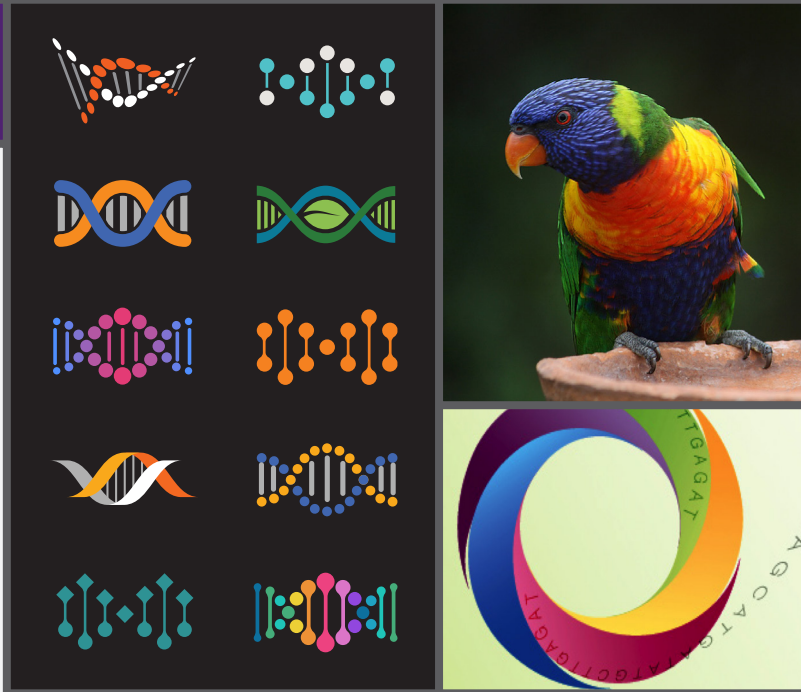


In-Fusion[®] HD Cloning

The Right Clone Every Time



that's
GOOD
science!™

The Original	Fusion PCR Cloning의 원조
No Limits	Any Vector, Any Insert, Any Site
Time-saving	단 15분만에 반응 완료
Highly Efficient	연구자들이 직접 검증한 고효율 Cloning

In-Fusion® HD Cloning

주요 특징

10년 이상 축적된 노하우	- Fusion PCR Cloning의 원조 (since 2002) - 연구자들이 인정한 최고 효율의 PCR cloning kit
Any vector, any insert, any site	- 제한효소 사이트 관계 없이 원하는 위치에 삽입 - Shuttle vector 불필요 : expression vector에 바로 cloning - Large vector (cosmid: ~46 kb), large insert (~15 kb)도 효율적인 cloning
빠르고 간편한 cloning	- Modify 불필요 : A-tailing, 제한효소, alkaline phosphatase 불필요 - Directional cloning : insert 방향성 유지 - No frame shift : 불필요한 염기추가 없음
탁월한 cloning 효율	- Cloning 효율 극대화 : false positive의 확률 낮음 - Multiple fragment cloning, mutagenesis에 최적

In-Fusion® HD Cloning Flow Chart

1-1. Insert 준비

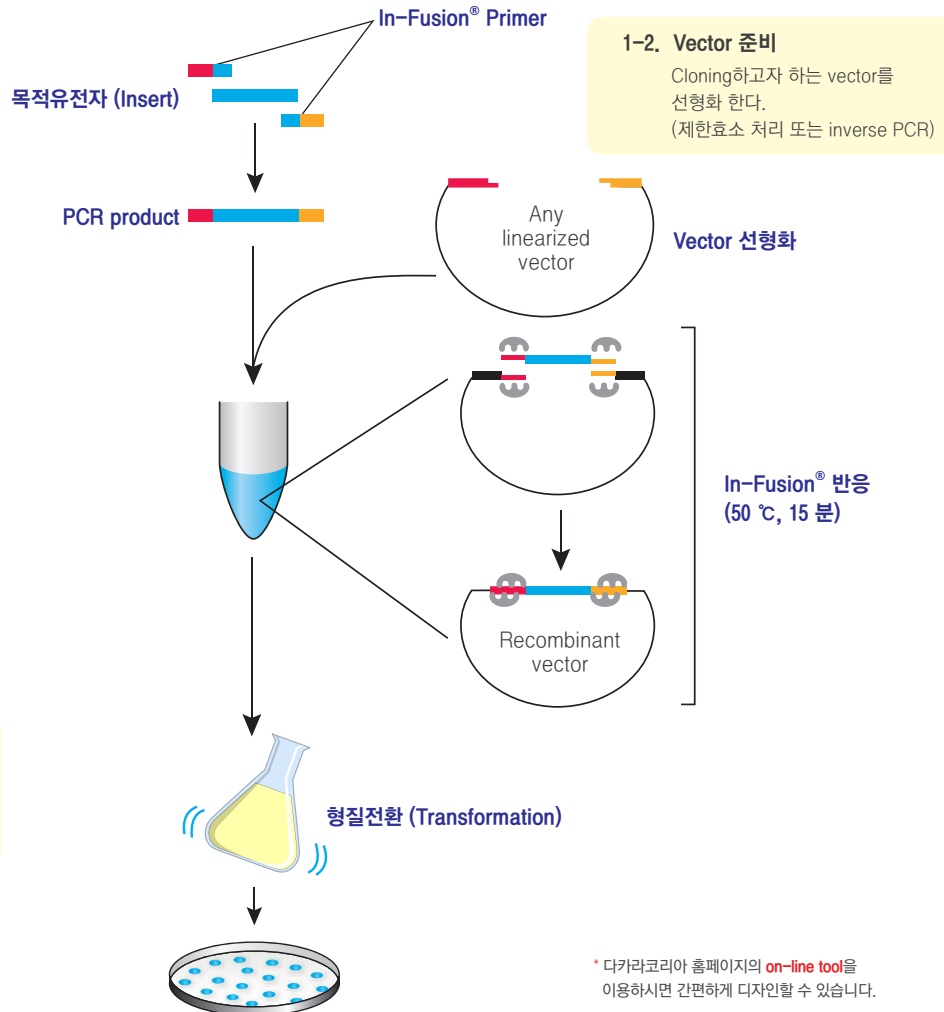
Vector 양쪽 말단 15 bp와 상동 서열을 가진 In-Fusion® primer*로 insert를 증폭한다.
〈CloneAmp™ HiFi PCR Premix〉

2. 증폭된 insert (PCR product)와 선형화된 vector를 정제한다.
〈NucleoSpin® 또는 Cloning Enhancer〉

3. Insert와 선형화된 vector로 In-Fusion® 반응을 한다.
〈In-Fusion® HD Enzyme Premix〉

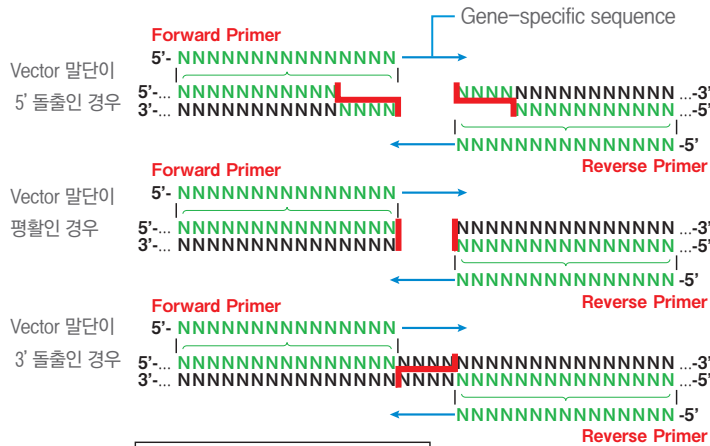
4. 형질전환 한다.
〈Stellar™ Competent Cells〉

5. 배양하여 colony를 분석한다.



In-Fusion® Ready Insert 준비

- Insert 양 말단에 vector 서열을 추가하기 위한 In-Fusion® primer 디자인



위의 염기를 15 개의 상동 염기서열로 계산합니다.

Insert DNA를 증폭하기 위한 Primer 3' 부분 디자인 (Gene-specific sequence)

- 길이 = 18 - 25 bp
- GC함량 = 40 - 60 %
- Tm = 58 - 65 °C

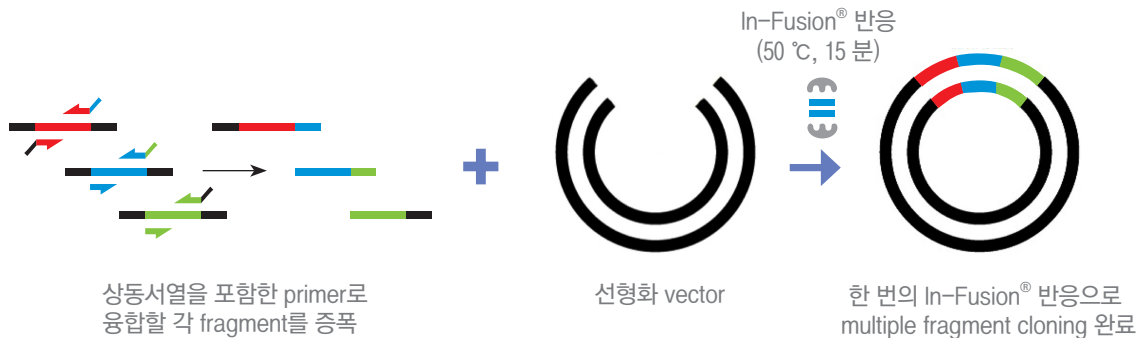
* 세부 사항 매뉴얼 참조



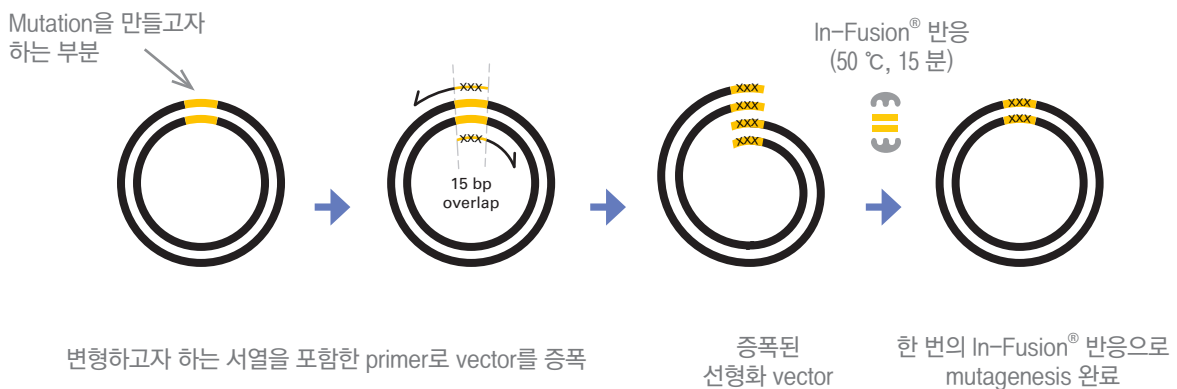
* 다카라코리아 홈페이지에서 on-line tool을 이용하면 In-Fusion® primer를 쉽게 디자인 가능

In-Fusion® HD Cloning Application

Multiple Fragment Cloning - 여러 개의 insert를 한번에 vector에 삽입하기



Site-directed Mutagenesis - 간단한 mutation 만들기



다카라코리아 홈페이지에서 더 많은 응용사례를 만나보세요.



완벽한 Cloning을 위한

In-Fusion® HD Cloning Plus

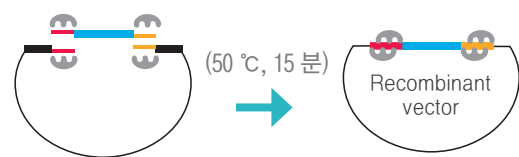
(Code 638909 외)

In-Fusion® HD Cloning Plus는
성공적인 cloning에 필요한 모든 구성품을 포함하고 있습니다.

In-Fusion® HD Cloning의 핵심

In-Fusion® HD Enzyme Premix

- 15 분이면 vector와 insert의 융합 완료



완벽한 PCR product 정제 = Cloning의 효율 향상

NucleoSpin® / Cloning Enhancer (별도 구매 시 Code 639613)

- **NucleoSpin®** In-Fusion® ready insert 정제를 위한 1차 추천
- **Cloning Enhancer** Insert가 single band로 증폭된 경우에 사용

* Cloning Enhancer는 In-Fusion® HD Cloning Plus CE (Code 638916)의 구성품입니다.

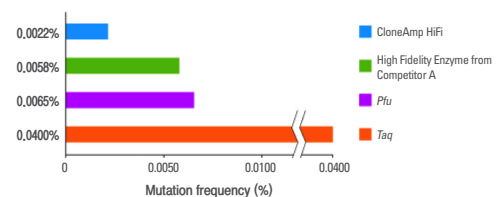
목적유전자의 정확한 증폭을 위한 PCR 효소

CloneAmp™ HiFi PCR Premix (별도 구매 시 Code 639298)

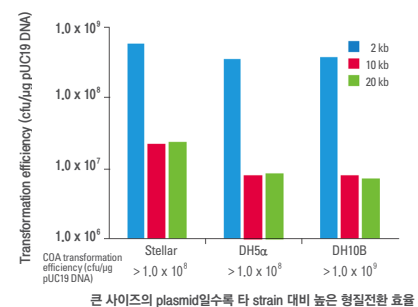
- 높은 정확도의 hot start PCR 효소
- 빠른 반응속도 (Extension: 5 sec/kb)
- GC-rich 또는 최대 10 kb의 단편 합성 가능

* 10 kb 이상 DNA 단편의 증폭은 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Code R050A) 사용 권장

〈 타 PCR 효소와의 정확도 비교 〉



〈 주요 Competent cells와의 형질전환 효율 비교 〉



Cloning의 성공비결은 Competent Cells

Stellar™ Competent Cells (별도 구매 시 Code 636763)

- 높은 형질전환 효율을 가진 *E.coli* strain ($> 5 \times 10^8$ cfu/μg)
- 일반적인 cloning은 물론 large fragment cloning에 최적
- cDNA 및 gDNA library 제작, blue/white screening에 추천

In-Fusion® HD Cloning

사용자의 생생한 후기를 전해 드립니다!

제한효소 사이트로부터 자유로워요!



연세대학교 이○○ 선생님

제한효소 사이트를 찾지 않아도 되니 너무 좋아요!
만약에 제한효소 사이트가 있어도 어차피 더블컷을 하게 되면 효율에도 문제가 생기고...

Multiple fragment cloning을 하고 있는데 insert에 제한효소 처리 없이 cloning 할 수 있어서 너무 좋아요. 그래서 또 구매할 생각이에요.

인하대학교 김○○ 선생님

기존에 해오던 cloning 방식보다 훨씬 좋아요!



숙명여자대학교 신○○ 선생님

랩에서 진행해오던 기존의 cloning 방법보다 시간도 단축되고 효율도 높아서 만족해요. 또 PrimeSTAR PCR 효소로 mutation 없이 정확하게 PCR되어 cloning 되니 귀찮았던 cloning 실험에 속도가 붙어요.

기존에 진행하던 방법으로 cloning 실험에 애를 먹고 있었는데, In-Fusion으로 모두 해결했습니다! 특히 kit의 PCR 효소와 competent cells를 이용하는 것이 큰 도움이 되었습니다. 타 제품 대비 효율 인정합니다!

중앙대학교 이○○ 선생님

이제는 multiple fragment cloning도 자신 있습니다!



충남대학교 김○○ 선생님

세 개의 insert로 multiple fragment cloning 진행 후 75%이상의 positive clone을 얻었어요. 타 제품 대비 매우 우수합니다!

Vector : 6 kb
Insert : 2 kb + 2.6 kb + 2 kb

Cloning 디자인부터 실험까지의 과정이 매우 간편해서, 정말 빠르게 결과를 얻을 수 있었습니다.

Vector : 6 kb
Insert : 2.6 kb + 2.6 kb + 2.6 kb

서울대학교 김○○ 선생님



MIT Dr. Braun

Speed and accuracy as well as easiness of this application have convinced me to purchase this product again.

Vector : 10.8 kb
Insert : 453 bp + 1002 bp

긴 insert, 짧은 vector도 거뜬해요!



연세대학교 이○○ 선생님

바이러스 vector cloning과 같이 긴 insert를 짧은 vector에 cloning하는 게 정말 어려웠는데, In-Fusion은 정말 쉬워요. 안 되던 cloning을 쉽게 끝냈습니다.

Vector : 2.6 kb
Insert : 9.6 kb

Vector : 1 kb
Insert : 8.5 kb

국내의 연구자의 더 많은
사용후기를 만나보세요!
www.takara.co.kr/in-fusion

- 본 사용후기는 2015년 In-Fusion® HD Cloning 피드백 이벤트 신청자로부터 동의를 받아 공개하는 자료입니다.
- 소중한 경험을 공유해주신 선생님들께 감사 드립니다.



In-Fusion® HD Cloning 제품리스트

Code	제품명	용량	구성품		
			PCR효소	정제*	Cells
638909	In-Fusion® HD Cloning Plus	10 회	O	NS	O
638916	In-Fusion® HD Cloning Plus CE	10 회	O	CE	O
639642	In-Fusion® HD Cloning w/Competent Cells	10 회	-	-	O
639648	In-Fusion® HD Cloning Kit	10 회	-	-	-
638912	In-Fusion® HD EcoDry Cloning Plus	8 회	O	NS	O
639678	In-Fusion® HD EcoDry Cloning Kit w/Competent Cells	8 회	-	-	O
639689	In-Fusion® HD EcoDry Cloning Kit	8 회	-	-	-
In-Fusion® HD cloning 성공을 위한 별매품					
639298	CloneAmp™ HiFi PCR Premix	200 회	Insert의 PCR 증폭		
639613	Cloning Enhancer	25 회	PCR 잔여물 제거		
636763	Stellar™ Competent Cells	10 회	고효율의 형질전환용 <i>E.coli</i>		

* PCR product 정제 방법 (NS: NucleoSpin®, CE: Cloning Enhancer)

※ 다카라코리아 홈페이지에서 다양한 제품 확인이 가능합니다.

FAQ

- Q** In-Fusion® Primer의 vector와의 상동서열은 15 bp 이상 혹은 이하로 디자인 가능한가요?
- A** In-Fusion® HD Cloning은 15 bp의 상동서열을 융합하는 데에 최적화되어 있으며, 12 bp 이하 또는 21 bp 이상의 상동서열을 포함하는 primer 디자인은 권장하지 않습니다.
- Q** In-Fusion® HD EcoDry Cloning 제품의 특징은 무엇인가요?
- A** In-Fusion® HD EcoDry Cloning 제품은 동결건조 상태의 In-Fusion® Premix가 분주되어 있어, 샘플 수가 많은 실험에 적합합니다. In-Fusion® HD EcoDry Cloning 효소의 반응시간은 30 분입니다.
- Q** In-Fusion® 반응 시 최적의 vector와 insert의 첨가량은 얼마인가요?
- A** 일반적으로 vector : insert = 1 : 2 비율 (molar ratio)을 권장하며, multiple fragment cloning 시에도 같은 비율을 유지합니다. 예를 들어 insert의 개수가 3개인 경우 vector : insert A : insert B : insert C = 1 : 2 : 2 : 2로 반응합니다. Vector와 insert의 길이에 따른 최적의 양을 계산해주는 온라인 툴이 제공되고 있습니다. 다카라코리아 홈페이지의 온라인 툴을 이용하시기 바랍니다.
- Q** 다른 *E.coli* competent cells를 사용할 수 있나요?
- A** 성공적인 In-Fusion® HD Cloning을 위해서는 Stellar™ Competent Cells의 사용을 권장합니다. 다른 competent cells를 사용 시 효율이 저하될 수 있습니다. 또한 다음과 같은 strain의 사용은 권장하지 않습니다.
- *recA1* 유전자의 결손 또는 *endA* 유전자의 변이가 있는 *E.coli* strain
 - 특정 목적으로 개발된 *E. coli* strain (예: 단백질 대량 발현 등)
 - 그람 양성 박테리아
 - *nupG (deoR)* 유전자의 변이가 있는 박테리아
- Q** 짧은 길이의 합성 oligonucleotide도 In-Fusion® HD Cloning을 사용할 수 있나요?
- A** 네, 15 bp의 상동서열을 포함하는 50 bp 이상의 합성 oligonucleotide라면 가능합니다. 이와 같은 경우에는 oligo와 vector의 반응 비율을 5 : 15 : 1로 합니다.