



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。

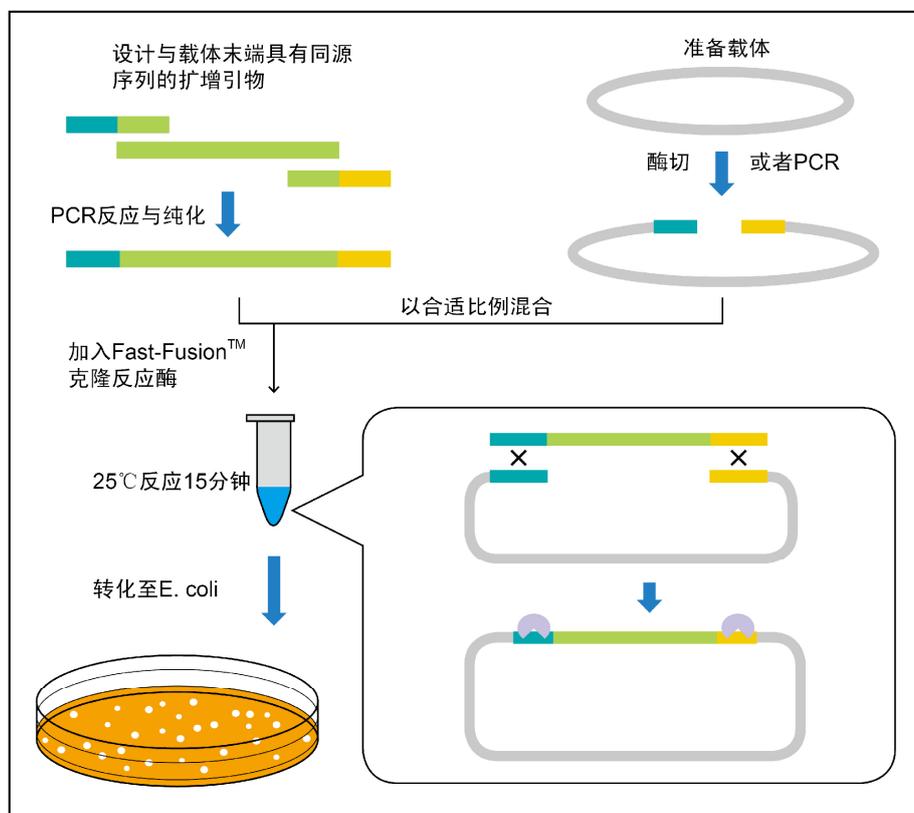


图 1. 利用 Fast-Fusion™ Cloning Kit 将单个 PCR 片段插入线性化载体的流程图

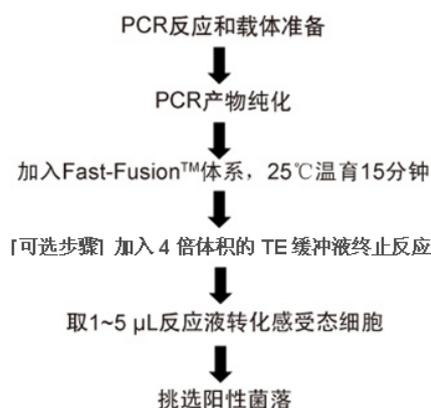
技术原理

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

GeneCopia Fast-Fusion™ 克隆试剂盒（Cat.Nos.FFPC-C020、FFPC-C050）组分如下表。

组分	体积	运输条件	储存温度
Fast-Fusion™ Clonase	1 × 20 μL 1 × 50 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
10 × Clonase Buffer	1 × 20 μL 1 × 50 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
QP Reagent	1 × 500 μL 2 × 1 mL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
TE Buffer	1 × 500 μL 2 × 1 mL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
Linearized pUC19 (50 ng/μL)	1 × 10 μL 1 × 10 μL	干冰或冰袋	-20°C 保存至少 12 个月
Positive Insert (100 ng/μL)	1 × 10 μL 1 × 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 μ 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™ 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。
 - (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°C-65°C 之间。

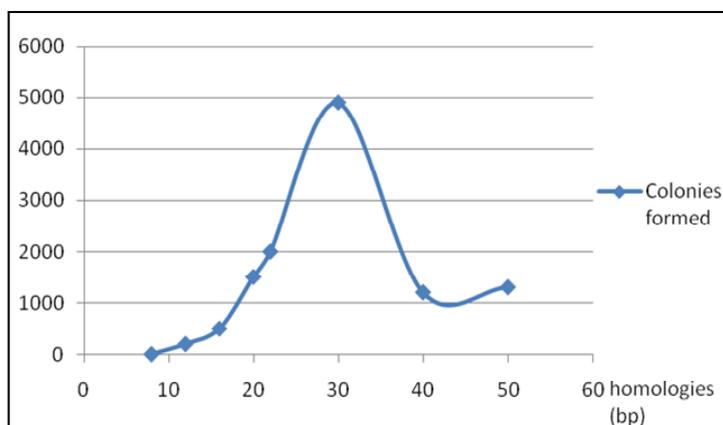


图 2. 同源序列长度对克隆效率的影响。具有不同长度同源序列的插入片段与 pUC19 载体完成标准 Fast-Fusion™ 反应后，转化 5 ng 载体量的产物至感受态细胞所获得的克隆数如图所示（所用感受态细胞转化效率为 2×10^9 cfu/ μ g）。

(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。

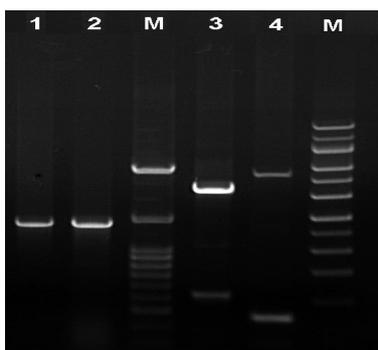


图 5. PCR 产物凝胶电泳图。未纯化的 PCR 产物（泳道 2），QP 纯化的 PCR 产物（泳道 1），非特异性扩增（泳道 3、4）。

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°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°C 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使用指导，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Flink-Clonase™ 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 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。

© 2014, 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）