

产品组分

组分名称	规格 1	规格 2
Golden Gate 2X Assembly Mix (BsmBI)	100 μ L	5 $\times$ 100 μ L

产品说明

Golden Gate 2X Assembly Mix (BsmBI) 是一种简单、快速且高效的DNA无缝克隆试剂。使用IIS型限制性内切酶BsmBI, 可以将插入片段克隆至合适的载体。在进行Golden Gate组装时, 在dsDNA片段两端加上BsmBI识别位点 (CGTCTC) 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 (BsmBI) 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8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。

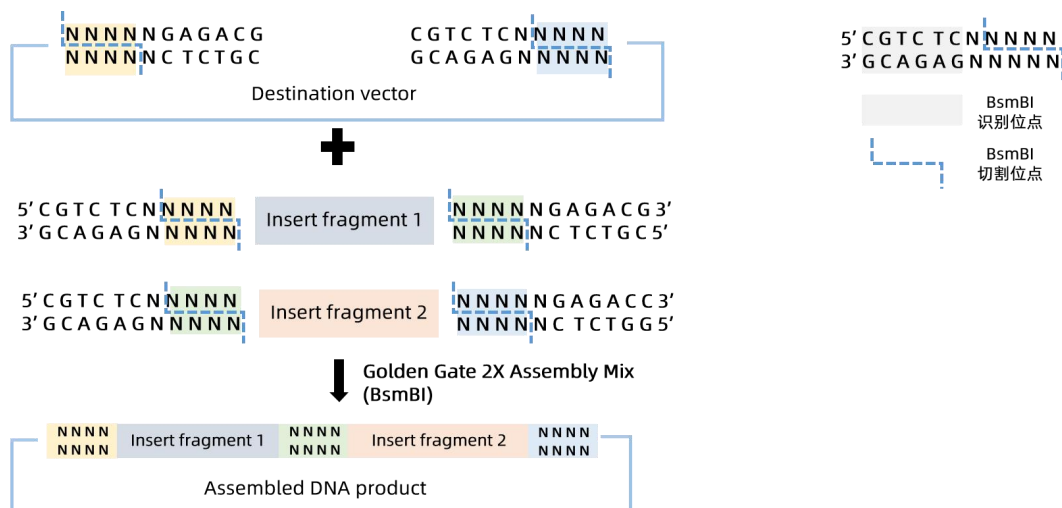


图 1. Golden Gate 2X Assembly Mix (BsmBI) 介导的克隆原理图示

保存条件

置于-20°C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 DH5 α 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 (BsmBI) 混合物在 42°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 BsmBI 的识别位点，且仅含有 2 个 BsmBI 的识别位点，方向为前：5'-GAGACG-3'，后：5'-CGTCTC-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 BsmBI 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 μ L 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（CGTCTC）+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（CGTCTC）+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 BsmBI 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 μ L
片段	Y μ L
Golden Gate 2X Assembly Mix (BsmBI)	10 μ L
ddH ₂ O	补至 20 μ L

插入 1 个片段的反应条件

温度	时间	循环数
42°C	10 min	1
60°C	5 min	1

插入 2 个片段的反应条件

温度	时间	循环数
42°C	1 min	} 30*
16°C	1 min	
60°C	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：DH5 α Competent *E.coli* Strain）；
- 2) 取 5 μ L 组装产物加入到 100 μ L 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°C 水浴热激 45 s 后，立即置于冰上冷却 2-3 min；
- 4) 加入 900 μ L SOC 或 LB 培养基(不含抗生素)，37°C 摇菌 1 h（转速 200-250 rpm）；
- 5) 4000 rpm 离心 3min，弃掉 800 μ L，用剩余的 200 μ L 液体重悬，在含有正确抗性的平板上进行涂板培养；
- 6) 37°C 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 (BsmBI) 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 (BsmBI) 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（CGTCTC）+ 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：片段之间连接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 DH5 α /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，载体线性化不完全，建议重新进行扩增。

Q&A

1. 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 (BsmBI) 已经被证明可以成功将 8 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。

2. 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%。

3. 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%。

4. 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，42°C，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。

5. 反应可以在其他温度下进行吗？

酶切反应在 42°C 反应时最佳，但是在 16-50°C 也能工作。

6. 可以用 Golden Gate 2X Assembly Mix (BsmBI) 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 (BsmBI) 产物也可以作为 Rolling-Circle Amplification (RCA) 的模板。