

Golden Gate 组装试剂盒 (BsmBI)

货号: D1224

存储条件: -20°C, 有效期 2 年

产品组分

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

产品说明

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。此方法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。

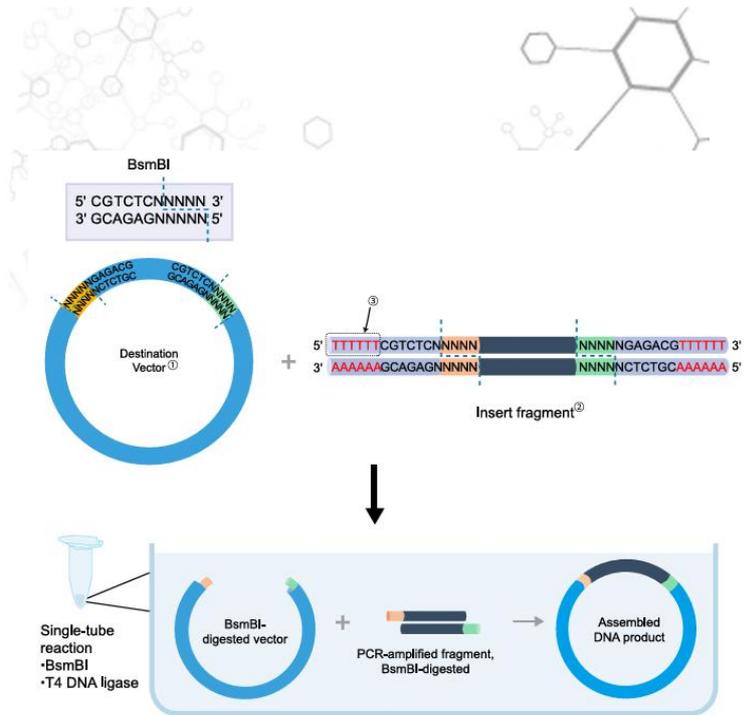
克隆过程如下: 在目的基因切割位点外设计 IIS 型限制酶识别位点酶切后该识别位点被消除, 不会出现在插入片段中, 因此插入片段与载体连接后不会被二次切割; 载体上含有与目的基因的切割位点互补的粘性末端, 可以与之进行连接且不会引入新的序列, 从而实现无缝克隆。

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。

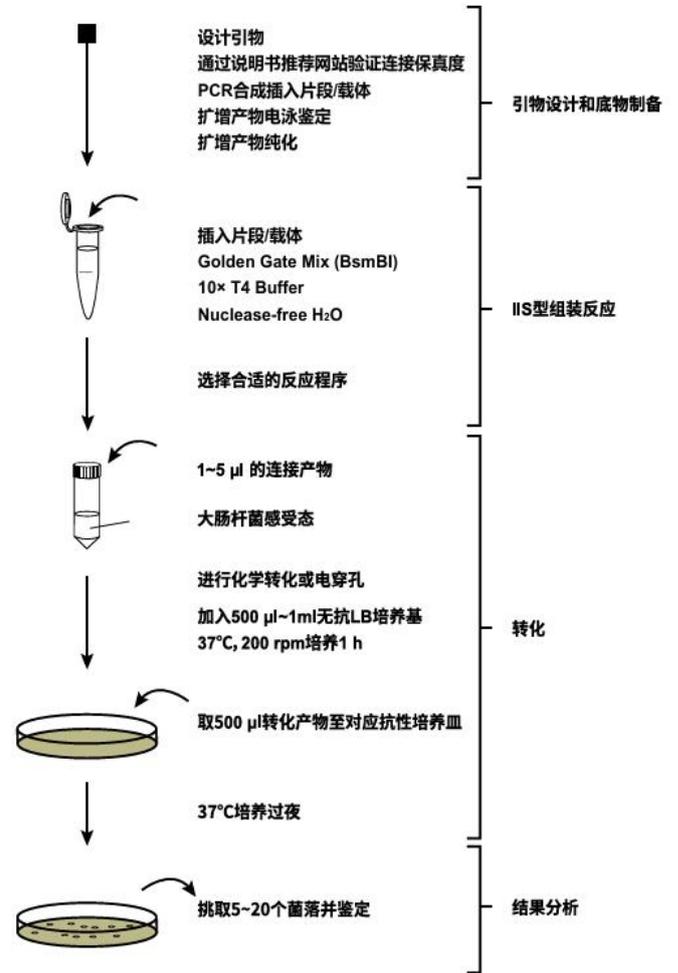
实验原理

注意:

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。
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: T1211) 扩增, 保证扩增产物正确性。
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。
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。

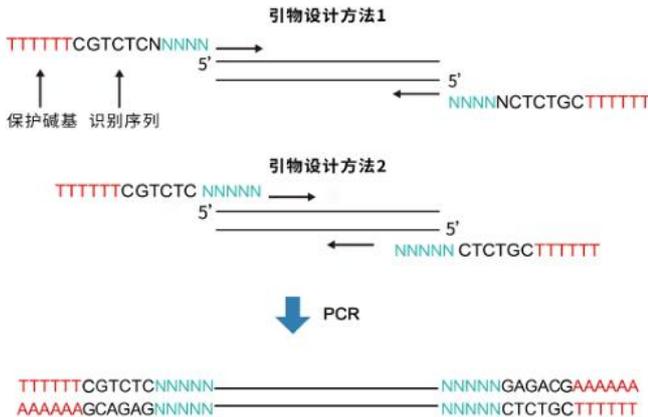


实验流程



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(具体可查看兰博利德《快速内切酶使用指南》)，推荐保护碱基为 6bp，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 <5kb，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

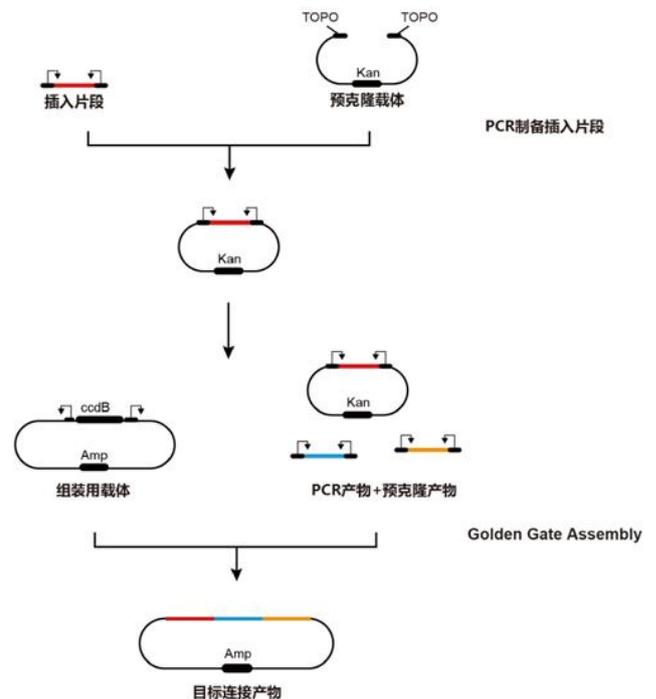
1. 建议针对每个片段优化 PCR 条件，以确保单一的 PCR 产物；
2. 若 PCR 获得多个条带，必须凝胶纯化目标 DNA。否则将导致组装失败或克隆效率大大降低。胶回收 DNA 时，尽量减少紫外切胶的时间，或选择蓝光切胶，以减少紫外线对 DNA 的损伤；
3. 长片段 DNA(>5 kb)在胶回收时更容易被损伤，因此推荐使用多个小片段进行连接，而不是单个大片段；
4. 使用 ddHzO 或 10 mM Tris 缓冲液(pH 8.0)洗脱 DNA，避免使用 TE 缓冲液洗脱 DNA，以防止对下游连接产生抑制；
5. PCR 产物可以未经纯化直接用于连接反应，但一般只限于单片段克隆。多片段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

实验步骤

1、于冰上配置以下反应体系:

组分	连接反应	负对照 ^a
载体	0.05 pmol ^b	0.05 pmol
片段	0.1 pmol ^c	-
10× T4 DNA Ligase Buffer	2μl	2μl
Golden Gate Mix (BsmBI)	1μl	1μl
Nuclease-free H2O	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、推荐的反应程序

插入片段数	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	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° 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 45~60sec, 冰浴 5 min。加 500μl SOC 或 LB 培养基, 37°C 振荡培养 40~60min(200rpm)。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 > 10⁶ CFU/ug 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 500bp~2kb 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 1M 至 PCR 体系中(30I PCR 体系即可满足扩增需求)0

(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)。

