Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)

产品目录号：RM20590

产品组分

组分名称	规格 1	规格 2
Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)	100 μL	5 × 100 μL

产品说明

Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)是一种简单、快速且高效的 DNA 无缝克隆试剂。Eco31I，是 BsaI 的同裂酶，与 BsaI 的功能相同。使用 IIS 型限制性内切酶 Eco31 I ，可以将插入片段克隆至合适的载体。其技术基本原理如图 1 所示，在进行 Golden Gate 组装时，在 dsDNA 片段两端加上 Eco31 I 识别位点（GGTCTC）和不同的切割位点序列，由于 IIS 型限制性内切酶识别非回文序列，切割位点在识别序列外部，切割后产生 4 碱基粘性末端指导定向组装，且识别序列在酶切过程中被除去，不会残留在连接产物中，从而酶切反应和连接反应可以同步进行，实现一步无缝连接。本试剂常用于 CRISPR 相关克隆中约 20 bp 的 sgRNA 编码序列的插入，也可用于单片段和多片段的组装，单片段的连接只需连接 15 min，多片段的连接需要 1-2 h。

Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I) 作为新一代的无缝克隆试剂，针对多片段无缝组装反应进行了优化，可以一次实现多至 4 个插入片段的特定顺序组装克隆。2X 预混液包含反应所需的酶和缓冲液成分，可一步实现酶切和连接反应，极大地简化了实验步骤。无缝组装后的产物是完全封闭的双链 DNA，可直接用于下一步 PCR 或其它分子生物学操作。

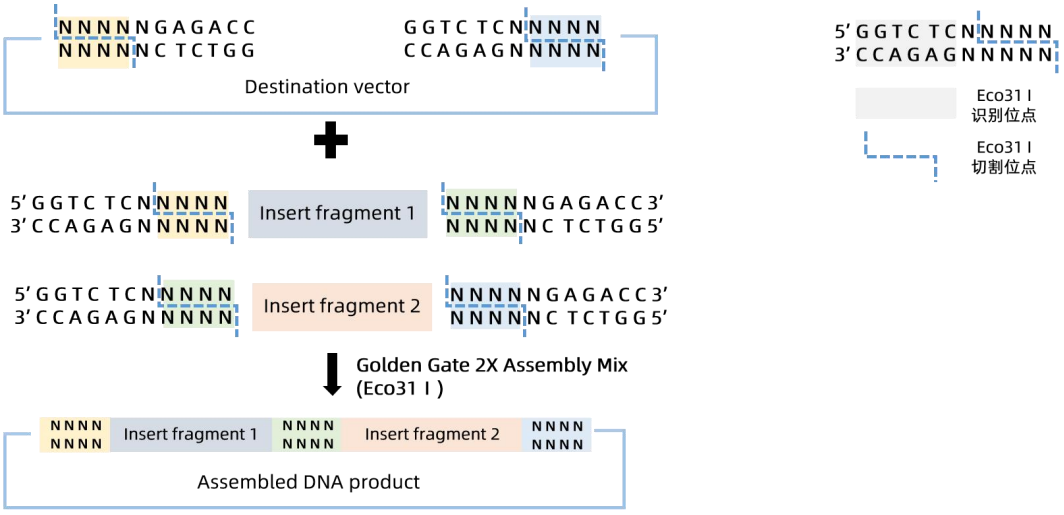

图 1. Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)介导的克隆原理图示

保存条件

置于-20℃ 保存。使用前需完全解冻并摇匀，置于冰上备用，使用过程中避免反复冻融。

产品应用

- CRISPR 相关克隆构建
- 无缝克隆
- 模块化构建
- 文库构建

自备材料

1. 扩增插入片段的模板和引物，线性化载体。
2. DNA 聚合酶，推荐使用高保真 DNA 聚合酶（ABclonal RM20399/RM20398）。
3. DpnI（去除 PCR 产物中的甲基化 DNA 模板）(ABclonal RK21109)。
4. 感受态细胞：常规克隆，质粒<15 kb，推荐使用 DH5α Competent *E. coli* (ABclonal CD001)或其他等效感受态细胞；大片段克隆，质粒>10 kb，推荐使用 XL10 Competent E. coli 或其他等效感受态。
5. 其他材料：无酶水、PCR 管、PCR 仪、带对应抗性的培养平板。

实验流程概要

1. 设计引物，使用高保真 DNA 聚合酶扩增含酶切保护碱基、酶切识别位点、粘性末端的 DNA 片段。
2. 取合适的载体，使用高保真 DNA 聚合酶扩增含酶切保护碱基，酶切识别位点，粘性末端的载体。
3. 琼脂糖凝胶电泳检测及对 DNA 片段浓度定量。
4. 将适量的 DNA 片段、载体，及 Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)混合物在 37°C 孵育 10 min 至 2 h。
5. 反应完成后，将组装产物直接转化 *E.coli* 或用于其它。

实验步骤

1. 线性化载体准备

1）当载体中含有 Eco31 I 的识别位点，且仅含有 2 个 Eco31 I 的识别位点，方向为前：5’-GAGACC-3’，后：5’-GGTCTC-3’时（如图 1 中 Destination vector 所示），载体可直接加入组装反应体系中。

2）当载体中不含 Eco31 I 的识别位点时，可以用反向 PCR 的方法对目的载体进行线性化，反向 PCR 引物需带有酶切保护碱基和酶切识别位点，推荐选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆。使用高保真聚合酶进行 PCR 扩增可以减少扩增突变的引入。50 μL 的 PCR 反应体系中，推荐使用 0.1-1 ng 环状质粒模板，或使用预线性化质粒作为模板，以减少环状质粒模板的残留对克隆阳性率的影响。

2. 引物设计

载体线性化（反向 PCR）/插入片段扩增引物包含 5 个部分，设计方式为：

上游引物：5'-酶切保护碱基+酶切识别位点（GGTCTC）+间隔碱基（1 个 bp）+粘性末端（4 个 bp）+基因特异性正向扩增引物序列-3'

下游引物：5'-酶切保护碱基+酶切识别位点（GGTCTC）+间隔碱基（1 个 bp）+粘性末端（4 个 bp）+基因特异性反向扩增引物序列-3'

3. DNA 插入片段制备

通过 PCR 的方法克隆 DNA 插入片段，在引物 5’和 3’端引入酶切保护碱基，酶切识别位点以及粘性末端碱基，使 PCR 产物能够被 Eco31 I 酶切，且能够产生与其它插入片段或者克隆载体能够使用 T4 连接酶连接的粘性末端序列(4 bp）。引物的 Tm 值 60-65°C 为佳，GC 含量在 40-60%之间为佳；DNA 片段可使用任意 PCR 聚合酶（Taq 酶或高保真酶）扩增，无需考虑 PCR 产物末端有无 dA 尾（组装过程中将被去除，在最终载体中不会出现）。但为了减少扩增突变的引入，推荐使用高保真聚合酶。

4. DpnI 去除甲基化 PCR 模板(可选步骤)

当 PCR 反应中使用甲基化质粒 DNA 模板时，推荐使用 DpnI 酶切 PCR 产物，以去除 PCR 产物中的质粒模板。DpnI 只消化被 *E. coli* Dam 甲基化酶甲基化的质粒 DNA，而不切割未甲基化的 DNA（PCR 产物）。若在质粒模板投入量较低，拷贝数较少时，DpnI 消化步骤可以省略。

5. 线性化载体与插入片段的最佳使用量

ABclonal 推荐：用 0.05 pmol 载体 DNA，0.1 pmol DNA 片段。随着组装片段的数量或长度增加，组装效率会降低。

推荐以下计算公式进行计算：

推荐线性化载体使用量（0.05 pmol）=【0.03x 碱基对数】ng

推荐插入片段使用量（0.1 pmol）=【0.06 x 碱基对数】ng

例如：

① 将长度 2 kb 的片段插入到 5 kb 的载体上，推荐载体用量为 0.03x5000=150 ng，插入片段的用量为 0.06x2000=120 ng。

② 将片段 1 (1 kb) 和片段 2 (2 kb) 插入到 5 kb 的载体上，推荐载体用量为 0.03x5000=150 ng，插入片段 1 的用量为 0.06x1000=60 ng，插入片段 2 的用量为 0.06x2000=120 ng。

注：如果组装片段为 sgDNA 片段（20 bp），推荐插入片段使用量为 4 pmol，4 pmol=【2.4 x 碱基对数】ng

6. 组装反应

在冰上按下表配制反应体系

组分	加入量
载体	X μL
片段	Y μL
Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)	10 μL
ddH_2O	补至 20 μL

插入 1 个片段的反应条件

温度	时间	循环数
37℃	10 min	1
60℃	5 min	1

插入 2 个及以上片段的反应条件

温度	时间	循环数
37℃	1 min	30*
16℃	1 min	
60℃	5 min	1

*，注：推荐循环数 30 个，最多 60 个，不宜再增加。

7. 组装产物转化和鉴定

1）在冰上解冻克隆用的感受态细胞(如：DH5α Competent *E.coli* Strain)；

2）取 5 μL 组装产物加入到 100 μL 感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置 30 min；组装产物转化体积不应超过所用感受态细胞体积的 1/6；

3）42℃水浴热激 45 s 后，立即置于冰上冷却 2-3 min；

4）加入 900 μL SOC 或 LB 培养基(不含抗生素)，37℃摇菌 1 h (转速 200-250 rpm)；

5）4000 rpm 离心 3min，弃掉 800 μL，用剩余的 200 μL 液体重悬，在含有正确抗性的平板上进行涂板培养；

6）37℃过夜培养后，平板上可形成数百个单克隆，挑取若干单克隆进行菌落或菌液 PCR 或一代测序的方法鉴别。

8. 注意事项

为了保证成功的组装和转化，需注意以下操作事项：

细胞：各种感受态细胞的转化效率可能差好几个数量级；克隆的成功率直接与感受态的转化效率相关。

电转：电转可以使转化的效率提高好几个数量级。需对连接产物进行稀释，再进行后续转化涂板。

DNA：若 PCR 产物体积小于 Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)反应总体积的 20%，则 PCR 产物不需纯化即可直接使用。若 PCR 产物体积过高，由于过量的 PCR 反应液和残留的引物影响，会降低 Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)的组装效率和转化效率。此时建议对 PCR 产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶于无酶水中。

插入片段：插入片段的摩尔量是载体的 2 倍可获得较高的连接效率。

生物学因素：一些 DNA 结构，例如反向或串联重复序列，会被 *E.coli* 选择性排斥。有一些重组蛋白可能具有一定的细胞毒性，*E.coli* 不能很好的耐受这些蛋白。这些原因都会导致出现的克隆或者菌落很少。

常见问题及解决方法

1. 引物如何设计？

引物 5 个部分：酶切保护碱基 + 酶切识别位点（GGTCTC） + 间隔碱基（1 个 bp） + 粘性末端 + 基因特异性扩增引物序列。

2. 平板上未长出克隆或克隆数目很少。

- 引物设计不正确：片段之间接续的粘性末端不一致或不匹配；酶切识别位点不正确；GC 含量或 Tm 值不合适。
- 载体和插入片段的 PCR 产物使用量不足/过量，或者比例不佳：尽量按照说明书中推荐的量和比例配制组装反应体系。
- 载体和插入片段不纯，抑制反应：未纯化 DNA 的使用体积不应超过 4 μL (不超过反应总体积的 20%)；建议线性化载体、PCR 产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶于无酶水中。
- 感受态细胞转化效率低：感受态细胞的转化效率应大于 10^7 cfu/μg。组装产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的 1/6，否则会降低转化效率；最好选择克隆用感受态细胞(如 DH5α/XL10)。

3. 多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段。

- PCR 产物中含有非特异性扩增产物：优化 PCR 体系，提高特异性；胶回收 PCR 产物；鉴定更多的克隆。
- 载体线性化不完全：可通过阴性对照检测载体是否线性化完全。
- 反应体系中混入了相同抗性的质粒：PCR 扩增模板为环状质粒时，如扩增产物未纯化直接用于组装反应时推荐 DpnI 酶切，或者对扩增产物进行切胶回收纯化。

4. 菌落 PCR 无条带。

- 引物不正确：推荐使用载体的通用引物进行鉴定（至少使用一条通用引物）。
- PCR 反应体系或程序不合适：没有目的条带也没有空质粒条带，建议优化 PCR 体系、程序；或者提取质粒，以质粒做模板 PCR 验证；或者进行酶切验证。
- 组装失败：只有空质粒的条带，说明组装不成功，载体线化不完全，建议重新进行扩增。

Q&A

1. 可以组装多大的片段？

目前测试结果显示，Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)可以将 2 kb 的片段组装入 5.6 kb 的载体中。

2. 一次反应最多可以组装多少个片段？

一次反应可以组装的 DNA 片段数量依赖于片段的长度和序列。Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)已经被证明可以成功将 10 个 0.25 kb 的片段一次性插入载体中。但推荐一次反应最好不要超过 4 个插入片段，以保证插入片段能正确组装并产生阳性克隆。若多个片段一次反应组装失败，建议分成几步组装，降低单次反应的组装片段数量。

3. 能够使用的最短插入长度是多长？

目前测试的片段中，编码 sgRNA 的 DNA 序列 20 bp 可成功组装，且效率高达 100%。

4. 能够组装≤250 bp 的 dsDNA 片段吗？

可以。当片段大小≤250 bp 时，为了组装效果更佳，插入片段的使用量为载体的 2 倍，连接效率可达到 100%。

5. 可以使用更长或更短的反应时间吗？

可以。当插入单个的片段时，37℃，5 min 的反应时间已经足够。当组装超过 1 个片段时，推荐 30-60 个循环的反应，共 60-120 min 的反应时间。在某些情况下，更长的反应时间可适当地提高组装效率，但是不能超过 60 个循环。

6. 反应可以在其他温度下进行吗？

酶切反应在 37°C 反应时最佳，但是在 16-50°C 也能工作。

7. 可以用 Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I) 的产物来做模板，做后续的 PCR 吗？

可以。组装好的产物是完整的序列，可以用做后续的 PCR 扩增。若最终的产物是个闭合的环形 DNA 分子，那么 Golden Gate 2X Assembly Mix (Eco31 I)产物也可以作为 Rolling-Circle Amplification (RCA)的模板。