



Fast-Fusion™ Multi 无缝克隆试剂盒使用说明书

快速有效地进行多片段PCR产物无缝克隆

Cat. No. FF006 (20 reactions)

Cat. No. FF007 (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 网

址: www.genecopoeia.com

www.igenebio.com

Fast-Fusion™ Multi 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™ Multi 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，只需在条件（50℃）下反应 5-60 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连接（见图 1）。单个 Fast-Fusion™ Multi 无缝克隆反应能够一次融合 1~5 个插入 DNA 片段。单个插入 DNA 片段能在 5 分钟内高效完成融合连接组装。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。

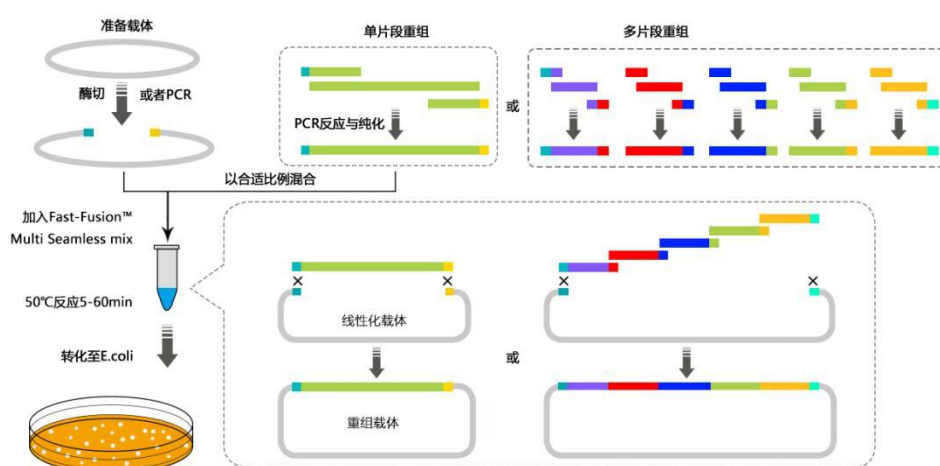


图 1. 利用 Fast-Fusion™ Multi Seamless Cloning Kit 将 PCR 片段插入线性化载体的流程图

技术原理

Fast-Fusion™ Multi 无缝克隆可在等温条件下，单管反应实现多个带重叠末端的 DNA 片段的组装。Fast-Fusion™ Multi Seamless Mix 预混液在同一反应缓冲液中有三种不同的酶活性：

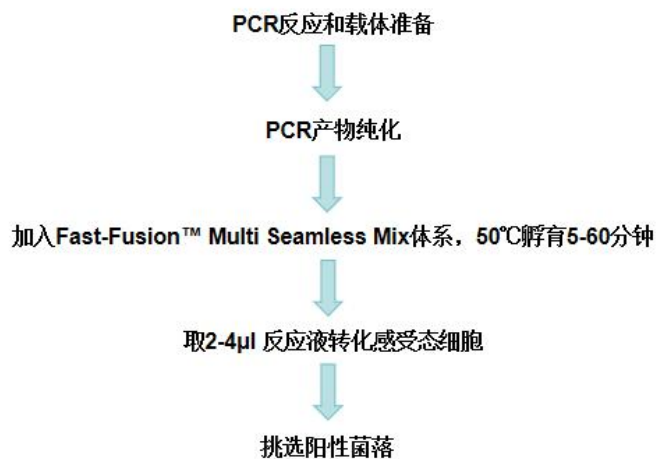
- 核酸外切酶活性会产生单链 3' 突出末端，促使互补的末端重复序列（重叠区）退火。
- 聚合酶活性会填补退火片段的缺口。
- DNA 连接酶活性能在组装后的 DNA 切刻处进行连接。

最终形成双链闭合的 DNA 分子，可作为 PCR、RCA 的模板或其它分子生物学应用，包括直接转化。

产品优势

- 快速简便——1 分钟操作时间，快至5分钟反应；
- 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1-8个插入片段融合，适用于多种 DNA 改造，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

-20℃储存，避免反复冻融。

产品信息	反应次数	组分	组分货号	规格
Fast-Fusion™ Multi Seamless Cloning Kit (FF006)	20rxns	Fast-Fusion™ Multi Seamless Mix	FF006-01	1× 300μl
		Linear pUC19 (50 ng/μl, Amp +)	FF006-02	1× 5μl
		Multi Control Insert Mix	FF006-03	1× 5μl
Fast-Fusion™ Multi Seamless Cloning Kit (FF007)	60rxns	Fast-Fusion™ Multi Seamless Mix	FF006-01	3× 300μl
		Linear pUC19 (50 ng/μl, Amp +)	FF006-02	3× 5μl
		Multi Control Insert Mix	FF006-03	3× 5μl

* 0.5 kb, 10 ng/μl; 1 kb, 20 ng/μl; 2 kb, 40 ng/μl

实验所需其他材料

- 用于克隆的质粒载体
- PCR扩增试剂，例如：UltraHiPF® DNA Polymerase Kit (PC018) 和 2× UltraHiPF® PCR Mix (PC033)
- 用于定量的 DNA 分子量标准
- 限制性内切酶、核酸纯化试剂盒或纯化试剂QP Reagent (FF001-03)
- 用于克隆的DH5α 感受态细胞 (CC001)、Stbl3 感受态细胞 (CC003) 和2T1 感受态细胞 (CC007)
- 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，大大提高实验成功率。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™ Multi 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：

0.5 kb插入片段最适使用量: $0.02 \times 500 = 10$ ng;

1 kb插入片段最适使用量: $0.02 \times 1,000 = 20$ ng;

2 kb插入片段最适使用量: $0.02 \times 2,000 = 40$ ng;

a.线性化克隆载体的使用量应在50 - 200 ng之间。当使用上述公式计算DNA最适使用量超出这个范围时，直接选择最低/最高使用量即可。

b.各插入片段的使用量应大于10 ng。当使用上述公式计算最适使用量低于这个值时，直接使用10 ng即可。

请参考下列表格的数据调整插入片段与载体的使用量，单片段无缝组装时，推荐摩尔数比例（molar ratio）为1-2:1。多片段组装时，注意体系中插入片段间，与载体的使用量，推荐摩尔数比例为1: 1(例如片段A, B, C与载体V同源无缝组装时，片段A: B: C: 载体V=1: 1: 1: 1)。整个体系DNA 总量不要超过 200ng/20uL，可以适当减少小片段的加入量。

载体		插入片段	
长度	反应加入量	长度	反应加入量
3k bp	60 ng	200-1000 bp	4-40 ng
5k bp	100 ng	1k-2k bp	40-60 ng
9k bp	180 ng	2k-5k bp	60-100 ng
		>5k bp	>100 ng

在首次使用Fast-Fusion™ Multi 无缝克隆试剂盒时，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 Multi Control Insert Mix和Linear pUC19 (50 ng/μl, Amp +) 已经过纯化，反应前无需处理，可直接使用。

2) 按照下列表格，在冰上配制 20 μL 体积的克隆反应液。

反应组分	克隆反应	阴性对照	阳性对照
Linearized Vector	0.03pmol, X μl (约50-200 ng)	1 μL Linear pUC19 (50 ng/μl, Amp +)	1 μL Linear pUC19 (50 ng/μl, Amp +)
Target Insert	0.03pmol, Y1-Yn μl (10-200 ng)	-	1 μL Multi Control Insert Mix
Fast-Fusion™ Multi Seamless Mix	15 μL	15 μL	15 μL
ddH ₂ O	加水至 20 μL	4 μL	3 μL

3) 轻弹管壁使配制好的无缝组装反应液分散均匀，短暂离心6000-8000rpm/30秒。50℃ 温育。

- 推荐在PCR仪等温控比较精确的仪器上进行反应。温育时间推荐：

① 1-2个片段构建，5-30分钟反应。重组效率在反应30分钟左右达到最高，反应时间过长将会降低

克隆效率。

② 3-5个片段构建，60分钟反应。片段间长度有明细差异的，反应时间可适当延长到90~120分钟。

4) 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。

- 无缝组装产物可于-20℃存放一周，待需要时解冻转化即可。

2. 转化

请按照下列步骤进行化学转化，或遵循DH5α 感受态细胞（CC001）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2-4 μ L 冰上保存的无缝组装反应液至装有 100 μ 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 μ 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℃ 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 μ 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200-500 μ L 转化培养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℃ 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。

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。请注意载体两端同源臂设计，避免两臂间高度同源在反应中产生了自连。
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:

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	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)
UltraHiPF® DNA Polymerase Kit	PC018	100U
	PC019	500U
2× UltraHiPF® PCR Mix	PC033	1 ml
	PC034	5 ml
Taq DNA Polymerase Kit	PC003	1,000U
QP Reagent	FF001-03	500 μl

QP Reagent

1) 介绍: QP Reagent 是一种纯化试剂（货号FF001-03）。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。

2) 使用说明:

① 在使用 QP Reagent 前，请反复颠倒数次。

② 对于 50 μL 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。

VII. 使用限制与质量保证

使用限制

以下条款适用于Fast-Fusion™ Multi 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。

© 2024, 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（英文） www.igenebio.com（中文）