

使用In-Fusion无缝克隆技术做诱变

- 同一个系统既能做无缝克隆，又能做诱变以实现碱基的删除、替换或插入
- 足够灵活，可兼容任意载体
- 正确率≥95%，性能有保障

通过使用In-Fusion Snap Assembly结合反向PCR这种体外快速扩增已知DNA序列两侧序列的方法 (Ochman et al. 1988)，就可以使诱变操作变得简单。在进行反向PCR时，引物在环状克隆载体上的方向相反 (图1)。使用In-Fusion做诱变，设计的引物5'末端要含有彼此重叠的15 bp序列以及加入的目标突变。实验时使用PrimeSTAR® Max高保真DNA聚合酶进行PCR，然后向线性化PCR产物中加入In-Fusion Snap Assembly Master Mix，再转化至Stellar™感受态细胞中。最终将有超过95%的机会得到期望的突变结构——无论是第一次实验还是之后的每次实验。

实验概述

1. 设计最终想要得到的结构体。选择想要修改的载体并设想最终的突变结构体 (图 1, 黄色表示突变)。
2. 设计引物。设计在 5' 末端有15 bp重叠序列的反向引物，同时包含所需的删除、替换或添加序列。诱变引物设计的具体指南参见下方。
3. 借助In-Fusion技术的力量。使用新设计的引物按照反向PCR的流程扩增载体。对PCR产物进行In-Fusion克隆，这时线性DNA将在15 bp重叠序列的位置重新环化，同时还将包含突变部分，再参照In-Fusion的操作流程转化Stellar感受态细胞。
4. 获得最终结构体。第二天从Stellar细胞中回收突变体。

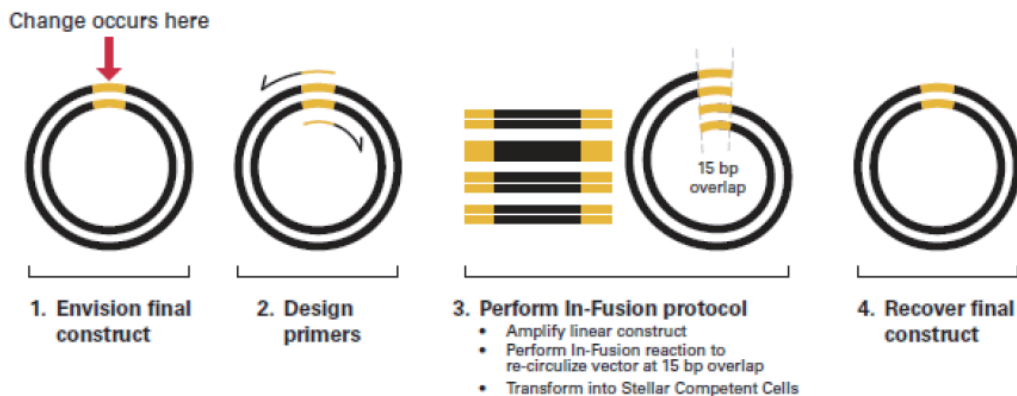


图 1. 使用In-Fusion技术进行诱变的过程。黄色表示发生突变的区域。实验设计完成后，在Day 1按照上述步骤3进行实验，在Day 2回收最终结构体 (上述步骤 4)。注意：虽然本文所有示例都属于蛋白质编码 (基因) 序列，但也可以使用相同的方法来修饰非编码序列，例如启动子或转录因子。

缺失诱变

引物设计是使用In-Fusion技术进行简单的缺失诱变的关键部分。想要删除克隆载体的某个区域，就必须设计5'末端有15 bp重叠序列的引物，并且不包含计划删除的碱基（图2）。

为了便于理解，将下图中载体骨架和引物的不同区域用不同颜色标记。黄色表示缺失位点，反向引物的重叠区域（粉红色和青绿色）跨越缺失位点。正向引物（青绿色和黑色）的结合位点位于克隆载体骨架上。两个引物在5'末端有15 bp重叠（青绿色的公共区域）序列。请注意，在实际引物序列中粉红色和青绿色区域之间没有间隙——两条引物均不包含缺失的序列。

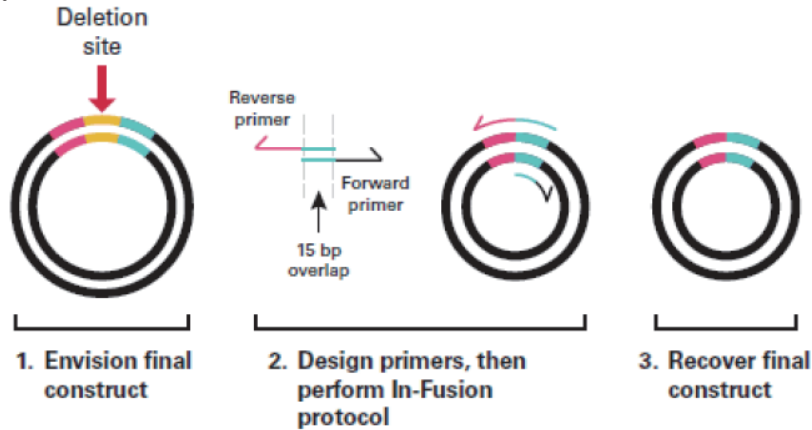


图2. In-Fusion应用于缺失诱变的引物设计。引物的设计旨在消除原始载体的一部分。

如果想要产生一系列C端缺失，只需设计一个正向引物，该引物在紧邻编码区下游的位置与克隆载体退火，保留终止密码子。然后设计一系列反向引物，这些引物与正向引物在5'末端有15 bp重叠序列，并跨越不同的将被删除的区域。在图3中，结构体A删除了蓝色区域，结构体B删除了蓝色和青绿色区域，结构体C删除了蓝色、青绿色和粉红色区域。

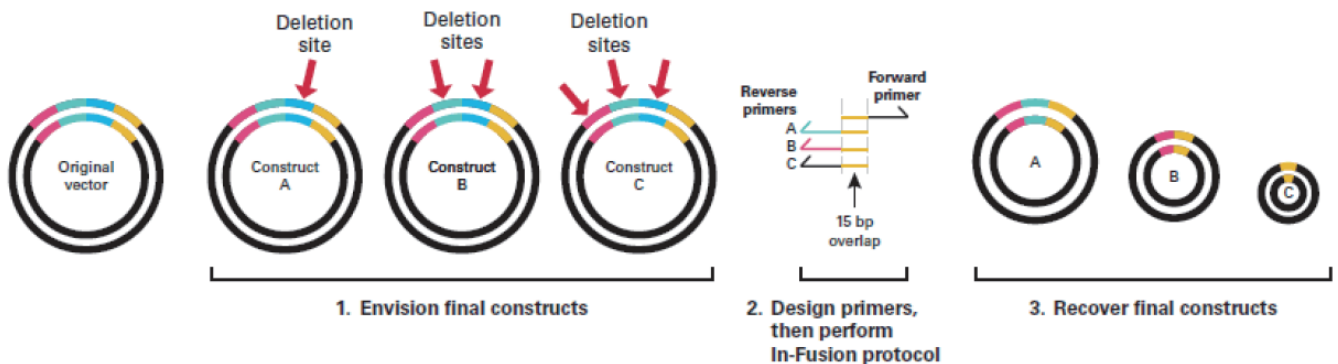


图3. In-Fusion引物设计以产生一系列C端截短的蛋白质。引物的设计旨在消除原始载体的一个或多个连续部分。

如果想要产生一系列N端缺失，请设计一个反向引物，该引物在紧邻编码区上游的位置（包括起始密码子）与克隆载体退火。然后设计一系列保留天然起始密码子的正向引物，且与反向引物在5'末端有15 bp重叠序列，3'端跨越不同的删除区，与保留的编码区退火。在图4中，结构体D删除了青绿色区域，结构体E删除了青绿色和蓝色区域。

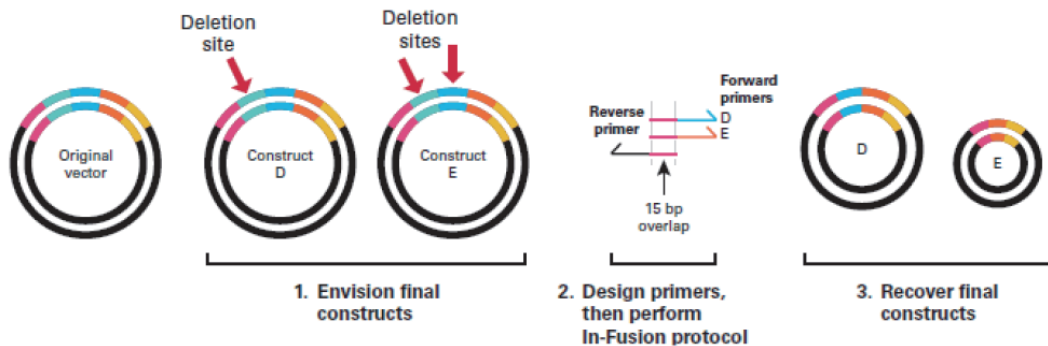


图4. In-Fusion引物设计以产生一系列N端截短的蛋白质。引物的设计旨在消除原始载体的一个或多个连续部分。

插入或替换

如果想要使用In-Fusion克隆技术插入碱基，只需在设计引物5'末端15 bp重叠序列的时候包含所需的插入序列（图5）即可。尽管只有5'末端的15个碱基需要重叠，但是根据插入片段的长度和序列不同，重叠序列的长度可能会超过15 bp。In-Fusion克隆反应后，额外添加到引物上的碱基将会被保留下来。

同样的，如果想更改结构体中的一个或多个碱基，设计包含15 bp重叠序列的引物，并将需要替换的序列包含其中（图5）即可。

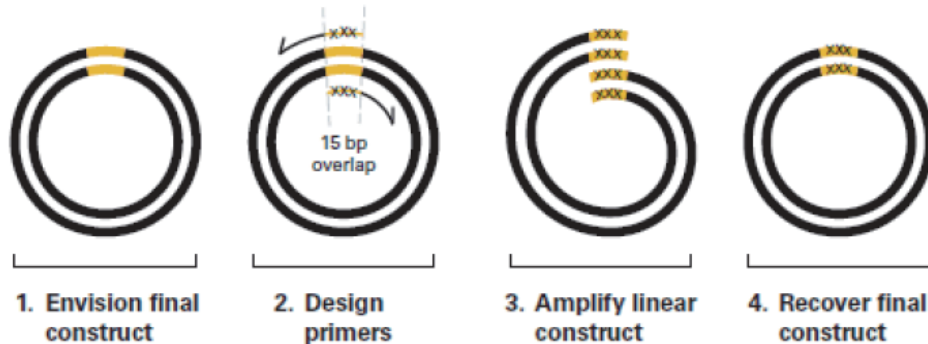


图5. In-Fusion引物设计以实现碱基的插入或替换。引物的设计旨在向原始载体中插入额外碱基或用不同的碱基（图中显示为X）替换现有碱基。

操作流程概述

更详细的In-Fusion Snap Assembly操作流程，请参考产品说明书。

1. 选择载体，确定诱变位点。
2. 参照以上指南设计PCR引物，牢记这几条通用的原则：
 - 引物长度应为18–25个碱基。如果做插入诱变可能需要更长的引物
 - 引物的GC含量应为40–60%
 - 引物的T_m值应为58–65°C，正向和反向引物的T_m差值应≤4°C

3. 准备PrimeSTAR Max DNA Polymerase预混液:

PrimeSTAR Max DNA Polymerase	12.5 μl
正向引物	200 – 300 nM
反向引物	200 – 300 nM
模板	0.1 – 5.0 ng
H ₂ O	根据需要
总体积	25 μl

4. 使用PrimeSTAR Max DNA Polymerase按如下程序进行反向PCR，线性化载体。

98°C	10 sec	30 – 35 cycles
55°C	5 或15 sec	
72°C	5 sec/kb	

5. 使用NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit胶纯化回收PCR产物（可选择Takara的柱式法胶回收试剂盒TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0〈Code No. 9762〉替代）。

6. 进行In-Fusion克隆反应：

含有诱变的线性化结构体	100 ng
In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2 μ l
H ₂ O	根据需要
总体积	10 μ l

7. 50°C孵育15 min。

8. 取2.5 μ l In-Fusion反应液转化Stellar感受态细胞。

9. 第二天，筛选突变体。操作者有 $\geq 95\%$ 的机会在第一时间回收得到预期的结构体。

相关产品

Code No.	产品名称	规格	说明
R045A	PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase	50 μ l反应 × 100 次	非常适合In-Fusion克隆实验的高保真PCR酶
R045B(A × 4)		50 μ l反应 × 400 次	
9762	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0	50 次	从琼脂糖凝胶中回收纯化DNA片段的高品质柱纯化试剂盒
638947	In-Fusion [®] Snap Assembly Master Mix	10 Rxns	In-Fusion克隆的核心组分，也是进行诱变的试剂
638948		50 Rxns	
638949		250 Rxns	
636763	Stellar Competent Cells	10 × 100 μ l	高转化效率的感受态细胞，特别适合大质粒的转化，In-Fusion的黄金搭档
9128	<i>E.coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μ l × 10 支)	高转化效率的感受态细胞，Stellar感受态细胞的平价替代

参考文献

Ochman H., Gerber, A. S., Hartl D. L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**(3):621 – 623 (1988).

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<https://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用，其他地区客户请咨询当地代理商。
- 本宣传页上记载的产品信息是2021年8月1日的信息，最新信息请参考公司官网。

Ver.1 2021年8月制作