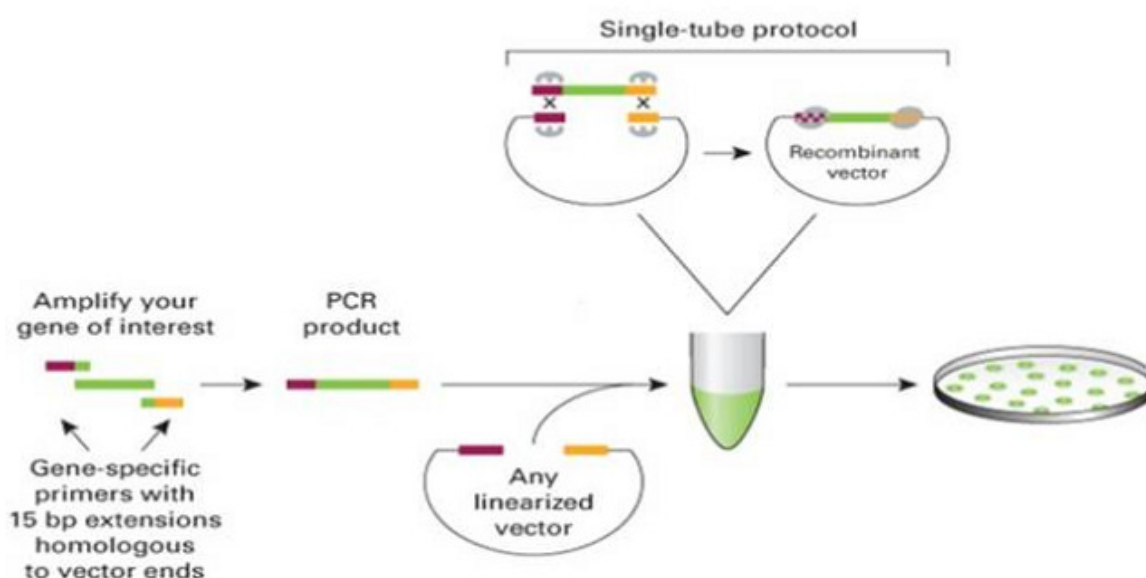


EZfusion 同源重组酶

产品编号	产品名称	规格	目录价 (元)
GR6085	EZfusion 同源重组酶	20 次	900
GR6086	EZfusion 同源重组酶	50 次	1750
GR6088	EZfusion 同源重组酶	100 次	3000

上海捷瑞生物工程有限公司 EZfusion Enzyme 专门为把 PCR 产物快速、定向、有效的克隆到任何目标载体而设计。有效的避免了在克隆过程中遇到的合适内切酶的选择、磷酸化、补平、加 A、使用中间载体等等一系列复杂步骤。无需连接酶，只需要把目标载体线性化(平末端，粘性末端都可以)，PCR 产物无需任何酶促处理，直接和目标载体混合，20-30 分钟一站式解决所有问题。

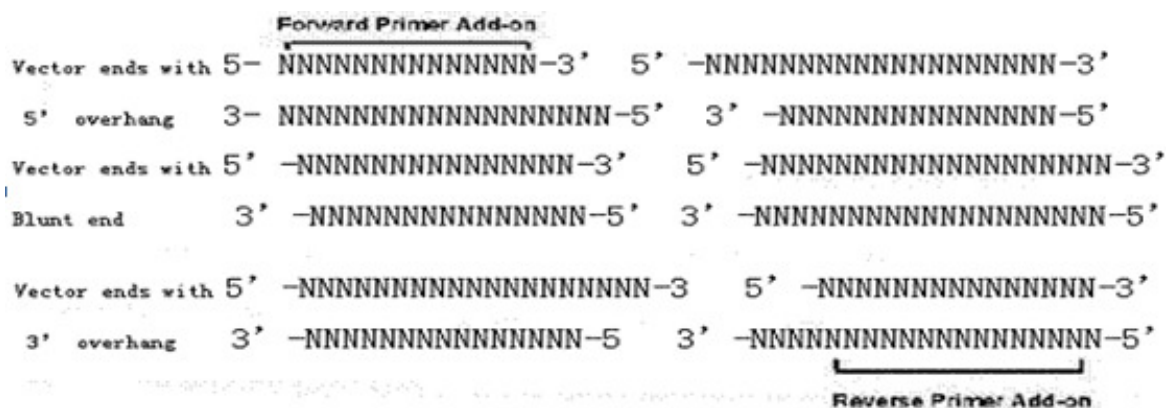
技术原理：根据酶切后线性化载体的两端序列，分别在目的基因两端设计 15 base 与载体末端同源的序列，PCR 扩增产物两端就会分别带有 15bp 与线性化载体两端相同的序列。PCR 产物和线性化载体与 Ezfusion Enzyme 酶充分混匀。22℃温浴 30min 后，按传统方法转化 E.coli competent cells,就可以高效、定向地将 PCR 产物克隆到目标载体上。如下图：



操作步骤:

A. PCR 引物设计及片段准备

用该试剂盒克隆目的基因或者目标 DNA 片段到指定的线性化载体，PCR 扩增的引物最外侧必须有 10-18 个碱基与线性载体最外侧完全配对。现就 15 个碱基配对举例如下：



注意：捷瑞公司的引物设计与 BD in-fusion kits 是不同的，使用捷瑞公司的试剂盒，仅使用上游 10-18 个碱基和下游 10-18 个碱基作为附加碱基即可。

可以采用任何聚合酶来得到 PCR 产物，但是，引物和引物二聚体会对 Ezfusio 有一定的抑制作用。如果 PCR 反应得到单一的目的条带，PCR 产物可以用 PCR 纯化试剂盒回收（如捷瑞公司的 GK2051）；如果 PCR 产生很多非特异性条带，应该用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（如捷瑞公司的 GK2043）去掉多余条带。

适用范围:

- (1) multiple fragments cloning and assembly.
- (2) cloning of any insert into any location of a chosen vector.
- (3) complete elimination of the dependence on availability of restriction sites, phosphatase treatment and ligation.
- (4) inserts free from any redundant or unwanted base pairs.
- (5) save over 50% on reagent costs in comparison to other products available on the market.

B. 线性化载体的制备

载体的完全线性化对于重组实验至关重要，没有线性化的载体会产生非常高的背景。线性化后的载体需要过柱纯化或者凝胶回收纯化。

C. 同源重组反应的建立

线性化载体 (100-200ng/ul)	X ul
PCR 产物(100-200ng/ul)	Y ul
10*EZ fusion buffer	2 ul
EZ fusion 酶	1 ul
Deionized water	M ul
Total	20 ul

25℃或室温 10-20min，立即转化或者-20℃低温冻存，后续转化。

D. 转化

1. 新鲜制备的或-70℃下保存的 100ul 感受态细胞，置于冰上，完全解冻后轻轻地将细胞均匀悬浮。
2. 加入 10-12ul 连接液，轻轻混匀，冰上放置 30 分钟。
3. 42℃水浴 90 秒，冰上放置 2 分钟。
4. 加 600ul SOC 培养基，37℃ 250rpm 振荡培养 1 小时。
5. 室温下 4000rpm 离心 5 分钟，用吸头吸掉 500ul 上清液，用剩余的培养基将细胞悬浮。
6. 将细菌均匀细致的涂布在 90mm 平板上。

注：细菌的用量依连接的效率及感受态细胞的感受率而进行适当调整。

7. 平板在 37℃下正向放置 1 小时后以吸附过多的液体，然后倒置培养过夜。

疑难解析:

问题	可能原因	解决办法
转化后克隆很少 或者没有克隆	感受态转化效率低	检测感受态转化效率，建议使用 $>1 \times 10^8$ cfu/ug 的细胞
	连接液过多	不要加超过 10ul 的连接液到 100ul 细胞中，太多连接液会抑制转化
	连接液中有抑制转化的成分	PCR 产物和线性化载体都需要经过纯化
	载体与片段比例失调	一般来讲，vector/insert 摩尔比为 2:1 比较合适，如果片段与载体大小接近，二者比例也可以为 1:1
大多数克隆里面 没有插入片段	克隆载体没有完全线性化	凝胶纯化载体
	重组反应被含有相同抗性的质粒污染	PCR 产物直接柱纯化会含有模板质粒，建议凝胶电泳后，切胶纯化

备注： 本方法也适用于多片段克隆，示意图如下（两个片段同时克隆同一载体示例）

