

# In-Fusion 操作流程



Step 1 线性载体构建

Step 2 设计基因特异性引物:  
与载体末端带有15 bp同源序列   
在线引物设计工具

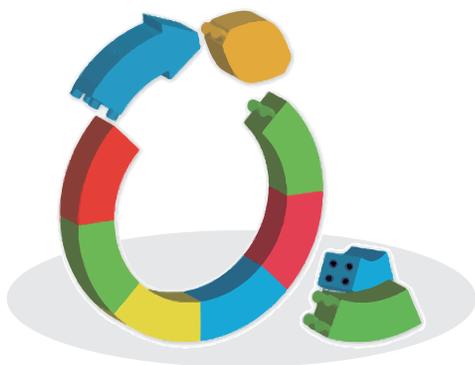
Step 3 PCR扩增目的基因

Step 4 获得PCR产物

Step 5 向5  $\mu$ l PCR产物中加入  
2  $\mu$ l Cloning Enhancer,  
37 $^{\circ}$ C保温15分钟,  
80 $^{\circ}$ C加热15分钟。

OR

离心柱纯化



窘时，它是救兵；  
忙时，它是帮手。

Step 6 配制In-Fusion  
克隆反应体系   
2  $\mu$ l 5 $\times$ In-Fusion Enzyme Premix  
x  $\mu$ l Linearized Vector  
x  $\mu$ l Insert  
x  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O  
10  $\mu$ l Total Volume

Step 7 克隆反应,  
50 $^{\circ}$ C孵育15分钟

Step 8 反应液转化感受态大肠杆菌

Step 9 阳性克隆筛选

# In-Fusion反应体系

组分	加入量	负对照	pUC19阳性对照
Purified PCR fragment	10–200 ng*	–	2 µl of 2 kb control insert
Linearized vector	50–200 ng**	1 µl	1 µl of pUC19 control vector
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µl	2 µl	2 µl
Deionized water	to 10 µl	to 10 µl	to 10 µl
*<0.5 kb: 10–50 ng,      0.5–10 kb: 50–100 ng,      >10 kb: 50–200 ng			
**<10 kb: 50–100 ng,      >10 kb: 50–200 ng			

## In-Fusion Mini Protocol

### 1. 建立 In-Fusion克隆反应体系:

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µl
Linearized Vector	x µl*
Purified PCR Fragment	x µl*
dH <sub>2</sub> O(as needed)	x µl
Total Volume	10 µl

\*对于载体和PCR插入片段反应体系较大时(载体+插入片段> 7 µl), 预混合酶用量加倍, 并补加dH<sub>2</sub>O至总体积为20 µl。

2. 补加去离子水至总体积10 µl并混合均匀。

3. 将反应体系置于50°C孵育15 min, 然后置于冰上。

4. 接下来进行转化流程, 您也可以将克隆反应液储存于-20°C直至完成准备工作。

- 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本公司网站上确认: <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.

地址: 北京市昌平区科学园路22号(中关村生命科学园内)(P.C.102206)

电话: 010-80720985, 80720986

传真: 010-80720989

E-mail: [service@takarabiomed.com.cn](mailto:service@takarabiomed.com.cn)

Ver.3 2017年3月制作

