

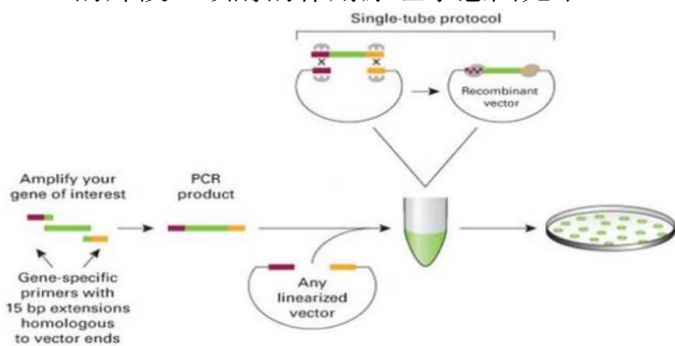
免费服务专线: 4000-855-868 网站: www.mdbio.com.cn 电子邮件: mdbio@mdbio.com.cn

产品名称&产品编码

产品名称: FuseIn 克隆重组酶
产品编码: F003

产品简介:

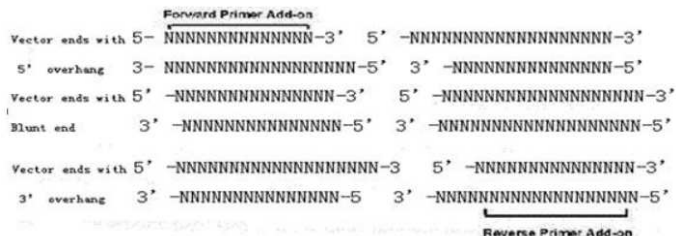
FuseIn Enzyme 专门为把 PCR 产物快速, 定向, 有效的克隆到任何目标载体而设计。有效的避免了在克隆过程中遇到的合适内切酶的选择, 磷酸化, 补平, 加 A, 使用中间载体等等一系列复杂步骤。无需连接酶, 只需要把目标载体线性化(平末端, 粘性末端都可以), PCR 产物无需任何酶促处理, 直接和目标载体混合, 20 分钟一站式解决所有问题。无需蓝白斑筛选, 无需担心克隆方向, 无须担心阳性克隆比率, 随意挑取克隆, 阳性率 >99%。使用本重组酶, 可以定向克隆 12kb 的片段。该酶的作用原理示意图见下:



操作步骤:

A. PCR 引物设计及片段准备:

用该克隆重组酶克隆目的基因或者目标 DNA 片段到制定的线性化载体, PCR 扩增的引物最外侧必须有 8-30 个碱基与线性载体最外侧完全配对。现就 5 个碱基配对举例如下:



注意:

可以采用任何聚合酶来得到 PCR 产物, 但是, 引物和引物二聚体会对 FuseIn 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。

适用范围:

1. PCRcloning into any vector
2. Long PCR DNA (up to 12kb) cloning
3. Gene transfer one vector to another
4. High-throughput (HTP) PCRcloning
5. In vitro joining of DNA fragments

B. 线性化载体的制备

载体的完全线性化对于重组实验至关重要, 没有线性化的载体会产生非常高的背景。线性化后的载体需要过柱纯化或者凝胶回收纯化。

C. 克隆重组反应的建立

线性化载体 (100-200ng/ul)	X ul
PCR 产物(100-200ng/ul)	Y ul
10* FuseIn buffer	2 ul
FuseIn 酶	1 ul
Deionized water	M ul
Total	20 ul

备注:

1) 室温 20-40 min, 立即转化或者 -20°C 低温冻存, 后续转化。

2) 环境温度不能超过 30℃, 25℃为最适反应温度。

3) 大片段可以适当延长反应时间或者增加酶量, 最长反应时间不能超过 1 小时。

D. 转化

1. 新鲜制备的或-70℃下保存的 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 10-12ul 连接液, 轻轻混匀, 冰上放置 30 分钟。

3. 42℃水浴 90 秒, 冰上放置 2 分钟。

4. 加 600ul SOC 培养基, 37℃ 250rpm 振荡培养 1 小时。

5. 室温下 4000rpm 离心 5 分钟, 用吸头吸掉 500ul 上清液, 用剩余的培养基将细胞悬浮。

6. 将细菌均匀细致得涂布在 90mm 平板上。

注: 细菌的用量依连接的效率及感受态细胞的感受率而进行适当调整。

7. 平板在 37℃下正向放置 1 小时后以吸附过多的液体, 然后倒置培养过夜。

疑难解析

问题	可能原因	解决办法
转化后克隆很少或者没有克隆	感受态细胞转化效率低	检测感受态细胞转化效率, 建议使用 $> 1 \times 10^8$ cfu/ug的细胞
	连接液过多	不要加超过10ul的连接液到100ul的细胞中, 太多连接液会抑制转化
	连接液中有抑制转化的成分	PCR产物和线性载体都需要经过纯化

	载体与片段比例失调	一般来讲, vector/insert 摩尔比为 1:1-5 比较合适。如果插入片段与载体大小接近, 二者比例也可以为1:1
大多数克隆里边没有插入片段	克隆载体没有完全线性化	凝胶纯化载体
	重组反应被含有相同抗性的质粒污染	PCR产物直接柱纯化会含有模板质粒, 建议凝胶电泳后, 切胶纯化

保存条件及有效期

运输条件: 低温

储存条件: -20℃。

保质期: 1 年