



You Partner in Research & Development

产品说明书

Product description

产品名称: **Fusion Plus-快速同源重组预混液 (多片段)**

目录号: **KF0801-50**

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. 产品组分

组分	20T	50T
Super Fusion Cloning Mix (2×)	100 μL	250 μL
pUC19 Control Plasmid, linearized (Ampr,40 ng/μL)	5 μL	5 μL
500 bp Control Fragment (20 ng/μL)	5 μL	5 μL

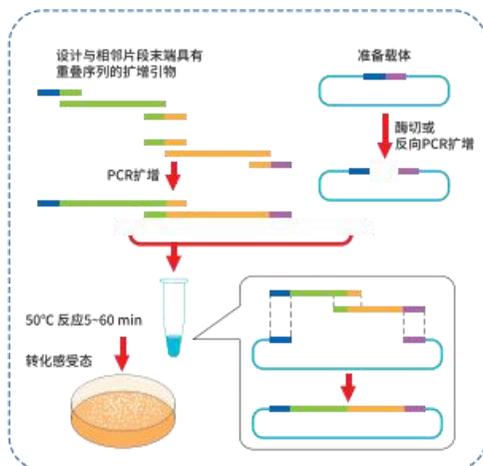
注： -20℃保存，两年有效。微量体积试剂请在正式实验开始前进行瞬时离心操作。

2. 产品介绍

基于重组原理的无缝克隆技术，作为新一代的克隆方法，不依赖繁琐的酶切、连接步骤，也不需要末端补平等操作，依据 DNA 片段与线性化载体末端的 15~25 nt 同源序列的重组，可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点，载体自连背景极低，是一种简单、快速、高效的 DNA 定向克隆技术。一次反应可完成单至多个重组，最快仅需 5 分钟即可完成单片段重组，且阳性率高于 95%。Mix 中添加的辅助因子，有效提高克隆阳性率；经优化的反应体系，能够一定程度上耐受未纯化 PCR 产物中含有的杂质。

3. 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；

注 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。

插入片段正向扩增引物：

5' 一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'

插入片段反向扩增引物：

3' 一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 2：本试剂盒所提供的 pUC 19 载体（Amp^r）连接端序列如下：

5' -ATGACCATGATTACGCCA-3'	5' -AATTC	EcoRI	ACTGGCCGTCGTTTAC-3'
3' -TACTGGTACTAATGCGGTTCGA-5'	3' -GTG	HindIII	ACCAGCAAATG-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

推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增, 以减少扩增突变的引入。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, 可直接使用, 但加样体积不应超过总反应体积的 20%。

四. 无缝克隆反应

1. 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 ^a	50-200 ng	50-100 ng	pUC19 Control Plasmid, linearized, 1 μL
插入片段 ^b	10-200 ng	-	500 bp Control Fragment, 1 μL
ddH ₂ O	To 10 μL		

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

b. 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;

注 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;

注 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

注 4: 载体或插入片段过长, 片段数量过多, 均会降低阳性率。

重组反应体系配制完成后, 轻轻吹吸数次混匀各组分, 避免产生气泡即可, 切勿涡旋。

2. 将反应体系置于 50℃, 反应 5-60 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;

注 2: 插入 1-2 个片段时, 推荐反应时间为 5~15 min; 插入 3~5 个片段时, 推荐反应时间为 15~30 min;

注 3: 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;

注 4: 50℃反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

3. 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 μL 感受态细胞中加入 5-10 μL 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 μL 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/μg 的感受态细胞;

注 2: PCR 产物与线性化载体的数量和纯度决定了菌落数;

注 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 μL ddH₂O 中混匀, 95℃裂解 10 min, 取 1 μL 作模板, 进行菌落 PCR 鉴定。

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 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;

注 2: 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定

4. 常见问题

问题描述	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 片段比例不佳	按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。载体和插入片段的浓度测定：若线性化载体与插入片段已经过纯化，且经电泳检测条带单一或无 Smear 残留时，可使用微量核酸蛋白检测仪等基于分光光度法的仪器进行浓度测定，但只有当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时浓度值可信；若线性化载体与插入片段未 经过纯化，也可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，提高快速内切酶的使用量，延长反应时间，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，使用预线性化质粒作为扩增模板，使用 DpnI 等甲基化敏感型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。
大量克隆含有不正确插入片段	非特异性 PCR 扩增产物	优化 PCR 体系，提高扩增特异性，或胶回收纯化 PCR 产物重叠序列的扩增引物。