

Hyper Assembly Cloning Kit Protocol

1. 产品描述

Hyper Assembly Cloning Kit 设计用于快速、定向地将 DNA 的一个或多个目标片段克隆到任何载体中。该方法利用 **Hyper Assembly Enzyme** 的 3'-5' 外切酶活性，在 PCR 产生的插入物和线性化载体的末端获得 15-20bp 的同源臂，然后融合 DNA 片段以获得重组载体；这些 15-20bp 的重叠可以通过设计引物来扩增所需的序列。

- 1) 可在任意载体任意位置插入任意目标序列
- 2) 有效克隆范围广泛的片段大小
- 3) 将多个 DNA 片段同时克隆到任何载体中
- 4) 无需考虑插入片段自身携带的酶切位点

使用本试剂盒的大致流程如 **Figure 1** 所示：

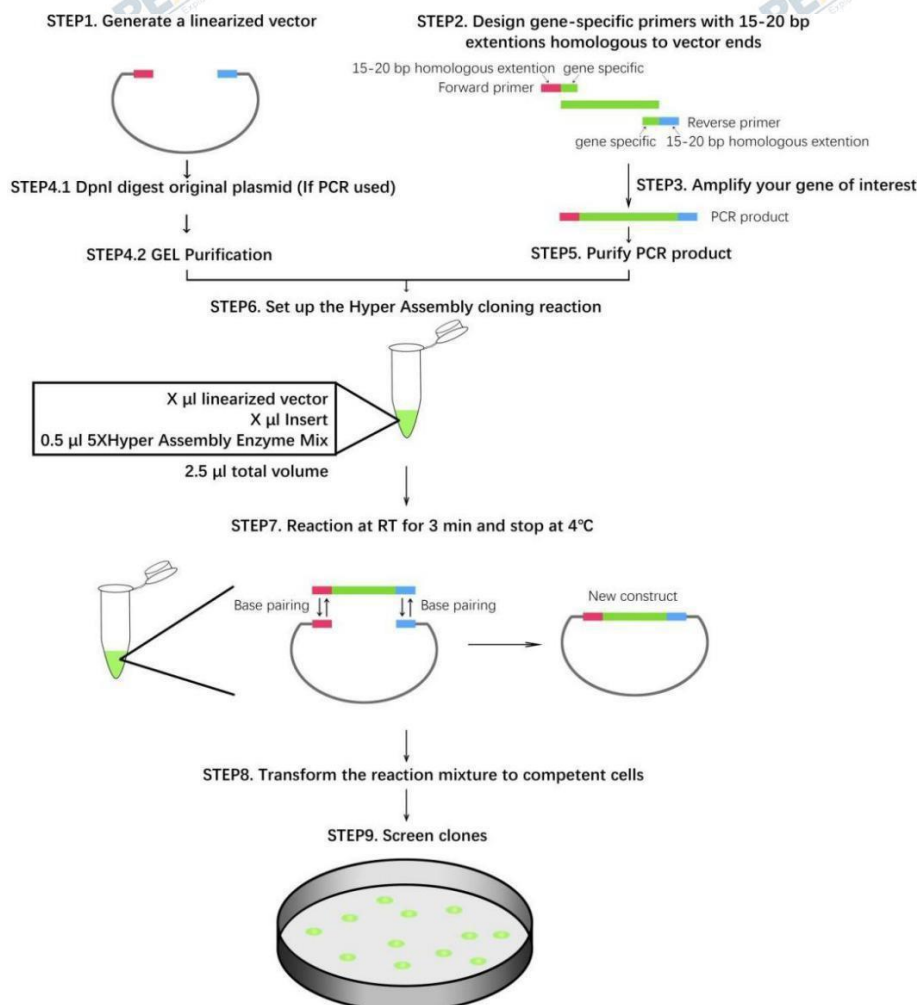


Figure 1. Hyper Assembly Cloning Protocol Overview

2. 试剂盒组分和储存

组分	规格	体积	储存
5×Hyper Assembly Enzyme Mix	25 反应	12.5μl	-20°C
	50 反应	25μl	
	100 反应	50μl	
Dpn 1	20,000 units/ml	5μl	

3. 线性化载体的准备

为了成功实现快速克隆反应，首先要将载体线性化。线性化载体可以用酶切消化（单酶切或双酶切）或 PCR 反应，你可以用高保真性的 Phusion DNA 聚合酶（货号 **K1031**）来扩增线性载体或目标片段。

1) 以限制酶消化的方式准备线性化载体

一般来说，两种酶切得比任何单酶切都好。如果限制位点尽可能地分开，消化效率总是会更好。此外，增加酶消化时间和消化反应体积将减少背景。

a) 对于大多数酶，孵育3小时至过夜的时间可以增加线性化率以及降低背景；

b) 消化后，用PCR纯化试剂盒纯化线性化的载体，Figure 2示例用双酶切(BamHI和XhoI)来线性化载体；

c) 对照组：分别转化5–10 ng线性化载体和纯化载体到感受态细胞以检查背景情况，如果背景很高，继续消化载体更长时间，孵育2小时至过夜，用胶回收纯化剩余的载体并再次转化。

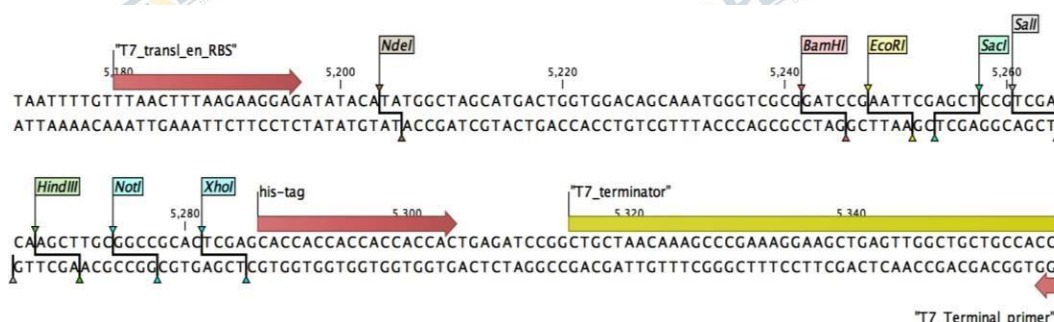


Figure 2: 用双酶切(BamHI和XhoI)线性化载体的例子。产生的线性化载体具有不同的粘性末端

2) PCR方法准备线性化载体

PCR产生的线性化载体是平末端，没有额外的核苷酸残基；线性化载体在纯化PCR产物之前应该先用DpnI处理。用PCR方法准备线性化载体的例子如Figure 3所示。

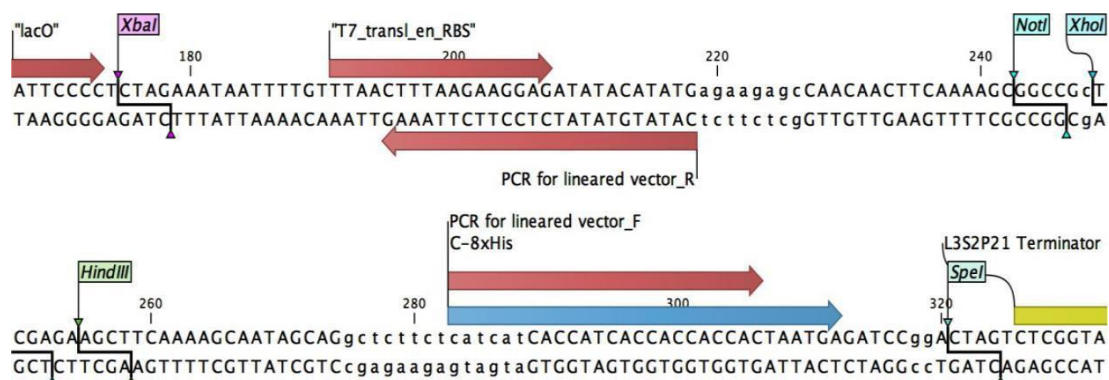


Figure 3: 用于线性化载体的引物设计例子：该载体是平末端。（注意：线性化载体的浓度建议是30ng/μL~50ng/μL）

4. 目标插入物的准备

引物设计及引物质量对于一步法克隆反应至关重要！一步法克隆反应可以连接两个及以上的片段。

例如：载体和插入片段（可能多个片段）只要它们各自两端之间有15-20碱基长度的同源片段就可以；因此，引物设计必须能使产生的片段与线性化载体（或相互之间）两端有同源片段。Figure 4概述了引物设计过程。

通用的引物设计指南：

- (1) 为了使每个引物的15-20bp同源序列能相互结合，从线性化载体的5'端开始，特定引物的同源性区域由与特定DNA链5'端的前15-20个碱基互补的碱基组成。这意味着引物中5'端的序列相对于其互补链是悬置的，但3'端不是。
- (2) 跑琼脂糖凝胶检测PCR产物，如果没有非特异条带，用任意PCR回收试剂盒纯化插入片段；如果出现很多非特异性条带，需要改变PCR条件或者重新设计引物；如果非特异性条带很弱，我们不用胶回收试剂盒来纯化DNA片段，因为此时非特异性条带对一步克隆反应几乎没有影响。总之，在纯化完PCR产物之后，应该用琼脂糖凝胶电泳来检测产物的质量；推荐的插入片段的浓度是80~100ng/μL或更高。

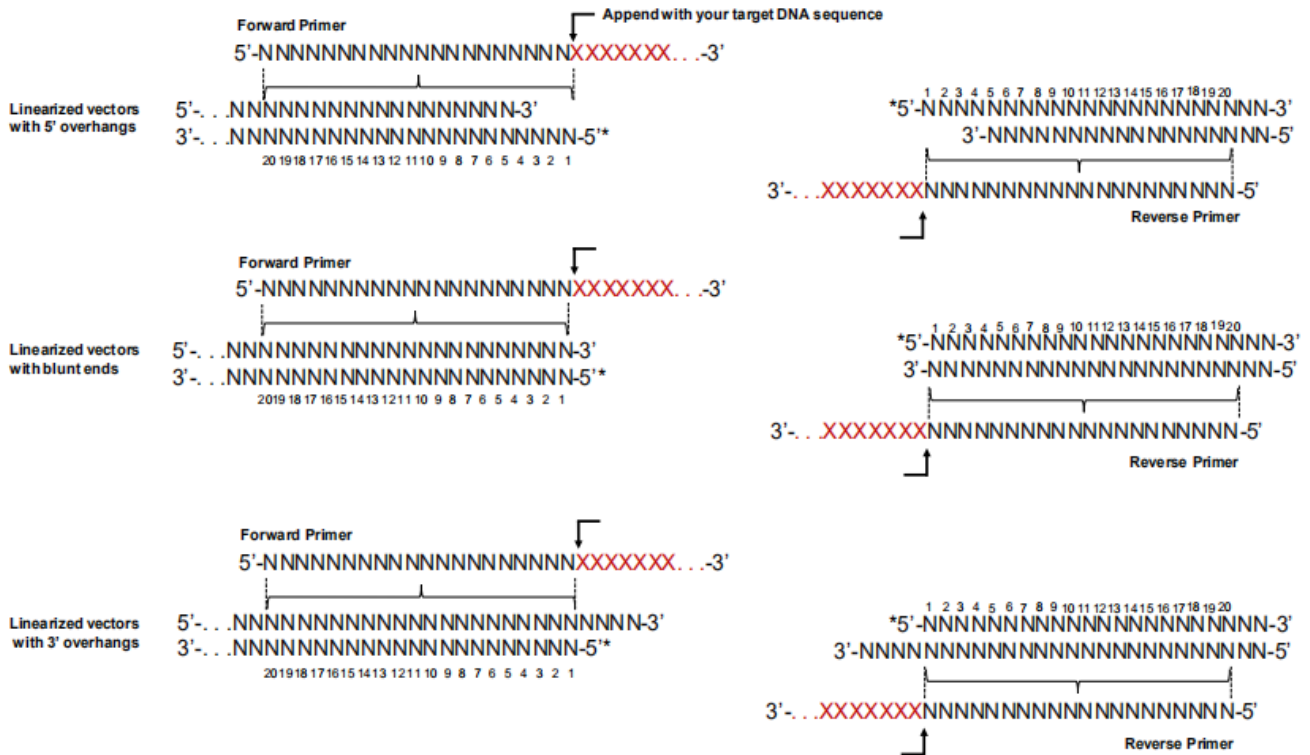


Figure 4. 用于一步法克隆反应的通用引物设计。PCR产生的插入片段需要与相应的线性化载体有15-20bp长度的同源序列，该同源序列通过引物加入到插入片段中；对于有粘性末端的载体，与5'端互补的序列包含在引物中，引物中5'端的序列相对于其互补链是悬置的，但3'端不是；由于Hyper Assembly enzyme有3' -5' 外切酶活性，产物的3'端会被切除，（图中的中“大括号”指示的碱基序列表示15-20bp的同源臂）。

5. 未提供的材料和试剂

- 1) 线性化载体：30~50ng/μL，由限制酶消化或由PCR得来，储存于-20℃。
- 2) PCR产生的靶标插入片段：80~100ng/μL, 储存于-20℃。
- 3) DH5α感受态细胞，储存于-80℃。
- 4) LB培养基，室温。
- 5) LB抗生素板，储存于4℃。

6. 程序

- 1) 一步克隆反应体系：

Linearized vector(30~50ng/μL)	1μL
Target DNA fragment(80~100ng/μL)	1μL
5XHyper Assembly Enzyme Mix	0.5μL
Total	2.5μL

Note:我们推荐线性化载体与插入片段的摩尔比为1:2-5，这样能产生最有效的克隆效率。

2) 阴性对照反应体系:

Linearized vector(30~50ng/μL)	1μL
ddH ₂ O	1μL
5XHyper Assembly Enzyme Mix	0.5μL
Total	2.5μL

Note: 用ddH₂O代替插入片段

- (1) 反应组和阴性对照组反应体系都用移液枪混匀，并在室温反应3分钟，在冰上（或4°C）终止反应；
- (2) 用标准的转化流程将2.5μL反应混合物转化到DH5 α 感受态细胞中，并在平板上37°C过夜培养；
- (3) 第二天，从每个实验板中挑选单独的菌落，用你选择的标准方法分离质粒DNA；为了确定插入物的存在，通过限制性酶消化或PCR筛选来分析DNA（结果应如Figure 5所示）。
- (4) 重组载体的条带应大于空载体，并选择3个移位的重组载体（3个菌落）进行序列。

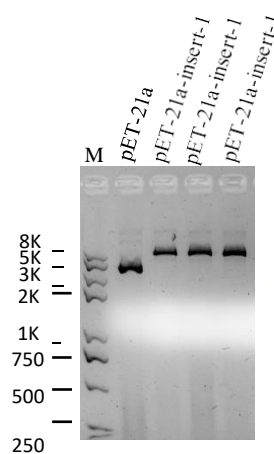


Figure 5. pET-21a是环状空载体，作为阴性对照；pET-21a insert是成功的重组载体（3个菌落）。