



## Fast-Fusion™ 无缝克隆试剂盒使用说明书

快速有效地进行 PCR 产物克隆

**Cat. No. FF001 (20 reactions)**

**Cat. No. FF002 (60 reactions)**

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](mailto:sales@igenebio.com)

网址: [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com)

[www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)

## Fast-Fusion™ 无缝克隆试剂盒

### 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™ 无缝克隆试剂盒为 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™ 无缝克隆反应能够一次融合 1 或 2 个插入 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。

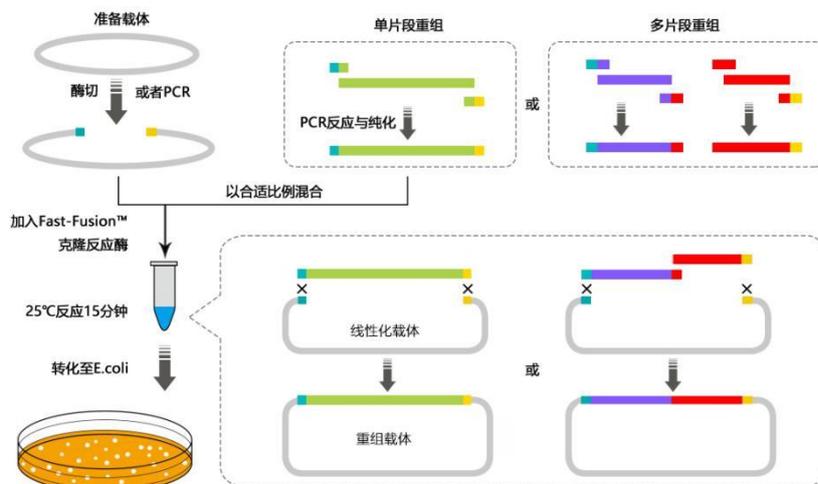


图 1. 利用 Fast-Fusion™ Seamless Cloning Kit 将 PCR 片段插入线性化载体的流程图

## 技术原理

Fast-Fusion™ 无缝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1-2个插入片段融合，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

GeneCopia Fast-Fusion™ 无缝克隆试剂盒（Cat.Nos.FF001、FF002）组分如下表。

组分	体积	运输条件	储存温度
<b>Fast-Fusion™ Seamless Clonase</b>	1 × 20 μL 3 × 20 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
<b>10 × Seamless Clonase Buffer</b>	1 × 20 μL 3 × 20 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
<b>QP Reagent</b>	1 × 500 μL 3 × 500 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
<b>TE Buffer</b>	1 × 500 μL 3 × 500 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
<b>Linearized pUC19 (50 ng/μL)</b>	1 × 10 μL 3 × 10 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
<b>Positive Insert (100 ng/μL)</b>	1 × 10 μL 3 × 10 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月

## 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

1. 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  $\mu\text{L}$  感受态细胞中测试载体的背景。
2. PCR 引物设计：引物设计是 Fast-Fusion™ 无缝克隆体系中最重要的一步。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。

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 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。

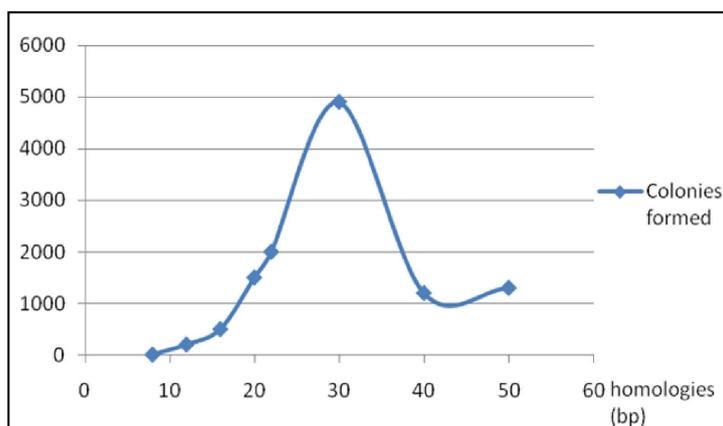


图 2. 同源序列长度对克隆效率的影响。具有不同长度同源序列的插入片段与 pUC19 载体完成标准 Fast-Fusion™ 反应后，转化 5 ng 载体量的产物至感受态细胞所获得的克隆数如图所示（所用感受态细胞转化效率为  $2 \times 10^9$  cfu/ $\mu\text{g}$ ）。



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

- (1) 在使用 QP Reagent 前, 请反复颠倒数次。
- (2) 对于 50  $\mu$ L 的 PCR 产物, 补充 TE Buffer 至 100  $\mu$ L, 然后直接加入 50  $\mu$ L QP Reagent, 涡旋震荡 5 秒彻底混匀。
- (3) 15000 $\times$ 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 $^{\circ}$ C 静置至少 30 分钟可提高回收效率。
- (4) 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 TE Buffer 至 10% 的浓度, 加入 10-20  $\mu$ L 的 10% TE Buffer 重新溶解 DNA。

#### IV. 克隆及转化

##### 1. 克隆反应

1) 按照下列表格, 在冰上配制 10  $\mu$ L 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/10 $\mu$ L, 可以适当减少小片段的加入量。在首次使用 Fast-Fusion™ 无缝试剂盒时, 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 $\mu$ L	1 $\mu$ L Linearized pUC19
Target Insert	20-150 ng	-	1 $\mu$ L Positive Insert
10 $\times$ Seamless Clonase Buffer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Fast-Fusion™ Seamless Clonase	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加水至 10 $\mu$ L	7 $\mu$ L	6 $\mu$ L

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, 短暂离心 6000-8000rp/30sec。25 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 以下而不会影响成功率。

[可选] 向反应液中添加 40  $\mu$ L 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使用指导，建议使用高效率（ $>10^8$  cfu/ug）的感受态细胞。

- 1) 转移 1-2  $\mu\text{L}$  冰上保存的克隆反应液（或 5-10  $\mu\text{L}$  用 TE Buffer 终止反应的克隆反应液）至装有 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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 $1 \times 10^8$ cfu/ $\mu$ 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/ $\mu$ L)会降低反应速度，多余的插入片段间会形成竞争。每 100 $\mu$ 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 MgCl<sub>2</sub> 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
DH5α 感受态细胞	CC001 (10×100 μl)
Stbl3 感受态细胞	CC003 (10×100 μl)
2T1 感受态细胞	CC007 (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™ 无缝克隆试剂盒产品。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，不得使用于人体或诊断、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 and 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。

© 2024, GeneCopoeia, Inc.

GeneCopoeia, Inc.  
9620 Medical Center Drive, Suite 101  
Rockville, MD 20850  
+1 (301) 762-0888  
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）