

Golden Gate Assembly Kit (Bpil)

REF: EG25209-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 (Bpil)	10 μ l	50 μ l
10 $\times$ 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 Bpil。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。

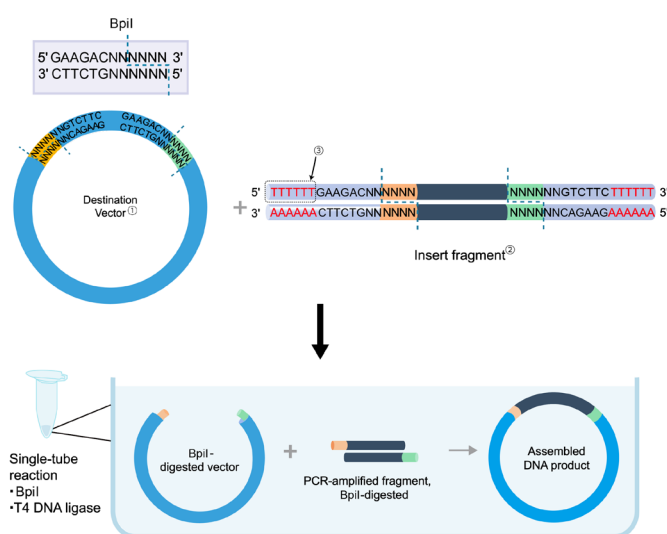
Type IIS 型限制性内切酶与传统的限制酶不同，它识别非回文序列并在距其识别位点下游一定距离的位置切割 DNA，会在识别序列外切割出任意的粘性末端，因此可以定制切割序列。

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 (Bpil)，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：



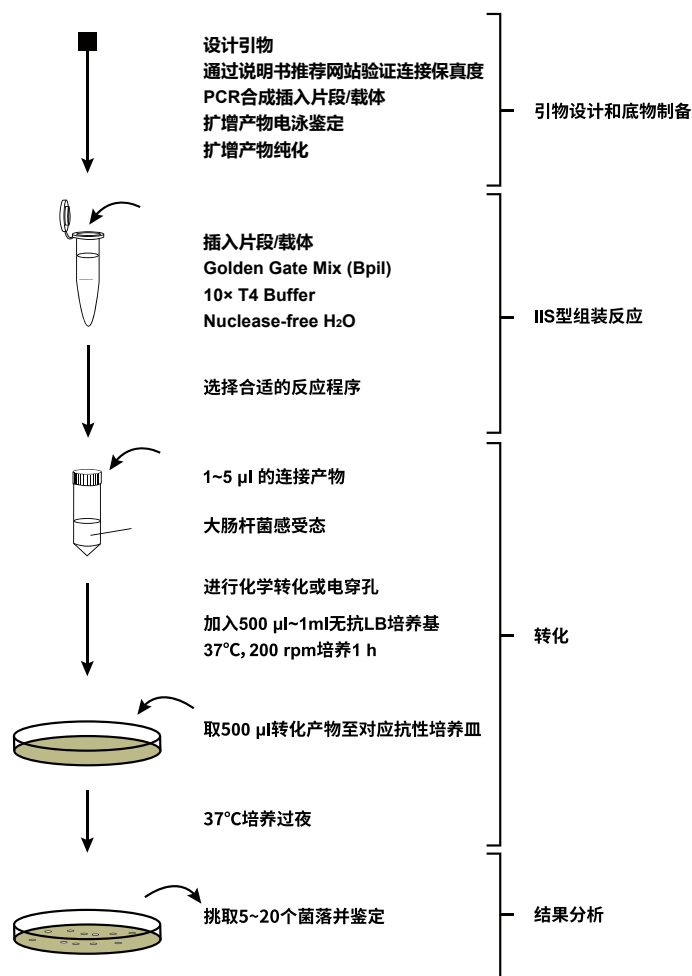
注 1：此处的载体通过酶切得到，需选择带有 Bpil 酶切位点的载体。除此之外，载体还可以通过 PCR 获得，引物设计见下文。

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

1. 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。

2. 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。

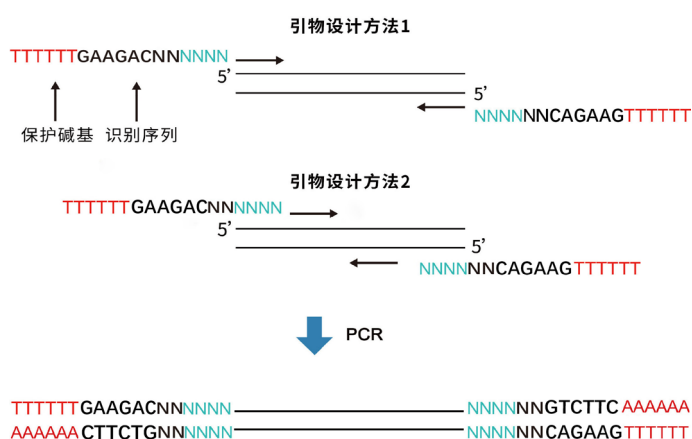
3. 使用 Golden Gate Assembly Kit 可以轻松组装重复或很短的难克隆序列，但随着克隆片段数的增加，克隆效率会逐渐下降。克隆片段超过 10 个时，克隆效率显著下降。为保证获得目标连接产物，建议挑取并筛选 20 个左右的菌落。

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 **BpiI** 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“TTTTTTGAAGACNNNNNN”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“TTTTTTGAAGACNN”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.nep.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 $< 5 \text{ kb}$ ，以此为前提设计引物；

(2) 与模板配对的引物部分 T_m 值应在 $58\sim 60^{\circ}\text{C}$ 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 ddH₂O 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;

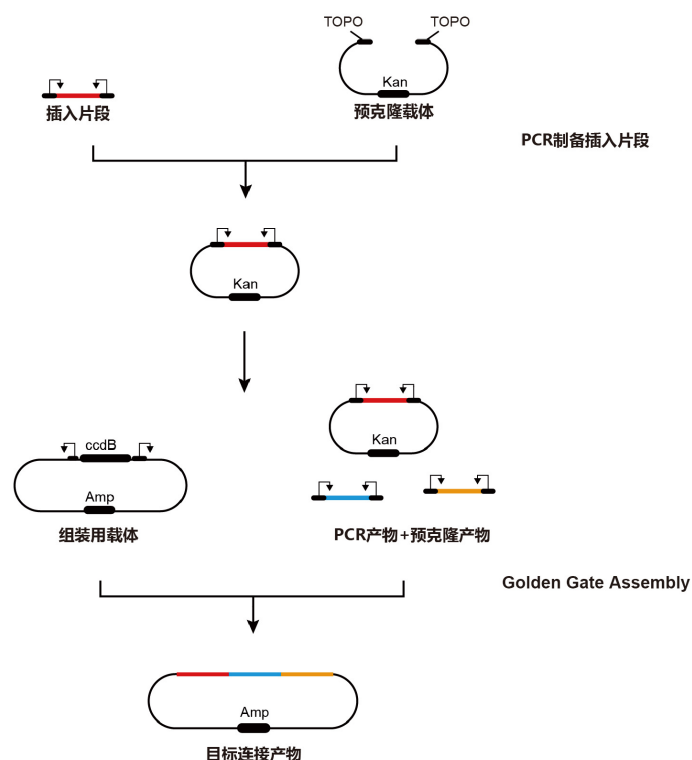
5. PCR 产物可以未经纯化直接用于连接反应，但一般只限于单片段克隆。多片段的连接仍需对 PCR 产物进行纯化。

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。

以下以 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 ^a
载体	0.05 pmol ^b	0.05 pmol
插入片段	0.1 pmol ^c	/
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl	2 μl
Golden Gate Mix (Bpil)	1 μl	1 μl
Nuclease-free H ₂ 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	37°C, 5 min → 65°C, 5 min
2~4	37°C, 1 h → 65°C, 5 min
5~10	(37°C, 1 min → 22°C, 1 min) × 30 → 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 s，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

> 10⁸ 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 ₂ 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，37℃，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℃，5 分钟的孵育步骤目的是什么？

65℃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 1 μl。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 BpiI 酶切位点如何解决？

需对插入片段中的 BpiI 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 BsmBI (REF: EG22507)，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 BpiI 或 BbsI (BpiI 与 BbsI 是完全同裂酶)。

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。