



Fast-Fusion™ 克隆试剂盒使用说明书

快速有效地进行 PCR 产物克隆

Cat. No. FFPC-C020

Cat. No. FFPC-C050

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编: 510663

电话: 4006-020-200

邮箱: sales@igenebio.com

网址: www.genecopoeia.com

www.igenebio.com

Fast-Fusion™ 克隆试剂盒

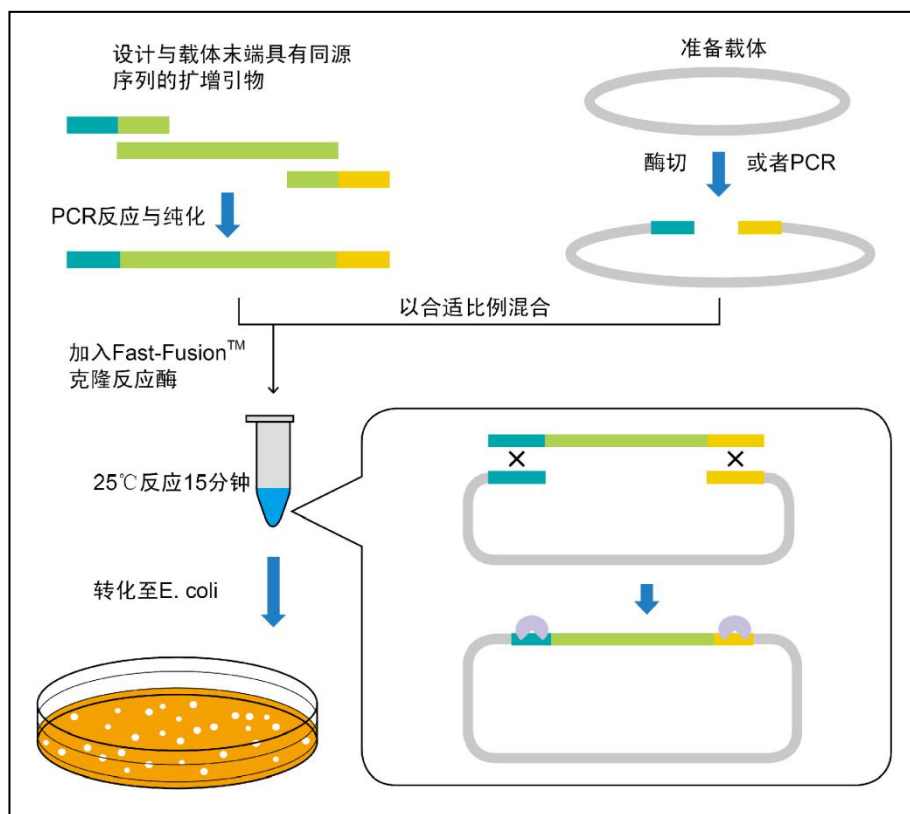
使用说明书

- I. 产品介绍
- II. 组分与储存方法
- III. 关键步骤
- IV. 克隆及转化
- V. 常见问题
- VI. 附录
- VII. 使用限制与质量保证

I. 产品介绍

Fast-Fusion™ 克隆试剂盒为 PCR 产物克隆提供了一种快速有效的方法，只需在室温条件（25℃）下反应 15 分钟，任何 PCR 产物片段都能克隆到线性化载体上。经过简单纯化的 PCR 产物片段或者其他纯化的 DNA 片段能够与载体 DNA 末端的重叠序列融合链接（见图 1）。单个 Fast-Fusion™ 克隆反应能够同时融合多达 8 个 DNA 片段。预处理好的载体克隆阳性率几乎达到 100%。

利用本产品进行克隆连接无需限制性酶切位点，这项优势使得载体上的任何位点都可用于插入外源片段。线性化载体可通过 PCR 或者限制性酶切准备，PCR 产物片段可通过 Taq DNA 聚合酶或其他高保真 DNA 聚合酶扩增获得。



技术原理

Fast-Fusion™ 克隆试剂通过两个同时进行的步骤对同源片段进行重组：**a. 同源性识别**；**b. 链置换和闲置链的降解**。重组后双链产生的缺口，在转化大肠杆菌后被细菌内部的酶修复，得到完整的质粒。

产品优势

- 快速简便——1 分钟操作时间，15 分钟室温反应；
- 适用性强——无需特定的限制性酶切位点或重组位点，PCR 或酶切产物都可克隆；
- 无缝克隆——不附加任何多余碱基序列；
- 灵活多变——一步完成多片段融合，多点突变易如反掌；
- 高效率高通量——转化简单，阳性率高达 90% 以上。

实验流程



II. 试剂盒组份与储存方法

GeneCopoeia Fast-Fusion™ 克隆试剂盒（Cat.Nos.FFPC-C020、FFPC-C050）组份如下表。

组分	体积	运输条件	储存温度
Fast-Fusion™ Clonase	1 × 20 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
	1 × 50 μL		
10 × Clonase Buffer	1 × 20 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
	1 × 50 μL		
QP Reagent	1 × 500 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
	2 × 1 mL		
TE Buffer	1 × 500 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
	2 × 1 mL		
Linearized pUC19 (50 ng/μL)	1 × 10 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
	1 × 10 μL		
Positive Insert (100 ng/μL)	1 × 10 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
	1 × 10 μL		

实验所需其他材料

用于克隆的质粒载体
Taq DNA 聚合酶或者其他高保真 DNA 聚合酶
用于定量的 DNA 分子量标准
限制性内切酶
凝胶纯化试剂盒
用于克隆的感受态细胞
S.O.C.培养基
LB 平板及抗生素

III. 关键步骤

- 载体准备：**一个优质的载体可以缩短筛选时间，因此需要尽量减少线性化载体中残留的环形载体，建议利用双酶切处理结合胶回收纯化的方法去除环形载体背景。对于 PCR 扩增得到的载体片段，DpnI 内切酶可消化大肠杆菌复制产生的 Dam 甲基化模板 DNA。可以通过转化 5-10 ng 线性化质粒（载体）到 50-100 μL 感受态细胞中测试载体的背景。
- PCR 引物设计：**引物设计是 Fast-Fusion™ 体系克隆中最重要的一步。同源序列必须设计在需要进行融合的 DNA 片段（例如载体和插入片段的末端）末端。引物设计方法参考图 3 和图 4，同时需要遵循以下原则。
 - 每条引物必须包括两个区域，引物 5'端为同源序列区，其序列与将要连接的 DNA 片段末端（例如载体或者另一个片段）碱基序列一致；3'端为特异序列区，用于扩增序列下游的目的（插入）片段。
 - 实验证明，当片段间同源序列区域小于 15 bp 时，转化效率会因 DNA 结构的不同而存在很大差异（见图 2.），为了获得更好的转化效果，建议 5'端同源序列区域长度大于 15 bp。
 - 引物序列应避免在内部或在引物间产生互补，以防止形成发夹结构或者引物二聚体。
 - 应仅以特异序列区域包含的碱基计算引物在 PCR 反应时的退火温度，通过调整 3'端基因特异引物序列的长度使 T_m 值控制在 55 $^{\circ}\text{C}$ -65 $^{\circ}\text{C}$ 之间。

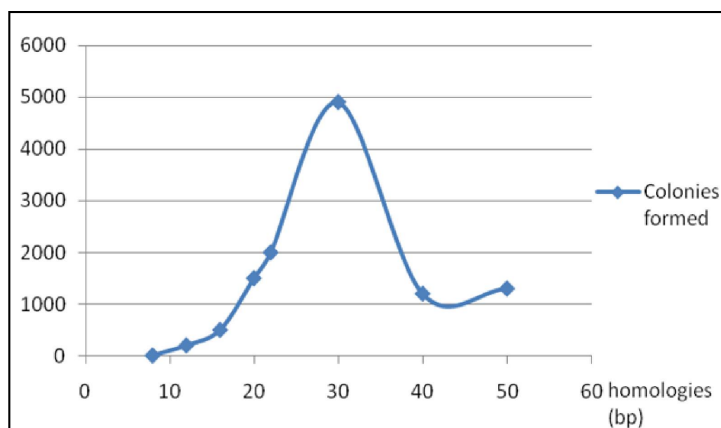


图 2. 同源序列长度对克隆效率的影响。具有不同长度同源序列的插入片段与 pUC19 载体完成标准 Fast-Fusion™ 反应后，转化 5 ng 载体量的产物至感受态细胞所获得的克隆数如图所示（所用感受态细胞转化效率为 $2 \times 10^9 \text{ cfu}/\mu\text{g}$ ）。

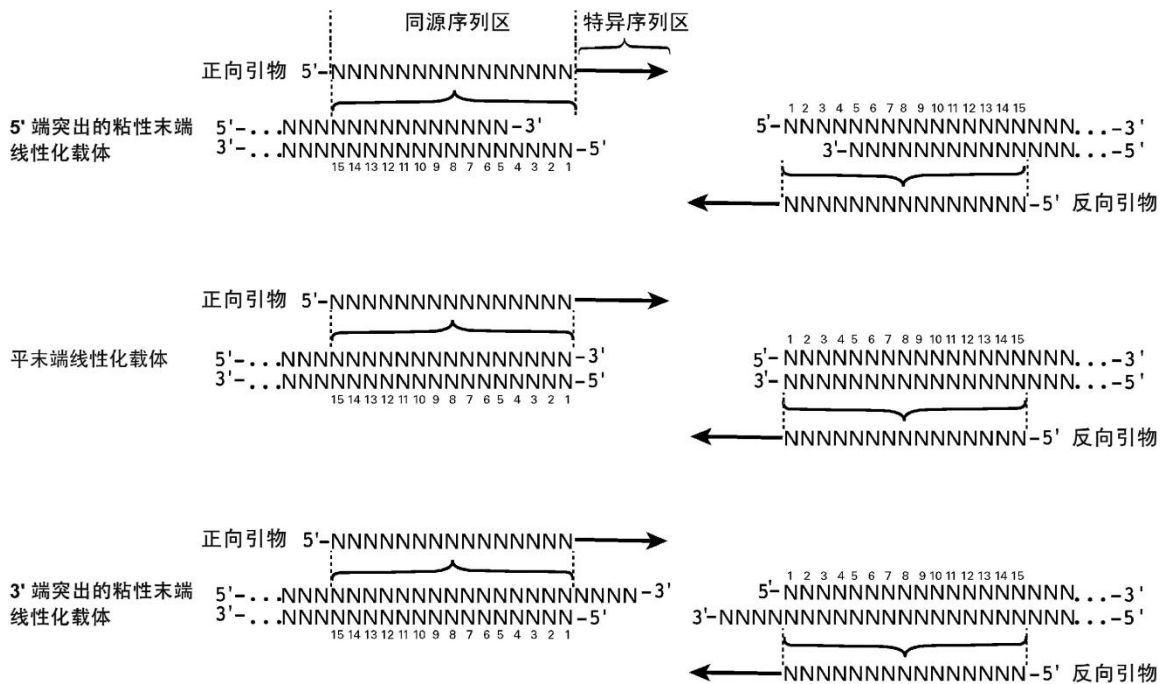


图 3. 不同载体末端的 15 bp 同源序列引物设计方案



图 4. Fast-Fusion 引物设计实例。以 Bam HI 内切酶消化的 pUC19 质粒为载体，引物设计如图所示，加下划线的碱基(15 bp)为同源序列区域；X 代表的碱基为基因特异序列区域，用于扩增插入片段。

3 PCR 扩增和产物纯化：Taq DNA 聚合酶或其它高保真 DNA 聚合酶扩增的片段都适用于 Fast-Fusion™ 克隆体系。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行分析，如果电泳结果为单一的条带（见图5），可使用 QP Reagent 进行纯化。如果出现非特异性扩增（见图5），建议对 PCR 产物进行凝胶回收纯化。纯化后可使用 DNA 标准品对 PCR 产物进行定量。

4 QP Reagent 的使用：QP Reagent 用于沉淀大于 100 bp 的双链 DNA，去除 dNTPs、引物和大部的聚合酶。

(1) 在使用 QP Reagent 前，请反复颠倒数次。

(2) 对于 50 uL 的 PCR 产物，补充 TE Buffer 至 100 µL，然后直接加入 50 µL QP Reagent，涡旋震荡 5 秒彻底混匀。

(3) 15000×g 离心 15 分钟，弃去上清，短暂离心 10 秒后将残留在管底部的液体全部吸走。注意！对于 200 bp 以下的片段，离心前在 4℃ 静置至少 30 分钟可提高回收效率。

(4) 用ddH₂O 稀释 TE Buffer 至10%的浓度，加入 10-20 μL 的10% TE Buffer 重新溶解 DNA。

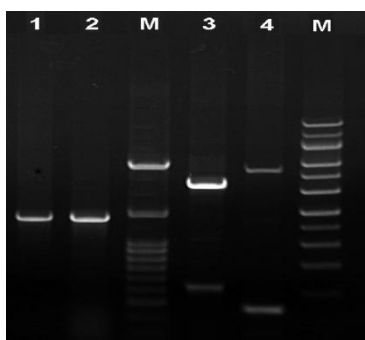


图 5. PCR 产物凝胶电泳图。未纯化的 PCR 产物（泳道2），QP 纯化的 PCR 产物（泳道1），非特异性扩增（泳道3、4）。

IV. 克隆及转化

1 克隆反应

(1)按照下列表格，在冰上配制 10 μL 体积的克隆反应液。注意！请参考下列表格的数据调整插入片段与载体的使用量，推荐摩尔数比例（molar ratio）为2-5:1。多片段重组时，注意体系中的 DNA 总量不要超过 200ng/10uL，可以适当减少小片段的加入量。在首次使用 Fast-Fusion™ 试剂盒时，建议同时进行阳性对照和阴性对照反应，验证反应体系能够正常运行。试剂盒里提供的 Positive Insert 和 Linearized pUC19 已经过纯化，反应前无需处理，可直接使用。

反应组分	克隆反应	阴性对照	阳性对照
Linearized Vector	20-100 ng	1 μL	1 μL Linearized pUC19
Target Insert	20-150 ng	-	1 μL Positive Insert
10 × Clonase Buffer	1 μL	1 μL	1 μL
Fast-Fusion™ Clonase	1 μL	1 μL	1 μL
ddH ₂ O	加水至 10 μL	7 μL	6 μL

载体		插入片段	
长度	反应加入量	长度	反应加入量
3k bp	30~50 ng	200-2000 bp	20-100 ng
5k bp	40~50 ng	2k-5k bp	100 ng
9k bp	50 ng	>5k bp	100 ng

(2)轻弹管壁使配置好的反应液分散均匀。25℃ 温育 15 分钟。

(3)在冰上保存直至转化。反应产物可直接冻存于-20℃ 以下而不会影响成功率。

[可选] 向反应液中添加 40 μL TE Buffer 终止反应，可利于长期保存。

2 转化

请按照下列步骤进行化学转化，或遵循感受态细胞供应商提供的指导，建议使用高效率（>10⁸ cfu/ug）的感受态细胞。

- (1) 转移 1-2 μL 冰上保存的克隆反应液（或 5-10 μL 用 TE Buffer 终止反应的克隆反应液）至装有 100 μL 感受态细胞的离心管中，轻弹管壁使之混匀，冰上静置 30 分钟。注意！单片段插入时，通常取 1 μL 反应液已足够。若是多片段插入，加大反应液用量有助于提高转化效率。
- (2) 将转化混合物置于 42°C 热激 30 秒，避免震动。然后迅速将转化管放在冰上，冰浴 2 分钟。
- (3) 加入 400 μL 室温保存的 S.O.C. 培养基至转化管中。
- (4) 盖紧离心管盖，37 °C 温育（可摇床培养，也可静置培养）1 小时。
- (5) 将 50-500 μL 反应物涂布到已加抗生素的 LB 平板（使用前 37 °C 预温）。
- (6) 将平板 37°C 恒温培养过夜。
- (7) 筛选、分析阳性菌落

V. 常见问题

如果您没有得到预期的实验结果，请参考以下表格查找问题所在。

1 转化后出现很少或没有菌落

可能出现的情况	解决办法
感受态细胞效率偏低	检查对照，效率超过 10^8 cfu/ μ g 的感受态细胞至少应产生 100 个菌落。
DNA 纯度较低	采用胶回收等方法纯化 DNA。
反应中 DNA 浓度低	使用已知浓度的 DNA 分子量标准，浓缩 DNA 至其浓度超过 20 ng/ μ L。
引物序列不正确	检查引物序列，保证其扩增产物与相邻片段具有大于 15bp 的同源序列。
同源性不足	20bp 以上同源序列即能获得满意的效果。如果您的感受态细胞效率不足 1×10^8 cfu/ μ g，请尽量使用 20bp 以上的同源设计。
EDTA 等杂质抑制	不要使用含 0.2mM 以上的 EDTA 溶液 (TE) 溶解 DNA，EDTA 会抑制反应。
PCR 产生不完整的 3'末端，特别是使用具有 3'-5'外切酶活性(校对作用)的聚合酶时	延长最后一个 PCR 循环的延伸时间，并确保反应中 PCR 循环结束后 dNTPs 仍足量。
同源性过高	如果同源序列超过 30 bp，增加反应温育时间至 30 分钟，如果同源序列超过 50 bp，增加反应温育时间至 60 分钟。

2 获得大量菌落，但没有发现插入片段

可能出现的情况	解决办法
载体线性化不完全	完全消化载体，生成特异的末端。用胶回收纯化酶切产物。通过转化空白载体，验证背景菌落的多少。
具有相同抗性的PCR 模板污染	通常 1~10 ng 质粒模板已经足够用于 PCR 反应。使用 DpnI 去除质粒模板，或者用胶回收 PCR 产物。
反应中DNA 浓度低	插入片段浓度过低会造成载体空切，某些载体会有假阳性。
反应的DNA 过多	转化过程中 DNA 浓度过高(超过 200 ng/ μ L)会降低反应速度，多余的插入片段间会形成竞争。每 100 μ L 感受态细胞加入的 DNA 不要超过 50 ng。
抗生素过期	对正在使用的平板进行 37°C 过夜培养，测试其抗生素是否已经失效并被细菌污染。

VI. 附录:

试剂配方:

TE Buffer:

10 mM Tris.Cl (pH8.0)

1 mM EDTA (pH8.0)

SOC medium (100ml)

2% (W/V) Bacto Tryptone

0.5% (W/V) Bacto Yeast Extract

0.05% (W/V) NaCl

2.5mM KCl

pH 值调至 7.0, 灭菌后冷却到 60℃ 以下。加入 MgCl₂ 溶液 (终浓度为 10mM) 和除菌的葡萄糖溶液 (终浓度为 20mM)。

可选产品:

产品名称	货号及规格	
Taq DNA 聚合酶	C0101A (1,000 U)	C0101B (2,000 U)
Super Taq DNA 聚合酶	C0102A (400 U)	C0102B (800 U)
UltraPF™ DNA 聚合酶	C0103A (200 U)	C0103B (400 U)
dNTP Mixture (10mM each)	C0301A (250 µl)	C0301B (4×250µl)
dNTP Mixture (25mM each)	C0302A (250 µl)	C0302B (4×250µl)
DH5α 感受态细胞	U0102A (10×100 µl)	
Stbl3 感受态细胞	U0103A (10×100 µl)	
2T1 感受态细胞	U0104A (10×100 µl)	
BL21 感受态细胞	U0105A (10×100 µl)	
TOP10 感受态细胞	U0106A (10×100 µl)	

VII. 使用限制与质量保证

使用限制

以下条款适用于Fast-Fusion™ 克隆试剂盒产品。若您不能接受这些条款，请在5个工作日内将产品完整退还给GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未经GeneCopoeia事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经GeneCopoeia证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia不承担责任。GeneCopoeia不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对GeneCopoeia的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话4006-020-200联系我们。

© 2018, GeneCopoeia, Inc.

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive, Suite 101
Rockville, MD 20850
+1 (301) 762-0888
+1 (866) 360-9531
inquiry@genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器F区8楼
邮编：510663
电话：4006-020-200
邮箱：sales@igenebio.com
网址：www.genecopoeia.com（英文） www.igenebio.com（中文）