



高等农林教育“十三五”规划教材

植物中病毒诱导基因沉默技术 操作指导

傅达奇 编著



中国农业大学出版社
ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

植物中病毒诱导基因沉默技术 操作指导

傅达奇 编著

中国农业大学出版社

· 北京 ·

图书在版编目(CIP)数据

植物中病毒诱导基因沉默技术操作指导 / 傅达奇编著.

— 北京: 中国农业大学出版社, 2016. 11

ISBN 978-7-5655-1742-6

I. ① 植… II. ① 傅… III. ① 植物—基因表达调控
IV. ① Q943.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第274080号

书 名 植物中病毒诱导基因沉默技术操作指导
作 者 傅达奇 编著

策划编辑	张秀环	责任编辑	张秀环
封面设计	融唐广告		
出版发行	中国农业大学出版社		
社 址	北京市海淀区圆明园西路2号		
邮政编码	100193		
电 话	发行部 010-62818625, 2620	读者服务部	010-62732336
	编辑部 010-62732617, 2618	出 版 部	010-62733440
网 址	http://www.cau.edu.cn/caup	e-mail	cbsszs@cau.edu.cn
经 销	新华书店		
印 刷	北京时捷印刷有限公司		
版 次	2016年11月第1版	2016年11月第1次印刷	
规 格	880x1230	32开本	3印张 80千字
定 价	36.00元		

图书如有质量问题本社发行部负责调换

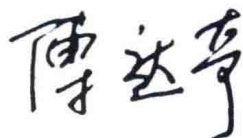
前言 Preface

基因测序技术的发展为我们提供了越来越多的生物信息，但如何从这些大量的候选信息中获得真正有价值的基因，需完成候选基因的功能筛选与验证。转基因技术因其操作复杂，费时费力而无法满足这种高通量的基因功能筛选需求，而病毒诱导基因沉默技术（virus-induced gene silencing, VIGS）的原理是利用病毒载体携带植物目的基因片段，通过各种方式侵染植物，重组病毒在植物中复制产生双链RNA（double strand RNA, dsRNA）。在植物自身防卫反应转录后基因沉默（post transcriptional gene silencing, PTGS）的机制作用下，dsRNA进一步产生siRNA（small interference RNA, siRNA），该产物能诱导与其具有同源性的植物内源目的基因mRNA的降解，实现植物基因功能的快速鉴定。该方法因其具有不依赖转基因操作、简单、快速、高效等优点而在植物基因功能鉴定领域得到广泛运用。

VIGS自被开发以来，已有多种野生病毒被改造成VIGS载体，同时建立了多种有效的病毒侵染方法，并成功运用于植物的基因功能鉴定。这其中以烟草脆裂病毒（tobacco rattle virus, TRV）的研究最为广泛和深入。

本人博士期间一次偶然的会与TRV介导的VIGS技术结下了不解之缘，从此长期致力于TRV病毒的农杆菌侵染方法的建立与应用，并利用该病毒成功筛选了大量番茄果实成熟的相关基因，积累了一定的实验技术经验。在工作中，经常遇到国内外同行的技术咨询，因此我萌发了写一本系统介绍TRV介导的VIGS实验指导书的想法，希望此书能对同行领域的研究者有所帮助，也期盼读者在使用过程中对本书的不足之处提出改善意见。

在本书的写作过程中，我的学生闫化学、孟兰环、高颖、王恬、王翠翠、袁昕煜、王睿恒、邢孟阳等协助收集整理部分资料，在此一并表示感谢！



2016年8月10日

内 容 提 要

病毒诱导基因沉默技术 (virus-induced gene silencing, VIGS) 属于RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 中的一种, 因其具有简单、快速、高效和无须依赖转基因操作等优点, 在植物基因功能研究领域得到广泛的运用。本书简单阐述了VIGS的共性操作步骤, 如载体选择、载体构建以及基因沉默的分子鉴定等, 重点介绍了作者本人在长期研究过程中积累的TRV病毒农杆菌侵染方法。本书图文并茂, 方法来源作者的科研一线, 具有很好的参考价值。

目 录

Content

第一章 VIGS载体构建	01
第二章 VIGS-SSH文库构建	26
第三章 TRV诱导VIGS的报告基因	42
第四章 TRV侵染液的配制	48
第五章 叶片注射侵染法	52
第六章 高压喷枪叶面侵染法	58
第七章 真空渗透侵染法	62
第八章 茎侵染法	68
第九章 果柄侵染法	72
第十章 目的基因沉默的分子检测	76
参考文献	82

第一章 VIGS载体构建

1. 引言

烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV) 是目前应用最广泛、效果最好的VIGS病毒载体, 本书所有内容均以此为材料。VIGS实验首先需要通过体外重组的方法获得含有外源目的基因片段的TRV2质粒重组体。通过测序鉴定确保外源基因正确插入, 正确的TRV重组体转化农杆菌后方可用于后续的侵染操作。随着基因体外重组技术的发展, 结合TRV载体近十年来的改造策略, 在这一章主要介绍TRV体外重组的几种常见方法, 并对其原理和优缺点加以比较, 以便实验者在最短的时间内完成重组体的构建。

2. TRV病毒介绍

TRV是一种RNA病毒, 寄主范围广, 能有效侵染50多种双子叶和单子叶植物家族的400多个品种 (Miki and Okada, 1970)。

TRV病毒由包括RNA1和RNA2的两条RNA链组成。其中, RNA1编码的蛋白包括核糖核酸依赖的核糖核酸聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、134 kDa和194 kDa复制酶蛋白和运动蛋白 (movement protein, MP) 等重要原件, 这类蛋白主要协助病毒的运动和复制。RNA2链编码衣壳蛋白 (coat protein, CP) 形成病毒颗粒的外壳, 编码的 29.4 kDa和32.8 kDa两类蛋白与病毒的传播有关联 (Sanger, 1969; Macfarlane, 2011)。在VIGS技术体系中, RNA2被改造成可供插入外源基因片段的质粒载体TRV2, 用于沉默片段的体外重组。RNA1被反转录成双链DNA后插入植物表达载体形成TRV1, 转入GV3101农杆菌保存, 在后续实验中和含有TRV2重组体的农杆菌共同用于VIGS的侵染实验。TRV1载体在VIGS整个过程中不插入外源片段 (Burch-Smith et al., 2004)。

茄科植物是TRV病毒的天然寄主, TRV对包括番茄 (Liu et al., 2002a)、烟草 (Ratcliff et al., 2001)、马铃薯 (Brigneti et al., 2004)、辣椒 (Chung et al., 2004)

等有良好的侵染效果。另外, TRV诱导的VIGS在一些非茄科植物中也得到有效验证, 如杨树 (Shen et al., 2015)、拟南芥 (Burch-Smith et al., 2006)、罂粟 (Hileman et al., 2005) 和棉花 (Gao et al., 2011) 等。由于TRV病毒具有基因组小、能侵染植物生长点、不产生典型病毒症状、便于改造等优点, 使其成为目前在植物中应用最广泛和效果最好的VIGS病毒载体。在近十几年的研究过程中, 该研究领域出现了不同版本的TRV病毒载体, 他们具有不同的外源基因片段插入方式, 下面将详细介绍TRV载体体外重组的几种常见方法。

3. TRV2病毒载体图

2001年, 第一版本TRV病毒载体产生于英国的Baulcombe D.C教授实验室 (The Sainsbury Laboratory, John Innes Centre), 由于存在一些复制稳定性的问题, 该版本并没有得到广泛运用 (Ratcliff et al., 2001)。在此基础上, 2002年, 耶鲁大学的Dinesh-Kumar SP教授对TRV载体进行了改造, 使得该载体获得了更为有效的VIGS效果。目前, 该版本在世界范围内得到广泛运用 (Liu et al., 2002a)。后来该实验室又在此基础上对TRV载体进行了改造升级, 引入载体构建的新方法以便于目的基因的体外重组。本章主要介绍在实际操作中常见的几种获得TRV重组载体的方法, 包括传统的酶切连接 (Liu et al., 2002a)、不依赖连接酶的基因克隆 (ligation-independent cloning, LIC) (Dong et al., 2007)、In-Fusion (Sleight et al., 2010) 和Gateway (Liu et al., 2002a) 等重组方法。下一章还将介绍TRV介导的抑制性差减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 文库的构建方法。TRV病毒载体的基本结构如下 (图1-1)。

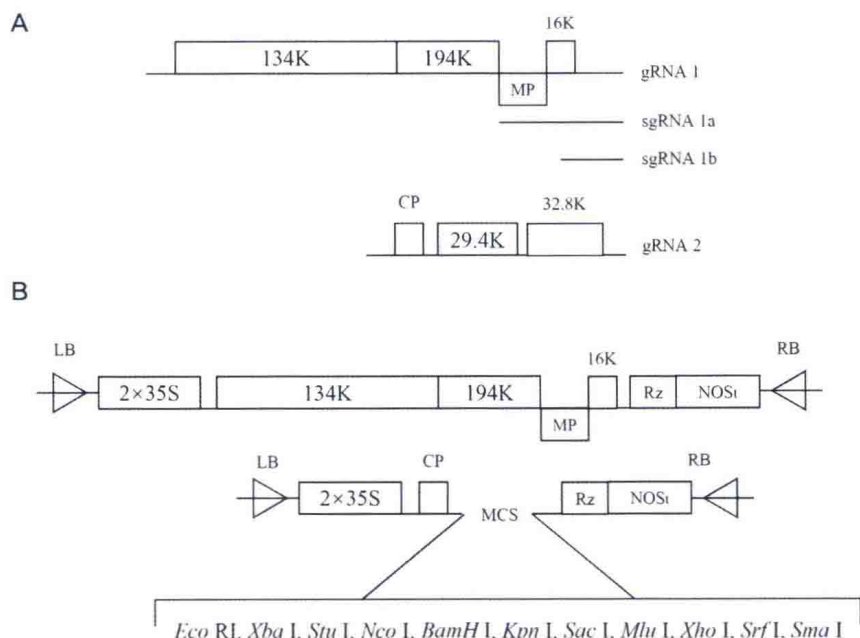


图1-1 TRV病毒载体的结构图 (Liu et al., 2002b)

A. TRV野生病毒 (RNA1和RNA2) 的结构;

B. 改造后的TRV (RNA1和RNA2) 病毒载体结构

图1-1中的图A是野生病毒的结构, RNA1包括134 kDa、194 kDa、16 kDa和运动蛋白 (moving protein, MP) 等编码蛋白, RNA2包括衣壳蛋白 (coat protein, CP), 29.4 kDa和32.8 kDa等组分。图1-1B显示野生TRV在改造过程中把RNA反转录获得相应的双链DNA, 并添加RZ结构便于增强载体的复制稳定性。转录得到的病毒DNA插入到植物表达载体, 使其处于35S启动子和NOS终止子之间, 便于在侵染植物后能重新转录获得TRV病毒RNA。为了便于基因体外重组, 在TRV2载体上添加了多克隆位点 (multiple cloning site, MCS), 载体构建时可根据MCS来选择需要在扩增片段末端添加的限制性内切酶序列。

目的基因体外重组时, 无须对TRV1进行操作, 往往事先就把TRV1转化到农杆菌中, 用时取出活化即可。TRV2则转化到大肠杆菌中保存, 便于提取质粒用于外源目的基因的重组操作。

4. VIGS重组载体构建

利用VIGS沉默植物的目的基因，首先需要构建含有目的基因片段的TRV病毒重组载体。基因体外重组所需步骤主要包括目的基因克隆、酶切、连接、大肠杆菌转化、鉴定、农杆菌转化，最终获得可以用于侵染的含有TRV2重组载体农杆菌。含有TRV2重组体的农杆菌和含有TRV1的农杆菌一起就可以用于后续的侵染实验。下面就依次介绍目的片段插入TRV2质粒的几种重组方法，包括酶切连接、不依赖连接酶的基因克隆（ligation-independent cloning, LIC）连接、In-Fusion（Sleight et al., 2010）和Gateway等方法。

4.1 目的基因克隆

获取目的基因的方法主要包括文库筛选、质粒酶切、人工合成、PCR扩增等，其中PCR扩增最为常见。PCR扩增主要包括RNA提取、RNA反转录、引物设计和PCR扩增等步骤。

4.1.1 RNA提取

此处以番茄为材料，采用常见的TRIZOL法为例子具体讲解。也可以直接从生物技术公司购买试剂盒，其操作遵照实验手册。TRIZOL方法适合常见植物材料的RNA提取，如植物材料无特殊需求，均可采用。

4.1.1.1 TRIZOL试剂的配制

（1）配置500 mL的浓度为0.1%的焦碳酸二乙酯（DEPC）水，121℃下高压蒸汽灭菌20 min。

（2）配置100 mL浓度为3 mol/L的醋酸钠（NaAc）溶液，用醋酸（HAc）调节pH至5.0，保存于棕色试剂瓶中。

（3）用0.1% DEPC溶液配置100 mL的TRIZOL试剂：异硫氰酸胍浓度为0.8 mol/L，硫氰酸铵浓度为0.4 mol/L，pH为5.0的NaAc终浓度为0.1 mol/L、甘油体积比为5%、水饱和酚体积比38%。

（4）配置100 mL的浓度为3 mol/L的醋酸钠（NaAc）溶液，用醋酸（HAc）调节pH至5.2，保存于棕色试剂瓶中。

(5) 按苯酚/氯仿/异戊醇 = 25/24/1 的体积比配置一定量的酚/仿异/戊醇混合液。

(6) 按氯仿/异戊醇 = 49/1 的体积比配置一定量的氯仿/异戊醇混合液。

(7) 按乙醇/DEPC水 = 3/1 的体积比配置一定量的75%乙醇。

4.1.1.2 TRIZOL法 (栾福磊, 等, 2009)

(1) 取2 g新鲜组织样品, 液氮速冻, 储存于-80℃或直接研磨, 装入预冷的2 mL离心管中。

(2) 样品在液氮条件下研磨成粉末状, 切勿高温融化, 粉末倒入预冷的2 mL离心管, 加入1 mL TRIZOL和20 μ L的 β -巯基乙醇, 剧烈振荡混匀后, 室温静置10 min。

(3) 加入600 μ L (0.6倍体积) 氯仿/异戊醇 (49/1, V/V) (去除蛋白), 上、下颠倒混匀。

(4) 加入10%~15%的无水乙醇 (去除糖), 上、下颠倒混匀, 室温静置2 min。

(5) 4℃, 12000 r/min离心15 min。

(6) 取上层液体至新管中, 加等体积酚/氯仿/异戊醇 (25/24/1, V/V), 上、下颠倒混匀3 min。

(7) 4℃, 12000 r/min离心15 min。

(8) 取上层液体至新管中, 加等体积氯仿/异戊醇 (49/1, V/V), 上、下颠倒混匀3 min。

(9) 4℃, 12000 r/min离心15 min。

(10) 取上层液体至新管中, 加等体积异丙醇和0.1倍体积的pH5.2的3 mol/L NaAc溶液, NaAc使RNA带上电荷后易于沉淀, 室温静置沉淀10~15 min。

(11) 4℃, 12000 r/min离心15 min, 弃上清液。

(12) 加入1 mL 75%乙醇洗涤, 4℃, 12000 r/min离心15 min, 弃上清液。二次离心, 去除乙醇, 晾干3~5 min, 待残留乙醇挥发干净。

(13) 用30 μ L DEPC水溶解, 用于电泳检测。

4.1.1.3 RNA 电泳检测及检测

RNA提取的所有步骤中都必须使用无RNA酶污染的器皿和枪头来防止RNA降解。获得的RNA用1.5%的琼脂糖凝胶电泳15 min检测其完整性，28S/18S亮度应为2/1。取2.0 μ L RNA于Thermo NanoDrop 2000检测RNA质量。当OD₂₆₀/OD₂₈₀比值介于1.8~2.1时表明RNA质量良好，小于1.8表明有蛋白质或酚污染，大于2.1表明有盐分或基因组残留。

4.1.2 反转录获得cDNA

上述步骤提取的RNA通过反转录获得cDNA，以全式金生物技术有限公司反转录试剂盒为例（货号：AT311-03）。此试剂盒的优势是在反转录之前消除DNA的污染，反转录和DNA消除在同一反应中进行。用于反转录RNA的总含量为2000 ng：RNA体积（V）=2000/RNA的浓度，通过公式计算20 μ L反应体系中需加入的RNA体积，确保加入RNA的体积不能超过7 μ L。

（1）在无RNA酶污染的PCR管中加入1 μ L的Oligo dT引物（0.5 μ g/ μ L）或随机引物（0.1 μ g/ μ L）。

（2）加入适当体积的RNA 2000 ng，并加入适量体积的RNase-free水补齐至7 μ L。

（3）65℃孵育5 min，迅速冰浴2 min。

（4）加入10 μ L的2×反转录反应缓冲液，1 μ L的酶混合物和1 μ L的gDNA去除剂。后两种试剂必须放在冰盒上融化，过热的温度能使其失去活性。

（5）使用Oligo dT或特异性引物GSP1时，在42℃孵育30 min；使用随机引物，25℃孵育10 min后，42℃孵育30 min。

（6）85℃加热5 s，失活反转录酶和gDNA去除酶。

（7）获得的cDNA在-20℃条件下储存。

4.1.3 目的片段的PCR扩增

4.1.3.1 引物设计

基因沉默片段的选择是VIGS成败的关键，引物设计时应该注意考虑以下几点：①沉默片段长度一般在300~500 bp，尽量选择靶基因的编码区

域；②沉默片段应有较好的特异性，对于基因家族的成员特别注意沉默区域的选择，防止出现共沉默现象；③片段反向插入效果更佳。也可借助网络平台设计引物，具体详见网站说明：<https://solgenomics.net/tools/index.pl>。

4.1.3.2 PCR扩增体系的建立

50 μL PCR反应体系：25 μL 的全式金2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix (-dye) (货号：AS111)，正、反向引物各2 μL (10 $\mu\text{M}/\text{L}$)，1 μL 的模板cDNA，20 μL 无菌超纯水。

反应条件：顶盖设置为105 $^{\circ}\text{C}$ ，94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，50~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min，30~35个循环；循环结束后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。退火温度为正反向引物的最低 T_{m} 值稍高2~3 $^{\circ}\text{C}$ ，引物设计时确保正反向引物的 T_{m} 值尽可能接近，一般不超过5 $^{\circ}\text{C}$ ，否则影响扩增效果。

4.2 质粒DNA提取

质粒小量提取按照《分子克隆实验指南》的碱裂解法进行，所用试剂可以自行配置，也可以直接购买试剂盒。由于试剂盒具有操作简单、快速、质粒DNA质量好等优点，且价钱也比较便宜，所以推荐使用试剂盒法。本文以Axygen生物技术有限公司的质粒提取试剂盒（货号：AP-MN-P-50）为例，介绍质粒提取的步骤，具体方法如下。

(1) 取培养好的菌液2 mL，12000 r/min离心1 min，弃上清液。

(2) 加250 μL Buffer S1，剧烈振荡悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的菌块（确认Buffer S1中加入了RNase A）。

(3) 加250 μL Buffer S2，温和并充分地上、下翻转4~6次混合均匀，使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液，此步骤不宜超过5 min。

(4) 加350 μL Buffer S3，温和并充分地上、下翻转混合6~8次，12000 r/min离心10 min。

(5) 吸取上一步离心上清液并转移到制备管（置于2 mL离心管中），12000 r/min离心1 min，弃滤液。

(6) 将制备管放回离心管，加500 μL Buffer W1，12000 r/min离心

1 min, 弃滤液。

(7) 将制备管放回离心管, 加700 μ L Buffer W2, 12000 r/min离心1 min, 其滤液(确认Buffer W2中已加入指定体积的无水乙醇)。

(8) 重复步骤(7)。

(9) 将制备管放回2 mL离心管中, 12000 r/min离心2 min。

(10) 将制备管移入新的1.5 mL离心管中, 在制备管膜中央加入60 μ L的洗脱液(Eluent), 室温静置2 min, 12000 r/min离心1 min, 离心管中的洗脱液即为提取的质粒DNA。

(11) 电泳检测质粒DNA的提取质量, 质量好的质粒TRV2可以用于下一步的载体构建。

4.3 目的片段体外重组

目的基因片段必须有效地插入TRV2质粒才能形成重组载体, 随病毒复制而形成目的基因片段的双链RNA。当重组载体侵染植物后, 能有效启动植物内源机制沉默与载体携带基因片段同源的植物内源基因。根据不同版本的TRV2的结构, 结合现代基因重组技术, 本书主要介绍以下几种TRV2的重组方法。

4.3.1 限制性内切酶酶切连接法

酶切的目的是使TRV2载体和目的基因片段产生相同的黏性末端, 便于后续的连接。TRV2提供了多个克隆位点, 在设计目的基因扩增引物时在其末端添加与载体多克隆位点相对应的酶切位点序列, 如图1-2所示。位点选择需注意以下几点: ①首选常用的限制性内切酶, 如EcoR I和BamH I, 这类酶价格便宜, 切割效率高; ②所选酶切位点避免直接相邻, 增加切割效率; ③尽量避免平末端切割和连接; ④正反向引物末端酶切位点时确保片段反向插入载体为宜, 提高目的基因的沉默效率; ⑤PCR引物末端限制性内切酶序列的外围添加相应的保护碱基, 能提高PCR片段的酶切效率。

4.3.1.1 酶切体系的建立

建立50 μ L酶切反应体系。

(1) 在0.5 mL离心管中加入10倍缓冲液5 μL ，和1 μg 的质粒DNA或PCR产物。

(2) 加入正反引物携带的限制性内切酶各1 μL ，加入双蒸水将体系补至50 μL 。

(3) 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2-3 h，切割时间不宜过长。取5 μL 的酶切产物，加1 μL 的6倍上样缓冲液，并以未酶切的环状TRV2载体和PCR产物为对照，选用15 kb的DNA 相对分子质量标记，1%的琼脂糖凝胶电泳分析，检测质粒是否酶切完全。

TRV2质粒的酶切产物为大片段和小片段，小片段是两个酶切位点之间的核酸序列，只有几十个碱基，液体回收酶切产物时就能直接去除小片段获得纯化的酶切载体。如果选用的含有外源基因片段的重组TRV2载体酶切获得TRV2线性载体，则需要通过电泳切割大片段的方法进行胶回收。PCR片段的酶切产物可以通过液体回收方法即可获得，不需要胶回收步骤。

4.3.1.2 DNA胶回收 (货号: AP-GX-250)

以Axygen生物技术有限公司胶回收试剂盒为例。

(1) 酶切产物凝胶电泳，在紫外灯下切割含有目的DNA的琼脂糖凝胶，放入一个1.5 mL的离心管中，确保切割尽可能少的凝胶。

(2) 加入3倍凝胶体积的Buffer A (一般加入200 μL)，混合后于75 $^{\circ}\text{C}$ 加热，期间，取出观察胶溶化情况，并混合均匀，直至凝胶完全溶化。

(3) 加上述0.5倍Buffer A体积的Buffer B，混合均匀。当分离的DNA片段小于400 bp时，需要再加入相同凝胶体积的异丙醇，增加回收效率。

(4) 吸取上述溶液并转移到制备管 (置于2 mL离心管中)，12000 r/min离心1 min，弃滤液。

(5) 将制备管放回离心管，加500 μL Buffer W1，12000 r/min离心1 min，弃滤液。

(6) 将制备管放回离心管，加700 μL Buffer W2，12000 r/min离心1 min，弃滤液 (确认Buffer W2中已加入指定体积的无水乙醇)。

(7) 重复步骤(6)。

(8) 将制备管放回2 mL离心管中，12000 r/min离心2 min。

(9) 将制备管移入新的1.5 mL离心管中，在制备管膜中央加入30 μ L的洗脱液 (Eluent)，室温静置1 min，12000 r/min离心1 min。回收产物放于-20℃冰箱中储存待用。酶切产物液体回收方法同上，无须切胶步骤。

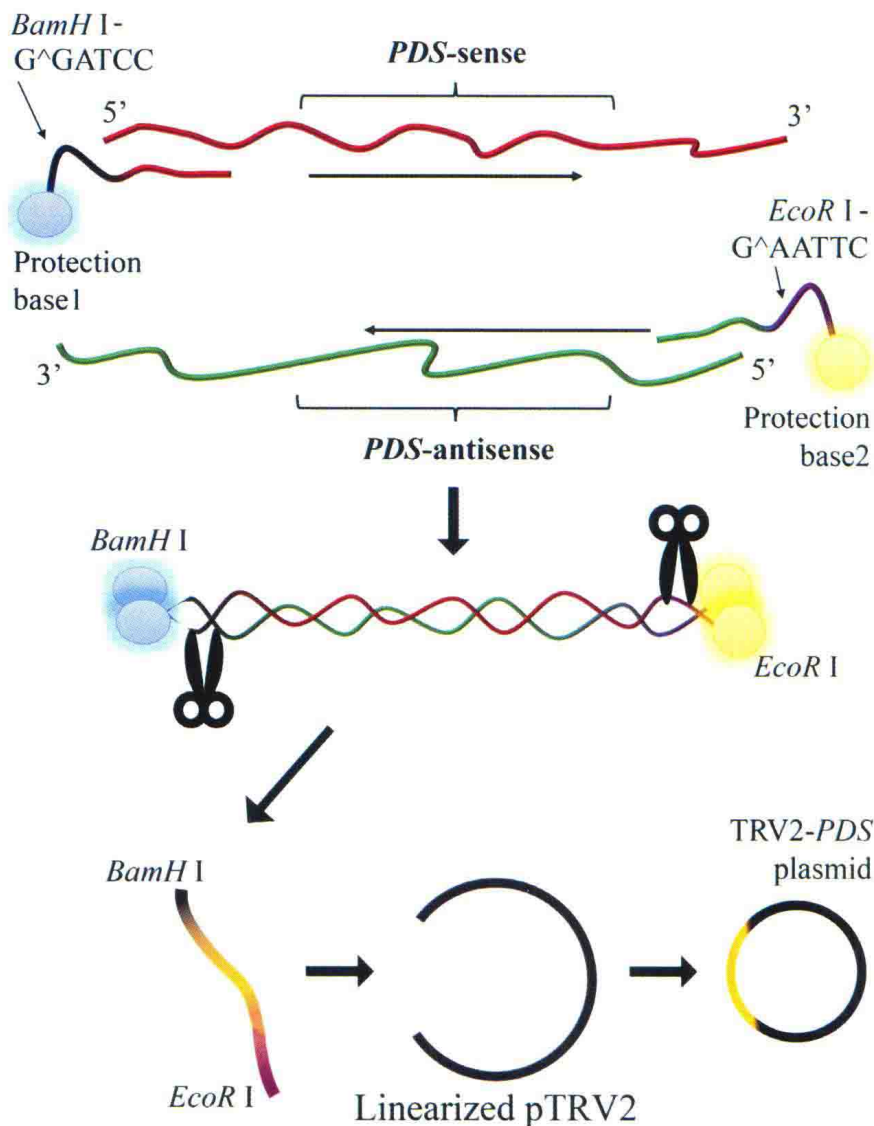


图1-2 酶切连接构建TRV2沉默载体的原理图

4.3.1.3 载体和片段连接

利用Promega公司的T4连接酶进行连接反应,按照下列比例建立10 μL 的连接体系:10倍T4 DNA连接酶缓冲液1 μL ,目的基因片段7 μL ,酶切的线性质粒1 μL ,T4 DNA连接酶1 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接4 h或4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,连接产物用于后续的转化实验。如果采用化学转化,产物不须纯化,如果采用电转化方法,则需要纯化去除连接反应溶液中的离子,纯化方法同上。

4.3.2 In-Fusion 连接

传统的限制性内切酶酶切连接需要多个步骤,耗时较长;另外,当同一载体需要连接多个片段时,有限的酶切位点加大了载体构建的难度;含有保护碱基的较长引物也显著增加了目的基因PCR扩增难度。

In-Fusion技术是一种新型的DNA体外重组技术,主要利用DNA同源重组来实现目的基因片段插入载体,无须限制性内切酶,该方法简单、快捷、高效。该克隆系统不受目的基因和载体限制性内切酶酶切位点的限制,不会给重组质粒添加多余的序列,可以轻松地在同一载体上同时构建多个外源基因片段。例如,Takara生物技术公司研发的In-Fusion[®]HD克隆系统在50 $^{\circ}\text{C}$ 反应只需15 min即可完成载体的构建。

从图1-3可以看出,只要在目的片段的PCR引物两端加入与载体同源的一部分序列,In-Fusion酶就能够通过同源重组的方式将目的片段无缝地插入线性化载体中,并且不会引入多余的碱基序列,当然载体首先还是要通过限制性内切酶来线性化。

在进行多片段载体构建时,如图1-4所示,只需在每个片段右端加入一部分下一个片段的序列,第一个片段左端引入载体左边的序列,最后一个片段右端引入载体右边的序列,就能够通过In-Fusion反应系统实现一次性多片段连接,效率远远高于普通的T4 DNA酶连接方式的多次反复连接。

引物设计是In-Fusion的关键步骤,主要确保载体和插入片段之间具有同源序列。图1-5介绍了In-Fusion技术的引物设计原则,需要在扩增片段的引物两端分别加入15 bp和载体上相同的序列。Takara公司提供了In-Fusion引物的网络设计工具:<http://bioinfo.clontech.com/infusion/>。只需输入载体的全部序列和线性化酶切位点以及扩增片段序列,该网页就能够