

In-Fusion高效率无缝克隆

成功克隆解读

简易的操作流程，低失误率的高效率克隆，Takara为您推荐：
梦幻般的克隆试剂盒——In-Fusion[®]，助您轻松完成克隆实验。

— Contents —

消除您对In-Fusion[®]的误解

- In-Fusion[®]原理复杂吗，操作简单吗？ P. 2
- In-Fusion[®]克隆比其他方法更贵吗？ P. 3
- In-Fusion[®]克隆效率高吗？ P. 4
- 谁在用In-Fusion[®]？做了什么实验？ P. 5-7



- In-Fusion克隆原理及优势 P. 2
- 连接酶的高效率高准确度替代方法 P. 3
- In-Fusion与同类试剂盒比较 P. 4
- 应用例：克服慢病毒载体酶切位点的限制 P. 5
- 应用例：利用In-Fusion插入小的融合蛋白质标签 P. 6
- 应用例：使用In-Fusion构建基因编辑载体 P. 7
- 应用例：使用In-Fusion克隆4个插入片段 P. 7

问题 1 In-Fusion®原理复杂吗，操作简单吗？

真相

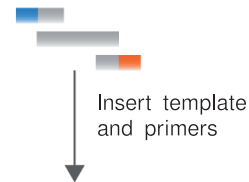
In-Fusion®依靠载体末端和插入片段末端的同源序列完成无缝克隆。

- ① 在载体的插入位点，可以通过限制酶酶切或反向PCR的方法，将载体线性化。
- ② 将线性化载体末端的15 bp序列，添加到插入片段的PCR引物5'端，PCR后即可得到末端和载体同源的插入片段。
- ③ 在In-Fusion酶的作用下，15 min即完成克隆。反应液转化到大肠杆菌，第二天即可进行阳性菌落验证。

In-Fusion克隆原理

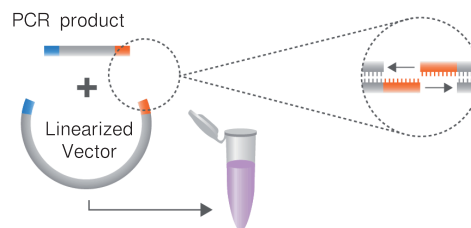
1 PCR扩增

带有与载体末端15 bp同源的插入片段



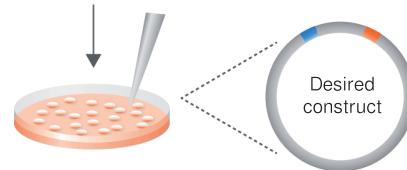
2 混合

In-Fusion酶、线性载体、PCR产物在同一tube中，15 min反应*



3 转化

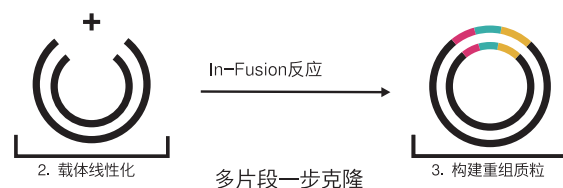
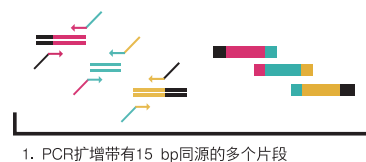
感受态细胞，在选择培养基上涂板。



*液态In-Fusion酶反应时间15 min，EcoDry系列反应时间30 min。

In-Fusion克隆的优势

- **反应快速**，比传统连接酶方法节省约1天的时间。
- Takara提供在线**In-Fusion引物设计工具**，轻松设计带同源臂的In-Fusion克隆专用引物。
- 载体类型不受限制，慢病毒、腺病毒、逆转录病毒载体等均可使用。
- 插入位点如果没有合适的酶切位点，可以通过反向PCR进行载体线性化，**不受酶切位点的限制**。
- 使用In-Fusion可以进行单片段插入、多片段插入、定点突变、片段删除或替换等。
- **高效率和高准确性**，减少反复构建载体、亚克隆、筛选阳性菌落等所需的时间、试剂、人力成本。
- 已被广泛应用于慢病毒载体的构建、CRISPR/Cas9相关载体的构建、抗体工程研究中的高通量克隆、大的表达质粒的构建、插入小的融合蛋白质标签等。



问题 2 In-Fusion®克隆比其他方法更贵吗?

真相

- 使用TA克隆或TOPO TA克隆方法，需要购买T载体。
- 使用限制酶酶切后进行粘性末端连接的方法，克隆效率低，需要反复操作。
- 如果选择了质量和性能没有保证的试剂，成功率低，浪费精力，浪费试剂，浪费时间。
- 亚克隆、多片段克隆、高通量克隆，无需多次克隆，In-Fusion一步实现。

In-Fusion Cloning: 连接酶的高效率高准确度替代方法

【数据提供】

研究1: Ti-yu Lin, Graduate Student, Univ. of Wisconsin-Madison

研究2: Madhusudan Rajendran, Research Assistant, Univ. of Wisconsin-Madison

【实验简介】

在下面这些研究中，In-Fusion Cloning被用于传统连接酶方法不成功的克隆实验。两个实验都使用了pET载体，这是一种常用的体内重组蛋白质表达系统。当使用连接酶时，两位研究人员都无法克隆获得想要的片段：Ti-yu Lin的目的片段为~1 kb 并高GC含量（67% GC），Madhusudan Rajendran使用编码novobiocin抗性的大插入片段（gyrase B; 2.4 kb）。

使用In-Fusion克隆，两位科学家都能够有效地将其片段克隆到限制酶消化的线性化载体中，通过菌落PCR筛选确定阳性克隆。虽然每个项目的具体细节都有不同的挑战，但结果是相同的：In-Fusion技术在第一次尝试时就产生了阳性克隆，并且手动操作时间很短。

【实验结果】

PCR扩增目的片段显示了两个正确大小的单一条带（图1），将这些片段克隆到它们各自的目的载体中（图2），随后通过菌落PCR分析。对于研究1，由In-Fusion克隆方法产生的10个菌落中的8个是阳性克隆。对于研究2，32个筛选的菌落中有21个是阳性克隆。在这两种情况下，研究人员都能够成功地将目的基因进行克隆。

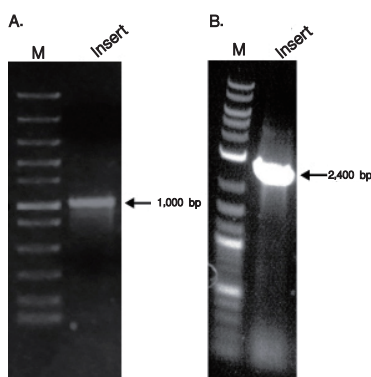


图1. 目的片段的PCR扩增。使用CloneAmp HiFi PCR Premix从基因组DNA模板扩增目的基因。PCR引物将In-Fusion Cloning重叠序列引入到PCR产物的5'和3'末端。（图A）研究1，插入片段~1 kb。（图B）研究2，插入片段2.4 kb。

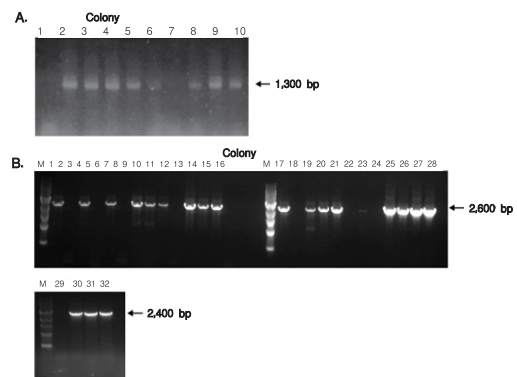


图2. 菌落筛选。菌落PCR用于确定阳性克隆。（图A）在研究1中，检测的10个菌落中有8个显示~1.3 kb的条带，为阳性克隆。（图B）在研究2中，检测的32个菌落中的21个显示~2.6 kb的条带，为阳性克隆。

【结论】

先前基于连接酶方法的克隆工作未能产生令人满意的结果，但使用In-Fusion HD Cloning Plus后，两个独立的项目都得到了阳性克隆。在每次尝试中，两位研究人员都能够成功地将具有挑战性的插入片段克隆到pET表达载体中。

问题 3 In-Fusion®克隆效率高吗？

真相

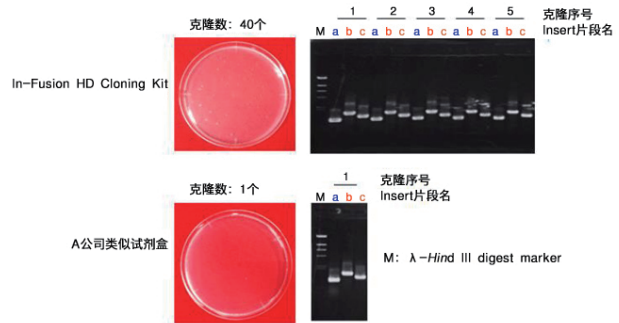
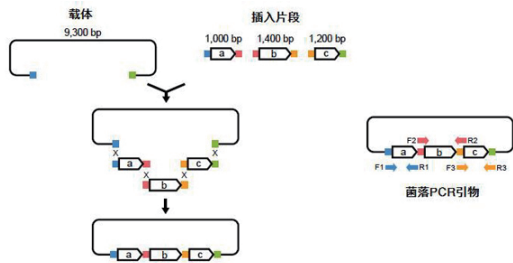
In-Fusion®克隆得到的菌落数、阳性克隆率要远高于连接酶方法。
Takara的比较数据和来自于客户自己的实验结果也显示，无论单片段克隆，还是多片段克隆，In-Fusion®克隆的效率都要高于类似无缝克隆产品。
下面，我们用事实说话。

In-Fusion Cloning 与同类试剂盒比较

【数据提供】 京都府立大学研究院 植物病理学研究室 久保先生、深田先生

【实验内容】

使用In-Fusion HD Cloning Kit (Code No. 639648) 及A公司相似试剂盒，向9,300 bp的载体中插入大小分别为1,000 bp、1,400 bp、1,200 bp的3个片段，重组载体大小为12,900 bp。感受态细胞均使用Clontech的Stellar Competent Cells (Code No. 636763)。



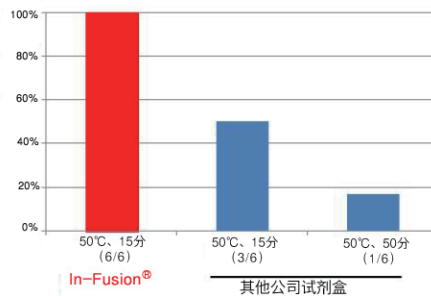
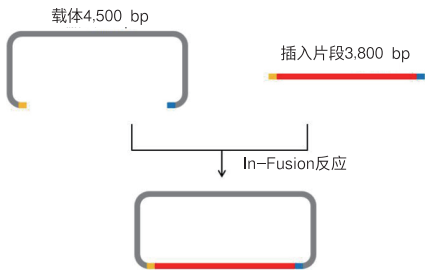
【实验结果】

使用In-Fusion HD Cloning Kit时，出现40个克隆。取其中10个克隆进行菌落PCR筛选后确认，全部克隆中的3个片段均正确插入。另外，使用A公司类似试剂盒时，出现1个克隆，进行菌落PCR后结果确认，3个片段均正确插入。

【数据提供】 九州大学研究院医学研究院 应用干细胞医科学部门 应用干细胞医科学讲座浜崎先生

【实验内容】

使用In-Fusion HD Cloning Kit及其他公司同类型试剂盒，在4,500 bp线性化载体中插入3,800 bp的片段后，进行菌落PCR确认。In-Fusion HD Cloning Kit推荐反应时间为15分钟。其他公司同类型试剂盒推荐反应时间15~60分钟，选择15分钟、50分钟分别进行反应。



使用In-Fusion试剂盒的克隆数多于其他公司试剂盒。在各反应条件下，取6个克隆进行菌落PCR筛选确认，In-Fusion试剂盒可100%获得目的克隆，其他公司试剂盒的目的克隆获取率为50%以下。

【实验结果】

使用In-Fusion HD Cloning Kit时，出现40个克隆。取其中10个克隆进行菌落PCR筛选后确认，全部克隆中的3个片段均正确插入。另外，使用A公司类似试剂盒时，出现1个克隆，进行菌落PCR后结果确认，3个片段均正确插入。

■ 出现的转化克隆数

	In-Fusion HD Cloning	其他公司试剂盒	
反应条件	50°C、15分钟	50°C、15分钟	50°C、50分钟
出现的克隆数	169	56	60

问题 4 谁在用In-Fusion®? 做了什么实验?

真相

In-Fusion以众所周知的高效率、高准确率，已经被世界各地的实验室广泛应用于慢病毒载体的构建、高通量抗体筛选、CRISPR系统中Cas9表达载体的构建等应用，已经有大量的文章发表在高影响因子期刊上。

- Optimizing EphA2-CAR T Cells for the Adoptive Immunotherapy of Glioma. Yi Z., et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* (2018) Feb 2;9:70-80.
- CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Gilbert LA et al., *Cell*, (2013) Jul 18; 154(2):442-451.
- High-throughput tetrad analysis. Ludlow CL. et al., *Nat Methods.* (2013) Jul; 10(7):671-675
- Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. Kondo T et al., *Nature* (2013) Feb 7; 494(7435):125-129

In-Fusion Cloning: 克服慢病毒载体酶切位点的限制

【数据提供】 Jun Yang Instructor, University of Texas Medical Branch

【客户心得】

“我现在的课题完全没有使用连接酶的克隆方法，但尝试使用In-Fusion之前做过很多连接酶方法的克隆实验。二者的主要区别在于传统方法需要的TA克隆、转化、纯化、消化、连接等步骤，至少要增加3个工作日的时间。通常我们每个实验需要筛选至少9个克隆，In-Fusion克隆可以达到70-80%的阳性率，所以In-Fusion方法是一个非常方便、可靠和快速的方法”。

【实验简介】

在本实验中，使用了In-Fusion Cloning克隆了5个PCR片段到一个慢病毒载体上，用于真核表达。这个载体只有一个可用于亚克隆的酶切位点，所以使用传统PCR连接酶的克隆方法非常困难且耗费时间，而In-Fusion方法使消除这些局限性成为可能。使用高保真酶扩增每个插入片段后直接插入到慢病毒载体上，通过限制酶酶切消化来确认阳性克隆。3天就得到最终的载体，每天仅需2-3小时的动手操作时间。

【实验结果】

5个从~400 bp 到1.6 kb大小不等的片段，经PCR扩增后带有了特异的5'和3'末端，分别克隆到约8 kb的慢病毒载体上。每个PCR反应都得到了特异性很好很亮的单一条带，通过In-Fusion克隆将目的片段克隆到线性载体，并转化到试剂盒自带的高效率Stellar感受态细胞中。通过酶切筛选3-5个克隆确认得到阳性菌落（图1）。

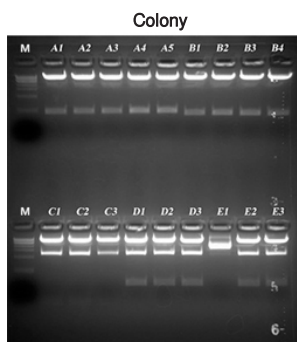


图1. 酶切确认阳性克隆。通过 *Xba*I/*Eco*R I酶切消化筛选克隆子，结果显示，筛选了5个独立的克隆实验的18个克隆子，仅有一个为阴性克隆（E1）。

【结论】

利用In-Fusion Cloning 以接近100%的成功率构建了五个阳性慢病毒克隆。无需为每个插入片段修改PCR条件，可以高效率地直接克隆到大载体上。克隆位点可根据实验需要选择，不再受到限制酶酶切位点的限制。仅需筛选很少的菌落即可得到阳性菌落，说明In-Fusion准确率是很高的。在三天内就完成了载体的构建，每天仅需要2-3小时动手操作时间。

利用In-Fusion Cloning插入小的融合蛋白质标签

【数据提供】 Fabio Antenucci Post-doctoral research fellow, Veterinary Clinical Microbiology, University of Copenhagen

【实验简介】

融合蛋白质标签是小的肽链，可以用于检测、纯化、确认目的蛋白质。为了生成标签蛋白质，需要通过基因工程将标签蛋白质的序列插入到目的蛋白质序列前，这样通过表达重组蛋白质来获得顺式标签。

标签重组蛋白质的设计通常需要依赖限制酶的传统克隆方法。这个方法需要一个供体模板来扩增所选择的标签序列和多个克隆实验步骤。而不依赖限制酶的克隆方法的出现大大地简化了这个流程，让小标签重组蛋白质的基因操作在一步反应中就可以完成，且标签序列不需要模板。

本实验例中，使用了In-Fusion HD Cloning Plus构建了包含来自两个不同模板蛋白质结构域的重组嵌合体，并从头插入了融合标签A-4 (Zhou et al. 2008; Figure 1)。

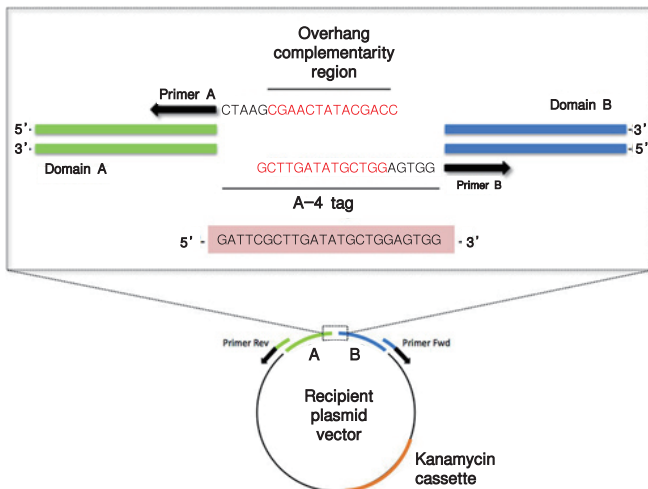


图1. 实验例中重组载体构建的原理图。红色字母表示引物A和引物B的5'端互补区域。A-4标签的全序列在粉色框中突出显示。

【实验结果】

目标序列的高效率插入且未检测到脱靶效应

为了构建图1中的重组载体（图1），设计了三对PCR引物，用于生成带有重叠部分的扩增子并后续测序（图2）。挑取了3个包含插入片段的克隆，并检测图2标出的目标序列的整合、突变、基因重排的情况。测序结果证明了三个克隆均整合了目标重组开放阅读框A-A4-B，并没有突变和基因重排的情况。

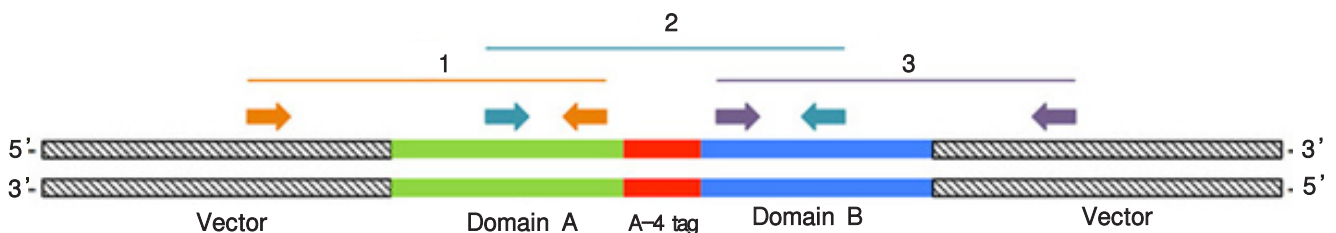


图2. 用于确认重组载体上正确开放阅读框的测序策略。设计了三对引物，用于生成测序用的三个重叠扩增子，进一步确认结构域A和B处于A-4标签的两端的正确顺序。

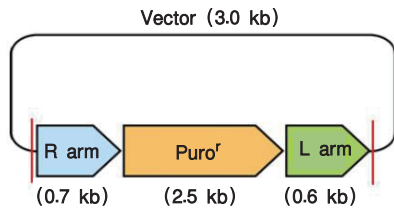
【结论】

构建标签融合蛋白质是比较耗费时间的工作，需要按顺序进行多个亚克隆步骤来向每个载体插入目标片段。而用In-Fusion Cloning获得了100%的相对效率（3/3阳性克隆），证明了In-Fusion Cloning方法确实是一步法克隆插入小融合标签的快速有效的方法。

使用In-Fusion Cloning System构建基因编辑敲除用供体载体

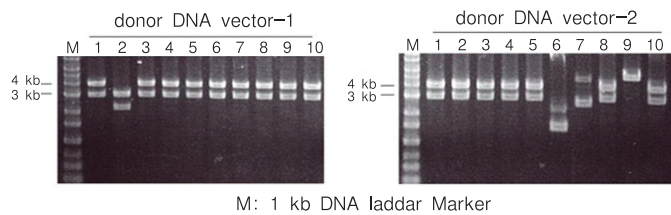
【数据提供】

九州大学研究院医学研究院 癌分子病态学讲座 饭森 真人先生（助教）新美 晋一郎先生（研究员）



【实验内容】

使用In-Fusion HD Cloning Kit, 对3.0 kb载体中的Puromycin抗性基因cassette (2.5 kb)、CRISPR/Cas9切断部位的Right及Left arm (分别为0.7/0.6 kb) 3个插入片段进行克隆。图中红线显示部位的限制酶切断位点。



【实验结果】

用X-Gal/IPTG进行蓝白筛选, 从得到的大量克隆中挑取10个白色克隆, 通过限制酶及测序确认位点时, 根据载体种类的不同, 载体1及载体2分别以9/10及7/10的高效率获得目的重组载体 (红色序号列)。

利用In-Fusion 方法进行4个插入片段与载体的多片段克隆

【数据提供】

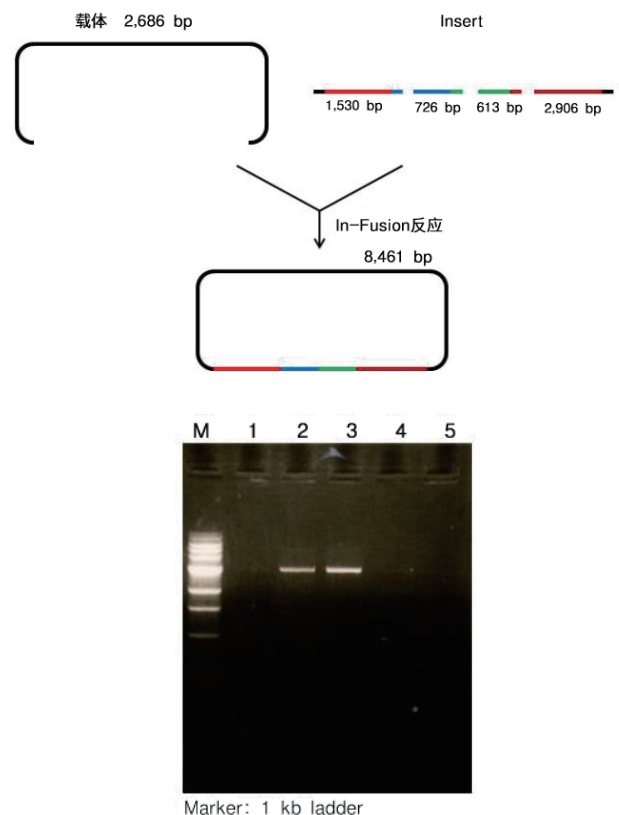
东京大学 农学生命科学研究科 河内先生

【实验内容】

使用 *Bam* H I 将pUC19 DNA (Code No. 3219) 切断, 使用In-Fusion HD Cloning Kit (Code No. 639648) 同时对1,530 bp、726 bp、613 bp、2,906 bp的4个片段进行克隆。

【实验结果】

在出现的约100个克隆中, 挑取5个进行菌落PCR, 确认其中2个为插入片段按正确方向插入的阳性克隆。





使用PCR进行In-Fusion克隆，**无需使用限制酶或连接试剂盒**进行切割和粘贴。

此外，**不需要专用载体**，您可以使用自己的载体，可以**克隆载体上任意的位点**，并且不会添加额外的序列。

因此，In-Fusion克隆**简单，方便，快捷！**



快使用In-Fusion®进行快速、高效和准确的克隆吧！

In-Fusion产品列表

产品名称	Code No.	In-Fusion克隆选择			
		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）。



※ 请登录www.takarabiomed.com.cn首页最下方，使用升级版

In-Fusion引物设计工具。

注：文中涉及实验数据均引用自Takara Bio Inc.和Takara Bio USA, Inc.

- 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：<http://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。
- 本宣传页上登载的产品信息是2019年8月1日的信息，最新信息请参考公司官网。

Ver.1 2019年8月印刷 5K



宝日生物技术有限公司

技术咨询电话: 4006518761 4006518769
E-mail: service@takarabiomed.com.cn