

产品名称&产品编码

产品名称: 2X FuseIn Mix 克隆重组酶
产品编码: F003-60 次

产品简介:

本产品为 2X 无缝克隆预混液。
不依赖 T4 连接酶, 不受载体和目的片段酶切位点的限制, 基于 DNA 序列同源重组方法, 轻松实现目的片段与载体的定向无缝克隆。

操作步骤:

A. 插入片段/PCR 产物制备:

PCR 产物可以是平末端或粘性末端, 为减少扩增突变的引入, 推荐使用高保真聚合酶进行扩增。

重组克隆引物设计原则 (如图示):

不论载体末端是平端还是粘端, 同源区域序列的选择均与载体的 3' 末端序列对齐后向 5' 方向数出 20 个碱基。

正向引物序列设计:

5' 一与载体左臂重叠区域 (20bp) + 基因插入片段正向引物序列 (20bp 左右) -3'

反向引物序列设计:

5' 一与载体右臂重叠区域 (20bp) + 基因插入片段反向引物序列 (20bp 左右) -3'

注: 如需引物酶切位点, 在设计公式中的“+”处引入即可。另外, 在选择克隆位点时应避免选择克隆位点上下游 50 bp 内有重复序列的区域。当克隆位点上下游 20 bp 区域内 GC 含量均在 40%~60% 范围之内时, 重组效率达到最大。如这部分区域 GC 含量高于 70% 或者低于 30%, 重组效率会受到一定影响。



插入目的片段重组克隆的引物设计原则

注:

引物和引物二聚体会对克隆重组酶有一定的抑制作用。如果 PCR 反应得到单一的目的条带, PCR 产物可以用 PCR 纯化试剂盒回收; 如果 PCR 产生很多非特异性条带, 应该用凝胶回收纯化目的条带。

B. 线性化载体的制备

使用单/双酶切, 或反向 PCR 扩增进行质粒的线性化, 再通过胶回收的方法回收纯化获得线性化载体。如选用 PCR 扩增, 推荐使用高保真聚合酶, 尽量减少突变的引入。

C. 克隆重组反应的建立

	总体积 10ul
线性化载体 (50-200ng)	X ul
插入片段/PCR 产物 (10-200ng)	Y ul
2X FuseIn Mix	5ul
ddH2O	To 10 ul

1) 将各组小心加到 PCR 管底, 用移液枪轻轻吸打混匀各组分, 稍稍离心混匀, 避免产生气泡, 切勿涡旋。置于 50°C 反应 5-60min。

反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底置于冰上冷却, 进行转化或者 -20°C 冻存后续转化。

-20°C 储存的重组产物, 建议在 1 周内使用

注: 插入 1-2 个片段时, 推荐反应时间为 5-15 分钟; 插入 3-5 个片段时, 推荐反应时间为 15-30 分钟; 当载体骨架在 10kb 以上或插入片段在 4kb 以上时, 建议延长反应时间到 30-60 分钟

(2) 若插入目的片段大于等于载体长度, 则建议目的片段: 载体用量为 1: 1

(3) 若插入片段为 50bp-150bp, 则建议目的片段: 载体用量为 5-15: 1

(4) 载体片段过长、插入片段过长或片段数过多, 克隆阳性率均会降低

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

II. 插入单片段, 最适片段用量 (ng) = 0.04 × 片段碱基对数;

插入多片段, 每片段最适用量 (ng) = 0.02 × 片段碱基对数。

D. 转化

1. 新鲜制备的或-80℃下保存的 50ul 或 100ul 感受态细胞，置于冰上，完全解冻后轻轻地将细胞均匀悬浮。
2. 加入 5-10ul 无缝克隆产物，轻轻混匀，冰上放置 30 分钟。
3. 42℃水浴 60 秒，冰上放置 5 分钟。
4. 加 500ul SOC 或 LB 培养基，37℃振荡培养 40~60 分钟（200rpm）。
5. 将菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上，倒置于 37℃过夜培养。

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>108CFU/μg 的感受态细胞；
- 2) 菌落数取决于 PCR 产物与线性化载体的数量和纯度；
- 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

E. 鉴定

- 1 PCR 鉴定：建议一端的引物用载体上的引物，另一端的引物用片段的引物，PCR 鉴定大小。
- 2 双酶切鉴定：用片段两头的酶切位点鉴定大小。
- 3 测序验证：送测序公司验证序列是否正确。

保存条件及有效期

运输条件：低温

储存条件：-20℃。

保质期：1 年