

【产品简介】

无缝克隆是一种简单、快速并且高效DNA定向克隆技术，可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。TOROIVD® One Step Fusion Cloning Mix通过识别DNA片段和线性化载体末端15-20bp同源序列，50°C反应5-60 min即可将DNA片段和线性化载体高效精确地融合在一起，完成定向克隆，且克隆阳性率可达95%以上。

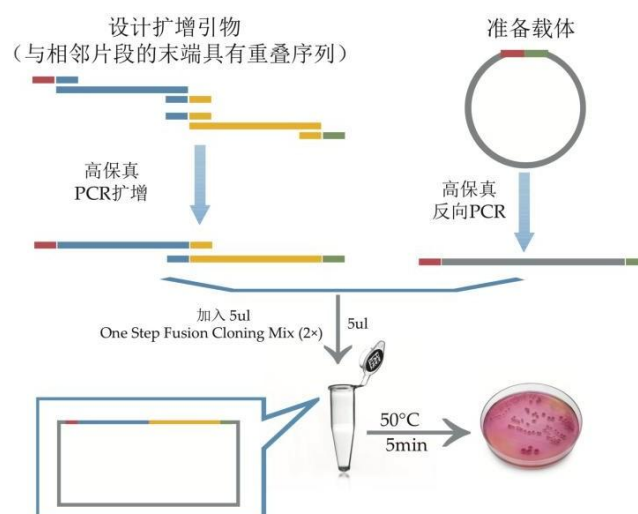
【产品组成】

TOROIVD® One Step Fusion Cloning Mix (FCM-050) 每次使用5μL可进行50次反应：

货号	品名	规格	数量
FCM-050	2×One Step Fusion Cloning Mix	250μL/管	1管/包

【产品特点】

1. 简单、快速、高效，可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点。
2. 无需连接酶，无载体自连，阳性率可达95%以上。
3. 无需考虑插入片段自身携带的酶切位点。
4. 一次反应可完成单至多个片段重组，最快仅需5min完成单片段DNA的重组。

【流程简图】**【储存条件】**

本试剂请在-20°C条件下保存。

【操作流程】**1. 制备线性化克隆载体**

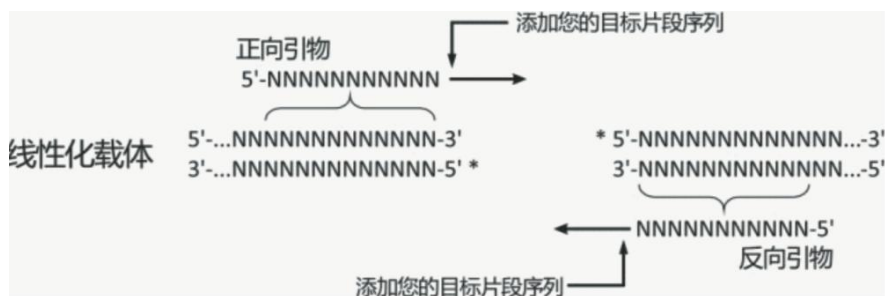
利用反向PCR扩增方法制备线性载体，为减少扩增突变的引入，推荐使用TOROIVD高保真PCR试剂盒2×TOROBlue® Flash KOD Dye Mix (Cat NO.:KAO-201) 进行扩增。

2. 设计插入片段 PCR 引物

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15-25nt（推荐18nt）序列。

插入片段正向扩增引物：5'-上游载体末端同源序列+基因特异性正向扩增序列-3'。

插入片段反向扩增引物：3'-基因特异性反向扩增序列+下游载体末端同源序列-5'。

**备注:**

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。

3. 插入片段的 PCR 扩增

利用以上设计的引物进行 PCR 扩增, 为减少扩增突变, 推荐使用高保真 PCR 试剂盒 2×TOROBlue® Flash KOD Dye Mix (Cat NO.:KAO-201) 进行扩增。

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, 可直接用于无缝克隆反应, 但加样的体积不宜超过反应总体积的 20%。

4. 无缝克隆反应

1. 冰上配制以下反应体系, 使用前瞬间离心, 避免试剂挂壁。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。

组分	反应体系
2×One Step Fusion Cloning Mix	5μL
线性化载体	50-200ng
插入片段	10-200ng
ddH ₂ O	补足到10μL

2. 将反应体系置于金属浴或水浴上, 50°C, 5-60 min, 冰上冷却后直接进行转化或储存于 -20°C。

备注:

1. 最适线性化载体用量(ng)=0.02×载体碱基对数, 即0.6μmol。
2. 最适片段用量(μmol)=3~7×线性化载体用量 (μmol)。
3. 如果插入单片段长度大于或接近载体长度, 那么线性载体与插入片段摩尔用量为1:1。
4. 推荐使用温度控制精准的加热恒温金属浴(Cat NO.: MD-MINI), 进行反应, 反应时间不足或过长都会降低克隆效率。
5. 插入的片段数为1-2个, 推荐反应时间为5-15 min。插入的片段数为3-5个, 推荐反应时间为15-30 min。
6. 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30-60min。
7. 50°C反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

5. 克隆产物转化

在100μL感受态细胞中加入5-10μL反应液, 轻柔吹吸混匀, 置于冰上30min。42°C热激45~60s, 冰浴5 min。加入500μL SOC或LB培养基, 37°C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°C培养箱培养过夜。

备注:

该转化过程仅适用于大肠杆菌宿主, 酵母宿主请使用电转化或参考文献中的转化方法。

6. 阳性克隆鉴定

挑取单菌落置于10μL的ddH₂O或TE Buffer中混匀，取1μL作模板加入PCR体系，进行菌落直接PCR鉴定。将PCR确认的过的阳性克隆单菌落接种到抗性培养基中培养过夜，提取质粒进行测序进一步确认。

【常见问题】

1. 转化效率低？

答：使用新制备或妥善保存的感受态细胞，按照说明书推荐的最适用量和比率配制反应体系，常用的吸光测量法易受DNA纯度、缓冲液pH值等因素影响，测定偏差较大，因此推荐使用琼脂糖电泳测定样品浓度；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ddH₂O中，切勿使用Tris-EDTA等缓冲液；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%。

2. 大量克隆不含插入片段？

答：酶切制备线性化载体时，提高限制性内切酶使用量，延长反应时间，或使用胶回收纯化酶切产物，所以我们建议用高保真PCR扩增线性化载体；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Dpn I (Cat NO.: DPN-050)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；确保正确的抗生素，并使用新鲜制备的抗生素平板。

3. 大量克隆含有不正确插入片段？

答：优化PCR体系，提高特异性，或胶回收纯化PCR产物。

【配套产品】

高速高保真PCR预混液

货号	名称	规格	厂家
KAO-201	2×TOROBlue® Flash KOD Dye Mix	50μL 反应 200 次	TOROIVD

限制性内切酶

货号	名称	规格	厂家
DPN-050	TOROBlue® Dpn I	20μL 反应 50 次	TOROIVD

质粒小提试剂盒

货号	名称	规格	厂家
PDE-100	Plasmid Extraction Mini Kit	100 次反应	TOROIVD

DNA片段回收试剂盒

货号	名称	规格	厂家
GCK-100	TOROGreen® GEL/ PCR Purification Kit	100 次反应	TOROIVD

【联系信息】



天罗诊断科技江苏有限公司

TOROIVD TECHNOLOGY COMPANY LIMITED.

总部地址：上海宝山区江杨南路 880 号新杨湾科创园 C1 栋

生产地址：江苏如东珠江路 888 号生命健康产业园 20 号楼

邮箱：market@toroivd.com

网址：www.toroivd.cn