In-Fusion克隆常见问答

Q1. In-Fusion酶作用机理是什么?
A1. 根据In-Fusion酶特殊的性质，插入片段和载体在同源序列（15个碱基）处融合。这与一般的同源重组是有差异的，因此克隆不再有位置和空间的限制。

Q2. 同源序列只能附加15 bp吗?
A2. 经过验证，同源序列少于12个碱基或者多于20个碱基克隆效率都会明显降低。因此推荐附加15 bp同源碱基序列。

Q3. 如何选择PCR酶?
A3. 使用任何PCR酶均可。

Q4. 载体和插入的DNA片段末端结构有限制吗?
A4. 没有特别的限制。无论是平滑末端、粘性末端或者末端有无A尾均可进行有效的连接反应。

Q5. 载体和插入的DNA片段的长度有限制吗?
A5. 没有特别的限制。载体和插入的DNA片段即使超过10 kb也可以进行连接反应，只是连接效率会有所降低。插入的DNA片段只要不少于50 bp就可进行有效的连接反应。

Q6. 线性化载体末端是否需要进行去磷酸化处理?
A6. 线性化载体末端磷酸基团的存在与否不会影响In-Fusion连接效率。因此，不需要对线性化载体进行去磷酸化处理。

Q7. 使用In-Fusion是否需要获得专利许可?
A7. 如果盈利单位是用于基础研究，不需要取得专利许可。目前本试剂盒已经受到很多企业和研究人员的青睐。

〈In-Fusion® HD Cloning Kit 产品目录〉

In-Fusion克隆选择

制品名称	Code No.	In-Fusion HD附带制品			
		纯化用试剂	纯化用Column	高效感受态细胞	高保真PCR酶
		Cloning Enhancer	NucleoSpin	Stellar™ Competent Cell	CloneAmp™ HiFi PCR Premix
In-Fusion® HD Cloning Kit	639648/49/50	–	–	–	–
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer	639633/34/35	✓	–	–	–
In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin	639639/40/41	–	✓	–	–
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Competent Cells	639642/43/44	–	–	✓	–
In-Fusion® HD Cloning Plus	638909/10/11/20	–	✓	✓	✓
In-Fusion® HD Cloning Plus CE	638916/17/18/19	✓	–	✓	✓
In-Fusion® HD Cloning System	639645/46/47/92	–	✓	✓	–
In-Fusion® HD Cloning System CE	639636/37/38/93	✓	–	✓	–

* In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit是一种冻干型（可在室温、干燥器内保存）的In-Fusion HD试剂盒。已分装于microtube中，可立即使用。还有24次量型（8联管×3）和96次量型（96孔板）。

★ 如果您想了解更多相关信息，请登录www.clontech.com进行查询。 该系列产品已取得美国专利（专利号：7,575,860）和欧洲专利（专利号：EP1741787）。

・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。
・专利许可及注册商标信息请在网站上确认：http://www.clontech.com/。
・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。

宝日医生物技术（北京）有限公司
Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.
技术咨询电话：4006518761 4006518769
E-mail：service@takarabiomed.com.cn

Ver.5 2017年3月制作

新一代基因克隆试剂

In-Fusion® HD Cloning Kit

- 设计随心而动：在任意载体任意位点插入任意基因片段
- 真实的表达：依据15 bp同源序列实现无缝克隆，消除冗余碱基
- 不只是简单的克隆：单片段插入，多片段克隆，定点突变

that's GOOD science!™

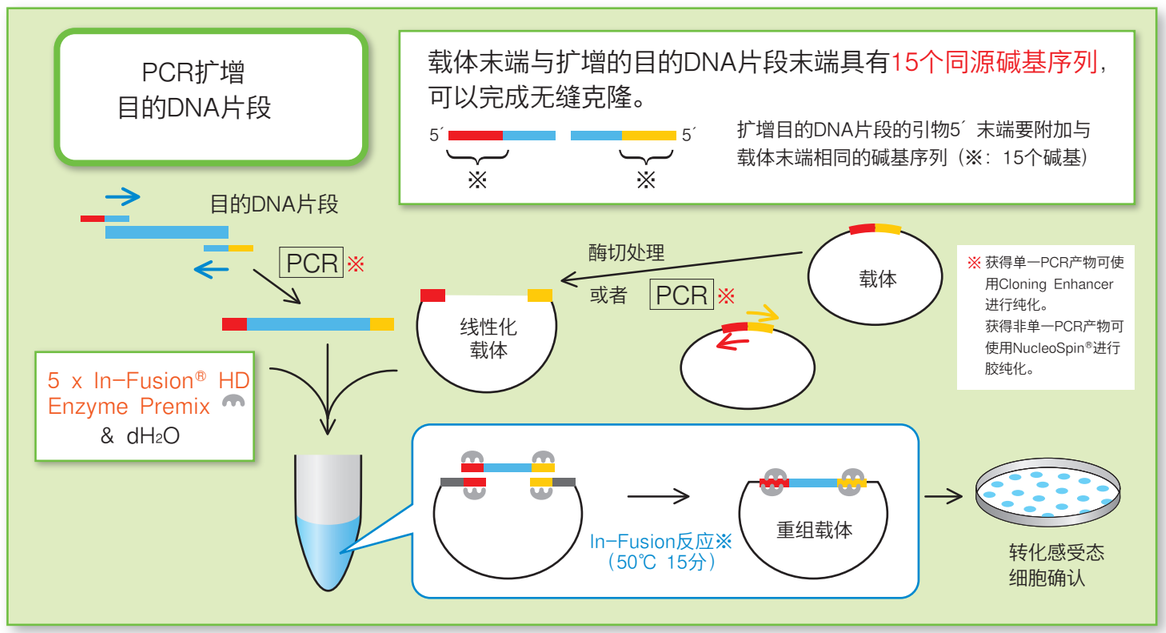
In-Fusion® HD Cloning Kit
更先进更有效的基因克隆技术

In-Fusion克隆技术凭借插入的目的DNA片段与载体末端的15个同源碱基序列就可以完成目的基因的定向克隆，操作简单快速。In-Fusion HD 采用5×预混合酶试剂，大大缩短了反应时间，让您轻松操作。

不受限制性内切酶酶切位点的限制	In-Fusion不受限制性内切酶酶切位点的限制，可以通过PCR方法实现载体线性化，自由地克隆基因。
不附加任何多余序列	In-Fusion克隆不附加多余序列，实现完美的无缝克隆，是构建表达载体的理想选择。
In-Fusion反应仅需15分钟 快速!	传统的In-Fusion反应时间为30分（37℃ 15分 ＋ 50℃ 15分），而In-Fusion HD只需50℃ 15分即可完成。
更加简便的操作流程 简便!	只需将纯化后的目的片段和线性化载体与5×预混合酶试剂相混合即可，使用更加简便。
高效的克隆技术	In-Fusion克隆无需进行亚克隆的繁琐操作，可以实现更高效的基因克隆。
可同时克隆两个或多个DNA片段	In-Fusion无需特定载体和宿主细胞，便可同时完成两个或多个片段的定向克隆，最长可以克隆15 kb的片段。

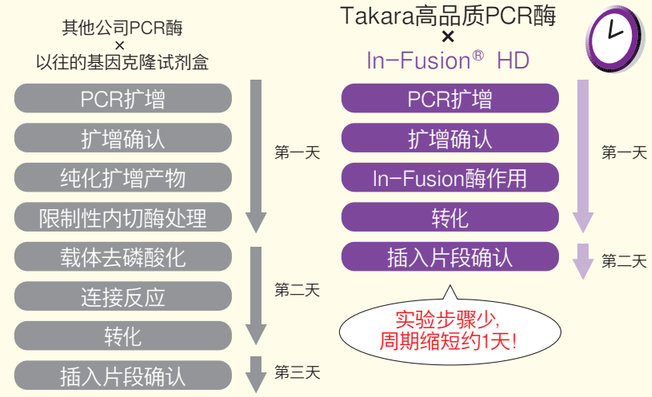
In-Fusion基因克隆方法概述

※ In-Fusion引物设计，您可以利用In-Fusion Primer Design Tool在线支持工具。



※注：EcoDry™冻干粉形式反应时间为37℃15分＋50℃15分。

Takara高品质PCR酶与In-Fusion® HD Cloning Kit配套使用，可以实现更快速的基因克隆。

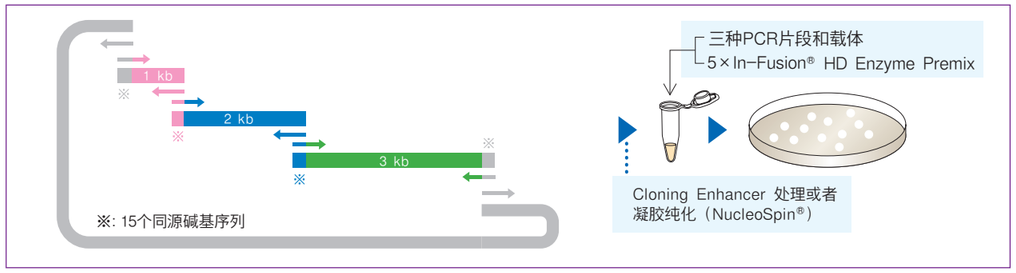


目的DNA片段无需经过限制性内酶酶切处理，在In-Fusion酶作用下便可直接定向克隆到载体中。将PCR扩增得到的目的DNA片段和线性化载体相混合，加入In-Fusion酶孵育（15分钟），便可完成目的DNA片段的定向克隆，In-Fusion反应液无需稀释可直接转化大肠杆菌。※

※ 通过限制性内切酶酶切获得线性化载体，无须进行去磷酸化处理。

实例：多个DNA片段（1 kb，2 kb，3 kb）同时克隆

【方法】 使用Takara高品质PCR酶分别扩增1 kb、2 kb、3 kb的目的DNA片段和2.7 kb的载体，并将扩增产物混合，使用In-Fusion® HD试剂盒完成克隆。利用高效率的感受态细胞Stellar™ Competent Cells（产品编号：636763）转化并进行蓝/白斑筛选。



【结果】
随机挑选10个克隆进行菌落PCR验证，其中7个克隆正确插入了目的片段（1 kb+2 kb+3 kb）。

插入片段长度	克隆数（1/5涂菌量）	阳性克隆数
1 kb+2 kb+3 kb	192	7/10

Cloning Enhancer用于在In-Fusion连接反应之前对PCR产物进行预处理!

无需对PCR产物进行纯化，避免了纯化过程造成的样品损失。

- 通过限制性内切酶酶切实现载体线性化：
  →在PCR反应液中加入Cloning Enhancer孵育37℃ 15分＋80℃ 15分
- 通过PCR扩增实现载体线性化：
  →Cloning Enhancer处理和In-Fusion连接反应在同一个反应管中同时进行，孵育37℃ 15分＋50℃ 15分

In-Fusion 基因克隆技术已经广泛应用于企业和研究机构!

■ **CRISPR系统，In-Fusion® HD Cloning Kit用于Cas9表达载体构建的应用实例**
CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes
Gilbert LA. *et al.*, *Cell*, (2013) Jul 18; **154**(2):442-451.

■ **高通量4分子分析，In-Fusion® HD Cloning Kit用于质粒库构建的应用实例**
High-throughput tetrad analysis.
Ludlow CL. *et al.*, *Nat Methods*, (2013) Jul; **10**(7):671-675

★登陆我们的网站查询其他相关文献。