

# Golden Gate Assembly Kit (BsmBI)

REF: EG25207-V/S

## 储存条件

-20°C 保存 2 年

## 产品组成

组分	规格 V	规格 S
Golden Gate Mix (BsmBI)	10 µl	50 µl
10× T4 DNA Ligase Buffer	1 ml	1 ml

## 产品简介

Golden Gate Assembly Kit 为系列产品，包括几种不同 Type IIS 型限制酶，本产品采用的限制酶为 BsmBI。该系列产品均基于 Golden Gate Assembly 原理，即通过 Type IIS 限制酶独特的切割特点得到想要的粘性末端并通过 T4 DNA Ligase 对其进行连接。尤其擅长组装难以克隆的序列，如重复序列、高 GC 序列、TAL (transcription activator-like) 效应基因、超短序列 (< 100 bp) 等。

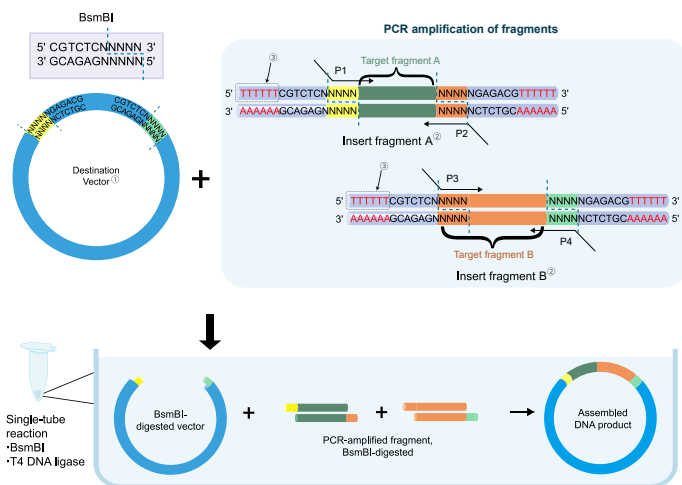
Type IIS 型限制性内切酶与传统的限制酶不同，它识别非回文序列并在距其识别位点下游一定距离的位置切割 DNA，会在识别序列外切割出任意的粘性末端，因此可以定制切割序列。

克隆过程如下：在目的基因切割位点外设计 IIS 型限制酶识别位点，酶切后该识别位点被消除，不会出现在插入片段中，因此插入片段与载体连接后不会被二次切割；载体上含有与目的基因的切割位点互补的粘性末端，可以与之进行连接且不会引入新的序列，从而实现无缝克隆。

基于上述原理的 Golden Gate Assembly Kit (BsmBI)，包含酶切连接所需要的酶，且以 Mix 形式出现，加样更便捷，单次反应最高可进行 16 个片段的连接，充分满足各种实验需求。

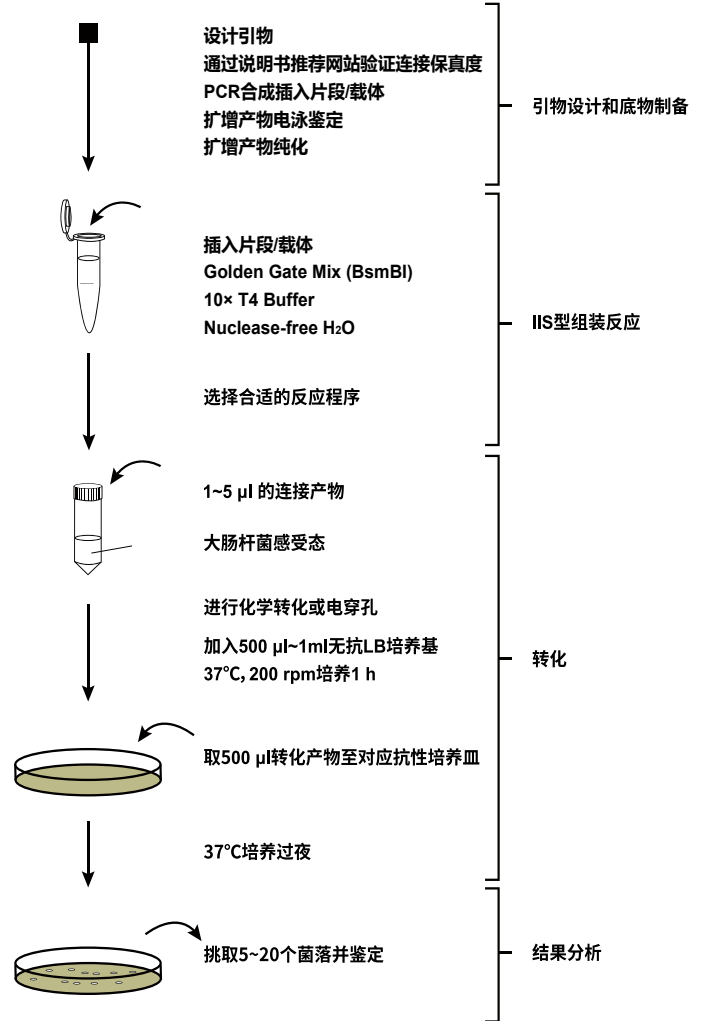
## 实验原理

### 1. 以单个 DNA 片段的插入为例：



注 1：此处的载体通过酶切得到，需选择带有 BsmBI 酶切位点的载体。除此之外，载体还可以通过 PCR 获得，引物设计见下文。  
 注 2：插入片段通过 PCR 方式获得，需将酶切位点通过引物加入片段末端。推荐使用高保真酶 (REF: EG24110) 扩增，保证扩增产物正确性。  
 注 3：红色的“TTTTTT”为保护碱基示意，可根据不同酶进行调整，推荐使用 6 个。  
 注 4：上图仅展示了单片段的连接过程，更多片段的连接原理与之一致，只需改变粘性末端的序列即可增加连接片段数。

## 实验流程



## 注意事项

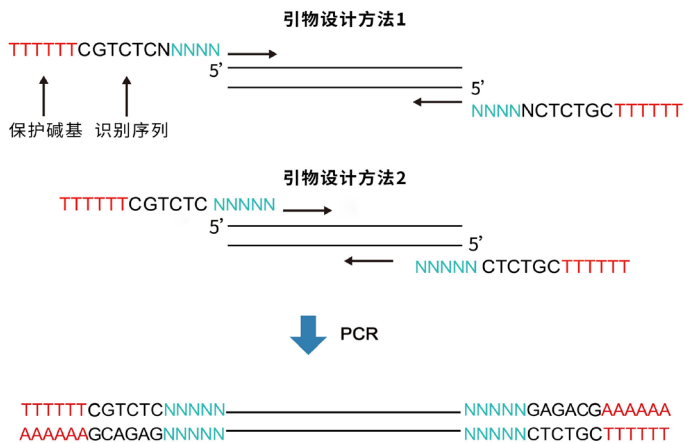
- 克隆效率受插入 DNA 的类型、数量和大小影响很大。虽然可以优化实验条件，但部分外源 DNA 的细胞毒性和胞内重组无法完全避免。
- 连接反应所需片段通常 PCR 获得，但也可以通过预克隆或者合成获得。但无论哪种方式，必须保证相邻的片段间的酶切位点方向的正确性，以保证酶切产生的末端可准确连接。
- 使用 Golden Gate Assembly Kit 可以轻松组装重复或很短的难克隆序列，但随着克隆片段数的增加，克隆效率会逐渐下降。克隆片段超过 10 个时，克隆效率显著下降。为保证获得目标连接产物，建议挑取并筛选 20 个左右的菌落。

4. 预克隆的 DNA 片段相较于 PCR 扩增获得的片段克隆效率更高，尤其是组装超过 80% 同源性的重复序列时。

5. 推荐使用 PCR 仪进行热循环反应，并选择正确的反应程序，以保证反应顺利进行。

## 引物设计指南

通过 PCR 引入 BsmBI 的识别序列，识别序列加在引物的 5' 端，为确保限制酶能稳定结合到 DNA 双链上并发挥切割作用，需在识别序列末端加上保护碱基。保护碱基的数量和种类不固定（具体可查看愚公《限制酶实用手册》），推荐保护碱基为 6 bp，可以保证大部分普通酶切。由于切割位点在识别序列下游且可以是任意序列，因此有 2 种常见的引物设计方法，如下图所示：



引物设计方法 1：此种引物设计方法为保护碱基与酶切位点即“TTTTTTCGTCTC NNNNN”均通过引物引入，其他序列则为插入片段上的序列（且必须大于 15 bp），两部分共同构成引物。

引物设计方法 2：此种引物设计方法为保护碱基与识别序列即“TTTTTTCGTCTC N”通过引物引入，而“NNNN”则是插入片段的序列。

注 1：两种引物设计主要区别在于“NNNN”是否是插入片段中的序列。为保证无缝克隆，若插入片段与载体均通过 PCR 获得，则“NNNN”必须是片段或者载体（二选一）中的序列，即片段与载体需用两种不同的引物设计方式获得。

注 2：用于连接的粘性末端“NNNN”的序列对连接特异性存在较大影响，虽然理论上存在 256 种组合，但需排除回文序列。推荐使用以下网址中的工具进行粘性末端设计：<https://goldengate.neb.com/#/>。

此外，引物设计还需注意以下几点：

(1) 为保证扩增正确性，通常要求扩增产物 < 5 kb，以此为前提设计引物；

(2) 与模板配对的引物部分 Tm 值应在 58~60°C 之间，此时扩增效果最好；

(3) 引物内和引物间不能包含互补序列，以避免发夹形成；

(4) 引物的质量对后续连接的影响巨大，即使连接所需的粘性末端只有一个碱基发生突变，也可能导致连接失败，建议选择可靠的基因合成公司。

## PCR 注意事项

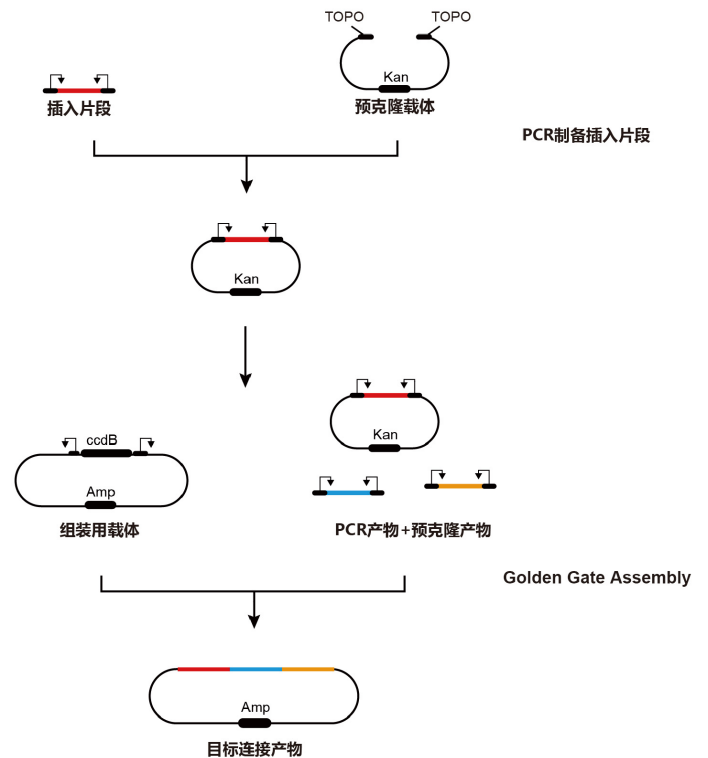
1. 建议针对每个片段优化 PCR 条件，以确保单一的 PCR 产物；
2. 若 PCR 获得多个条带，必须凝胶纯化目标 DNA。否则将导致组装失败或克隆效率大大降低。胶回收 DNA 时，尽量减少紫外切胶的时间，或选择蓝光切胶，以减少紫外线对 DNA 的损伤；
3. 长片段 DNA (> 5 kb) 在胶回收时更容易被损伤，因此推荐使用多个小片段进行连接，而不是单个大片段；
4. 使用 ddH<sub>2</sub>O 或 10 mM Tris 缓冲液 (pH 8.0) 洗脱 DNA，避免使用 TE 缓冲液洗脱 DNA，以防止对下游连接产生抑制；
5. PCR 产物可以未经纯化直接用于连接反应，但一般只限于单片段克隆。多片段的连接仍需对 PCR 产物进行纯化。

## 预克隆指南

预克隆即将 PCR 获得的 DNA 片段插入到一个中间载体（预克隆供体载体，通常在 3 kb 左右），然后将其与其他插入片段一同加入 Golden Gate 体系中完成最终组装。

预克隆一般通过 TOPO 克隆完成，将 PCR 产物通过拓扑异构酶连接到 TOPO 载体上，载体含有选择基因供我们筛选阳性克隆。预克隆方法并不固定，可根据您的习惯自行选择克隆手段。

以下 TOPO 克隆进行预克隆流程示例：



注 1：片段与载体中的黑色箭头代表限制酶酶切方向，从识别位点指向切割位点。  
注 2：ccdB 是一种大肠杆菌致死基因，无外源基因插入时致死，插入片段可破坏 ccdB 基因的表达，从而在转化时仅允许含插入片段的菌落生长。

对于超过 80% 一致性的重复 / 同源序列，推荐使用预克隆；  
当插入片段数 > 5 时，建议使用预克隆分步克隆至目标载体。

## 使用方法

1. 于冰上配制如下反应体系：

组分	连接反应	负对照 <sup>a</sup>
载体	0.05 pmol <sup>b</sup>	0.05 pmol
插入片段	0.1 pmol <sup>c</sup>	/
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl	2 μl
Golden Gate Mix (BsmBI)	1 μl	1 μl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	To 20 μl	To 20 μl

a. Golden Gate Assembly 通常不要求负对照。如果需要，可设置不加插入片段的反应体系为负对照。

b. 对于 2000 bp 的载体，0.05 pmol 用量为 60 ng，其他长度可根据这个比例自行计算；

c. 摩尔比为片段：载体=2:1，所有插入片段之间比例为 1:1；当片段大于载体时，二者用量互换。

**注：片段越多，连接效率和阳性率越低；片段或载体过长，连接效率也会下降。**

按上述体系配制完成后，涡旋混匀，于 PCR 仪中进行反应，反应程序根据片段数按下文推荐程序选择。

2. 推荐反应程序：

插入片段数量	反应程序
1	42°C, 5 min→65°C, 5 min
2~4	42°C, 1 h→65°C, 5 min
5~10	(42°C, 1 min→22°C, 1 min)*30~60→65°C, 5 min

**注：对于 10 个以上的片段组装，虽可实现单次成功组装目标片段，但阳性率和菌落数会出现显著下降，为保证实验成功率，对于 10+ 的组装场景，建议分次组装。**

可选恒温程序：

插入片段数量	反应程序
1	30°C, 5 min→65°C, 5 min
2~10	30°C, 1~2 h→65°C, 5 min

**注：恒温反应对于简单场景如单片段反应效率无影响，对于多片段则会随片段增多而出现一定程度效率下降，但对于 2~5 片段仍可维持 70% 以上效率，在条件允许时，建议优先使用变温程序。**

3. 反应结束后，可以直接用于转化，或者 -20°C 保存备用。

4. 重组产物转化

取 5~10 μl 反应液，加入到 100 μl 感受态细胞中，缓慢吸打混匀，冰上放置 30 min。42°C 热激 45~60 sec，冰浴 5 min。加 500 μl SOC 或 LB 培养基，37°C 振荡培养 40~60 min (200 rpm)。将菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上，倒置于 37°C 过夜培养。

**注 1：不同感受态细胞最后的克隆阳性率会有所差别，推荐使用转化效率 > 10<sup>8</sup> CFU/μg 的感受态细胞；**

**注 2：菌落数取决于 PCR 产物与线性化载体的数量和纯度；**

**注 3：阳性对照平板通常生长大量白色单菌落，阴性对照平板只生长很少的菌落。**

5. 阳性克隆检测

克隆完成后，需对产物进行筛选鉴定，一般有酶切与 PCR 两种方法。

**酶切：**挑取 5~20 个菌落至 1 ml 对应抗性的 LB 培养基中过夜培养，第二天提取质粒，选择合适的限制酶进行酶切，并通过琼脂糖电泳对酶切结果进行分析，筛选得到目标质粒。

对于常规片段连接，5~10 个菌落已可以筛选到目标产物，而重复 / 同源序列或超过 10 片段的连接，则需要 20 个菌落以筛选正确连接产物。

**PCR：**

(1) 设计合适的检测引物，根据插入片段长度灵活设计扩增产物长度。对于单片段插入，一般要求扩增长度在 500 bp~2 kb 之间，正向引物与反向引物分别设计在载体与片段上。对于多片段插入，则正反向引物均设计在载体上，扩增插入片段全长。

(2) 挑取 5~20 个菌落至 1 ml 对应抗性的 LB 培养基中过夜培养，将培养产物分别取 1 μl 至 PCR 体系中（30 μl PCR 体系即可满足扩增需求）。

(3) 扩增程序在常规 PCR 基础上将第一步变性由 95°C 3 min 延长至 95°C 10 min，其余步骤保持不变。扩增完成后进行琼脂糖电泳检测扩增产物是否正确。

(4) 选择扩增正确的菌液进行质粒提取，获得目标连接产物。（推荐对正确的连接产物进行进一步的测序验证，防止 PCR 扩增时出现错误）。

## 常见问题与解决办法

问题描述	原因	解决方法
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或妥善保存的感受态细胞。
	DNA 片段比例不佳	按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。载体和插入片段的浓度测定：若线性化载体与插入片段已经过纯化，且经电泳检测条带单一或无弥散时，可使用微量核酸蛋白检测仪等基于分光光度法的仪器进行浓度测定，但只有当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时浓度值可信；若线性化载体与插入片段未经过纯化，也可使用琼脂糖电泳测定样品浓度。
	DNA 片段纯度不够	对载体和插入片段进行纯化。由于 EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应，因此纯化产物应溶解于 ddH <sub>2</sub> O 中，切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。
	反应产物过量	在转化体系中，无缝克隆反应产物体积不应超过感受态细胞体积的 10%。
	片段过长或过多	Golden Gate Assembly 通常可以较好地完成 10 片段以下的连接，但是当片段过长时，连接效率会显著下降；同时超过 10 片段时连接效率也会较低。推荐用于不超过 10 kb 的连接场景。

续表：

## 常见问题与解决办法

问题描述	原因	解决方法
大量克隆不含插入片段	载体线性化不完全	酶切制备线性化载体时，提高快速内切酶的使用量，延长反应时间，使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时，使用预线性化质粒作为扩增模板，使用 DpnI 等甲基化敏感型内切酶对扩增产物进行处理，或对产物进行胶回收纯化。
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素，并使用新鲜制备的抗生素平板。
	接头设计存在问题	不同粘性末端连接效率不同，接头设计不准确可能导致非特异性连接。建议通过相关软件提前预测连接保真度，减少非特异性扩增产生的可能。
大量克隆含有不正确插入片段	非特异性 PCR 扩增产物	优化 PCR 体系，提高扩增特异性，或胶回收纯化 PCR 产物重叠序列的扩增引物。
	接头设计存在问题	当连接片段较多时，接头种类对连接正确率的影响较大，很可能产生非特异性连接。建议通过相关软件提前预测连接保真度，减少非特异性扩增产生的可能。
	片段或载体扩增发生错误	由于该连接依赖于 4 碱基的粘性末端，对扩增的保真度要求较高，碱基突变会导致连接错误或无法连接。推荐使用高保真酶进行连接底物的扩增。

## FAQs

### 1. 单次反应可以组装的片段数量上限是多少？

目前测试的单次最大组装片段数是 15，但菌落数和阳性率已降低至很低水平，为确保您的实验成功，建议单次组装不超过 5 个片段。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. 插入片段的长度范围是多少？

目前测试的可插入片段长度范围为 20 bp~10 kb，片段越长，克隆效率越低，建议片段加载体的总长度控制在 13 kb 以下。

### 3. 可以延长或缩短反应时间吗？

可以。组装单个片段时，42°C，5 min 已经足够产生相当多的转化子；组装多个片段时，推荐 30~60 个循环的反应，可根据连接效果适当调整循环数，但不建议超过 60，超过此循环数并不会增加连接效果，反而存在非特异性组装的风险。

### 4. 反应程序中 65°C，5 分钟的孵育步骤目的是什么？

65°C 条件下 T4 DNA 连接酶无法进行连接反应，而限制酶仍可消化未被用于组装的质粒，从而降低空白质粒背景。

### 5. PCR 产物是否可以不纯化直接用于组装反应？

可以，但一般仅用于单片段组装且加入量不建议超过 1μl。未纯化的 PCR 产物含有 DNA 聚合酶，可能会补齐 Type IIS 限制酶酶切产生的粘性末端导致非特异性连接，同时残留的 DNA 聚合酶可能和连接酶产生竞争导致连接效率下降；另外 PCR 产物可能含有非特异性扩增或引物二聚体，同样会导致目标之外的连接产物。

### 6. Golden Gate Assembly 的产物能否作为模板进行后续的 PCR？

可以，组装产物存在闭合环状双链 DNA，可以用于后续 PCR 扩增，同样也可以用于其他 DNA 扩增技术，如滚环扩增等。

### 7. 如果插入片段内部含有 BsmBI 酶切位点如何解决？

需对插入片段中的 BsmBI 位点进行同义突变；或对序列进行酶切位点分析，更换其他不含酶切位点的 Type IIS 型限制酶，如 BbsI (REF: EG24512)，BsaI (REF: EG15518)，BspQI (REF: EG23503)。需注意本试剂盒不适用于其他 Type IIS 型限制酶，仅用于 BsmBI。

### 8. 如何选择合适的 Golden Gate Assembly 试剂盒？

这取决于插入片段中有哪些 Type IIS 型限制酶的识别位点。由于内部位点需要通过点突变消除，因此选择基于插入片段中没有或识别位点最少的 Type IIS 型限制性内切酶的试剂盒。

### 9. 该试剂盒的性能与使用 IIS 型限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶普通构建相比如何？

该试剂盒针对 Golden Gate Assembly 进行了专门的优化，充分满足 10 片段及以下的连接反应，效率更高更方便。

### 10. 哪些因素影响 Golden Gate Assembly 效率？

插入片段数量，片段长度，底物纯度均会影响连接效率。推荐使用 10 kb 以内的片段进行连接反应，同时使用经纯化过的底物。

### 11. 预克隆的优势是什么，什么情况下建议进行预克隆？

预克隆的插入片段保存于环状质粒中，相较于 PCR 产物更稳定，可实现插入片段的长期储存。当插入片段较多或较长时，建议进行预克隆分步组装，虽然会增加实验周期，但成功率会更高。