

# Infusion 无缝克隆

Infusion 技术是一种简单、快速并且高效的 DNA 无缝克隆技术,其使用带有同源臂(15-20 bp)的 PCR 片段与线性化的载体之间的同源重组,可快速将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。本 Protocol 参照 Takara, 先实验室使用诺唯赞无缝克隆试剂盒

- 诺唯赞的 ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit (C115)
- Takara In-Fusion® HD Cloning Kit (121416)

1. 设计带有载体同源臂的 PCR 引物, PCR 扩增该基因并完成 PCR 产物的纯化
2. 根据公式计算重组反应所需 DNA 量, 线性化载体与插入片段的使用量具体计算如下:

• **入门克隆及单片段同源重组反应:**

最适克隆载体使用量 =  $[0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng}$  (0.03 pmol)

最适插入片段使用量 =  $[0.04 \times \text{插入片段碱基对数}] \text{ ng}$  (0.06 pmol)

• **多片段同源重组反应(2 - 5 个多片段):**

最适克隆载体使用量 =  $[0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng}$  (0.03 pmol)

每个片段的最适使用量 =  $[0.02 \times \text{每个片段碱基对数}] \text{ ng}$  (0.03 pmol)

! 为了确保加样的准确性, 在配制重组反应体系前可将线性化载体与插入片段适当稀释, 各组分加样量不低于 1  $\mu\text{L}$

3. 于冰上配制以下反应体系, 轻轻吸打混匀(请勿振荡混匀), 短暂离心将反应液收集至管底

组分	用量
线性化载体	0.03 pmol
n 个插入的线性化片段	0.06 pmol
H <sub>2</sub> O	补齐至 5 $\mu\text{L}$
2 × ClonExpress Mix	5 $\mu\text{L}$

4. 单片段重组反应, 50°C, 5 min, 后降至 4°C或立即置于冰上冷却  
多片段重组反应, 50°C, 15 min, 后降至 4°C或立即置于冰上冷却  
! 若载体和插入片段总体积大于 5  $\mu\text{L}$ , 可将反应体系放大至 20  $\mu\text{L}$   
! 单片段重组时, 当 DNA 总量为 300-400 ng 时, 可适当延长重组时间至 15min, 可提高重组效  
! 4-5 个多片段重组时, 适当延长重组时间至 30 min, 但最长不超过 1 h
5. 取 5-10  $\mu\text{L}$  重组产物加入到 100  $\mu\text{L}$  感受态细胞中进行转化 (不超过感受态总体积的 1/10)