，无缝克隆反应产物体积不应超过感受态细胞体积的 10%。
大量克隆不含插入片段	载体线性化不完全	酶切制备线性化载体时，提高限制性内切酶使用量，延长反应时间，或使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时，使用线性化质粒作为扩增模板，使用 DpnI 等甲基化敏感性内切酶对扩增产物进行处理，或对产物进行胶回收纯化。
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素，并使用新鲜制备的抗生素平板。

