



Gibson Assembly Nova[®]

[®]
重组试剂盒使用说明书

无缝克隆与多片段 DNA 组装完整方案

基于等温反应的多片段 DNA 组装技术

唯地生物 2× Gibson Assembly Nova Mix 货号#: A2011S/M/L, 20/50/250 reactions

Version 2.0

目录

1. GibsonAssembly背景及原理	1
1.1. 技术背景.....	1
1.2. 反应原理.....	1
2. 试剂盒组成部分	1
3. 常规实验流程	2
4. 重组片段的获取	2
4.1. PCR 扩增法获取片段（一般为插入基因或反向 PCR 扩增载体）	2
4.2. 酶切获取线性化片段（一般为载体）	4
4.3. 片段回收.....	4
5. 片段浓度的确定	4
5.1. OD260 法测定浓度.....	5
5.2. 琼脂糖凝胶电泳法估算浓度.....	5
6. 重组反应与操作	6
6.1. 片段用量粗略计算.....	6
6.2. 反应体系的配制	6
6.3. 反应条件	6
6.4. 转化步骤	6
7. 重组产物的鉴定	7
8. 操作注意事项	7
8.1. 反应配制注意事项	7
8.2. DNA 质量注意事项	7
9. 常见问题排查	7
10. 附录.....	9
10.1. 常见抗生素，工作原理，使用浓度等	9
10.2. 摩尔数的计算.....	9
10.3. 酶的星号活（E.coRI 和 BamHI）	10
11. 参考文献	10

上海唯地生物技术有限公司，专注成就卓越。

电话：021-34790199

网址：www.weidibio.com

邮箱：sales@weidibio.com

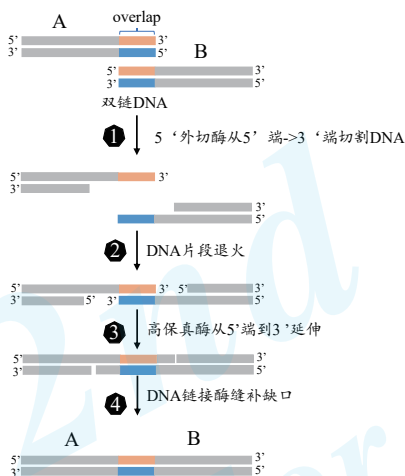
1. Gibson Assembly背景及原理

1.1. 技术背景

Gibson Assembly 是由 Daniel G. Gibson 博士于 2009 年在 J. Craig Venter 研究所开发的一种新型分子克隆方法。该方法允许在单管等温反应中将多个线性 DNA 片段无缝连接在一起，无论片段长度或末端兼容性如何。这一方法已被合成生物学领域广泛采用，因其操作简便、灵活性高且适合大片段 DNA 构建。

与传统的限制性内切酶/连接酶克隆方法相比，Gibson Assembly 具有以下显著优势：无需特定的限制性内切酶位点；可以连接任意两个片段，不受序列限制；连接处无疤（scarless）；步骤少、耗时短；可一次性组装多个片段（最多可达 15 个）。

1.2. 反应原理



Gibson Assembly 是在单管中、50°C 恒温条件下完成的 DNA 拼接反应，主要依靠三种酶协同作用。（1）外切核酸酶从 DNA 片段 5' 端降解，产生可互补配对的 3' 单链末端；（2）使相邻片段能够退火结合；（3）随后，高保真 DNA 聚合酶从 5' 端→3' 延伸，补齐缺失的核苷酸；（4）DNA 连接酶将片段之间的缺口封闭，形成完整的双链 DNA。由于这三种酶都能在 50°C 下发挥作用，整个过程可在同一反应体系中一步完成。其关键前提是：相邻 DNA 片段末端需要具有约 15–80 bp 的同源重叠序列。

2. 试剂盒组成部分

成分	货号	体积	保存条件/时间
2× Gibson Assembly Nova Mix	A2011S/M/L	0.2 ml / 0.5ml / 0.5ml×5	-20°C/24 个月
800 bp insert (PCR 产物, 含 J23107 promoter 和 mCherry, 20 ng/μl)	A2015S/M/L	20 ul / 20ul / 20ul×5	-20°C/24 个月
pUC19 control vector, linearized (50 ng/μl, Amp ^r)	A2016S/M/L	20 ul / 20ul / 20ul×5	-20°C/24 个月

3. 常规实验流程

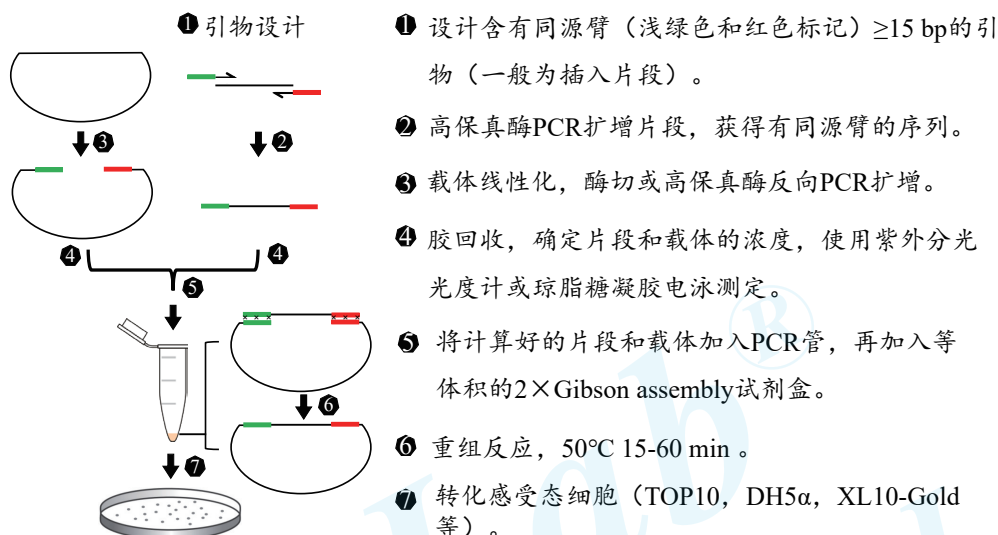


图 1. 常规实验流程

4. 重组片段的获取

4.1 PCR扩增法获取片段（一般为插入基因或反向PCR扩增载体）

Gibson Assembly 的核心要求是重组的 DNA 片段末端必须具有同源重叠序列。这些重叠序列通常通过 PCR 引物的设计引入。每条引物通常由两部分组成：一部分是同源臂序列，用于与相邻片段或载体末端配对；另一部分是基因特异性退火序列，用于 PCR 扩增目的片段。

一般来说，插入片段越大、组装片段越多，同源臂就应设计得越长，这样可以提高组装成功率。若与本公司高效重组型大肠杆菌 DH5a-Rec1 感受态（货号：DL1001-R1）配合使用，同源臂 15-20 bp 即可；若搭配普通大肠杆菌感受态，推荐的同源臂长度见表 1。同源重叠区的 T_m 应 $\geq 48^\circ\text{C}$ （推荐 $> 50^\circ\text{C}$ ），基因特异性序列的 T_m 应在 $58-65^\circ\text{C}$ 之间。引物应以 G 或 C 结尾（G clamp），有助于提高 PCR 扩增效率。

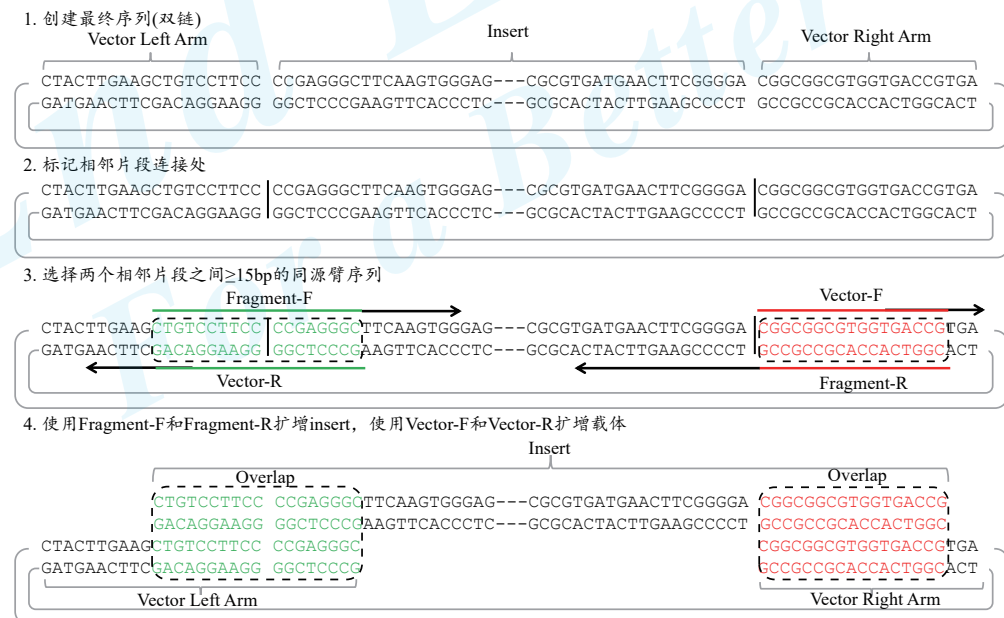
表 1 不同片段数量与大小下的同源臂长度推荐

片段数量 \ 片段大小	< 1kb	1-5 kb	5-10kb	> 10 kb
2 片段 (1 插入片段)	15-20 bp	20-25 bp	25-30 bp	30-40 bp
3 片段 (2 插入片段)	20-25 bp	25-30 bp	30-35 bp	35-40 bp
4-6 片段	25-30 bp	30-40 bp	35-50 bp	40-80 bp

4.1.1. PCR 获取插入片段引物设计（载体使用酶切）



4.1.2. PCR获取插入片段和载体片段



4.1.3. 软件设计引物

推荐手动引物设计经验不足的科研人员使用SnapGene设计引物。详细操作请见SnapGene说明书或跟唯地生物技术支持联系。

4.1.4 PCR扩增操作

(1) 推荐使用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，以确保扩增片段的序列准确性。避免使用 Taq 等不具有 3'-5'校对活性的聚合酶，以减少序列错误。

(2) PCR 产物中可能携带大量未切割的质粒模板，建议在 Gibson Assembly 之前用 *Dpn* I/限制性内切酶处理 PCR 产物，以去除甲基化的模板质粒 DNA。*Dpn* I/处理条件：37°C 孵育 15-30 分钟。

4.2. 酶切获取线性化片段（一般为载体）

限制性内切酶酶切是在载体的特定位点进行切割，产生线性化的载体。

4.2.1. 具体方法

(1) 选择限制性内切酶：

优先使用两种不同的限制性内切酶进行双酶切，可显著降低未切割载体的背景。也可使用 IIS 类酶，如 *BspQI* 或 *BsaI* 等。如果必须使用单酶切，应避免使用产生四碱基突出端且富含 C/G 的酶（如产生 CCGG 突出的酶），因为这类突出端可能自行退火重新环化。

(2) 酶切体系：

根据厂家说明书配制酶切体系，一般包含：DNA 1-5 μ g、限制性内切酶 10-20 U、相应缓冲液、补充 ddH₂O 至总体积 50 μ L。推荐使用 High Fidelity (HF) 限制性内切酶以避免星号活性。

(3) 酶切条件：

37°C 孵育 0.5-1 小时（根据酶的酶特性调整）。

(4) 酶切验证：

取少 1~2 μ L 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，确认载体已完全线性化（应只有一条线性化条带）。

4.3. 片段回收

琼脂糖凝胶回收是通过凝胶电泳分离目的 DNA 片段，然后将含有目的片段的凝胶块切下，使用化学方法将 DNA 从琼脂糖中回收纯化。

方法如下：

(1) 凝胶电泳：

配制 0.8-1.2% 琼脂糖凝胶（根据片段大小选择浓度），含 0.5 μ g/mL EB 或其他核酸染料。将全部 PCR 产物或酶切产物加样电泳，180 V 运 15 分钟。

(2) 切胶：

在紫外灯下或蓝光切胶仪下观察目的条带，用洁净的刀片尽可能精确地切取目标条带，减少多余的凝胶体积。注意尽量缩短紫外线照射时间，避免 DNA 损伤。推荐使用蓝光切胶仪切胶，不会对 DNA 造成突变。

(3) 胶回收：

使用商品化胶回收试剂盒按说明书操作。核心步骤为：加入凝胶溶解液（65°C 溶解凝胶）→ 转入吸附柱 → Wash buffer 洗杂 → 洗脱缓冲液洗脱。

重要提示

胶回收可能引入盐酸胍（来自凝胶溶解液），可能降低 Gibson Assembly 及转化效率。因此，应尽量切小胶块以减少溶解液用量，并充分清洗。如果 PCR 产物为单一条带，可直接使用 PCR 纯化柱代替胶回收。

5. 片段浓度的确定

准确测定 DNA 片段的浓度对于 Gibson Assembly 反应的成功至关重要。不准确的浓度将导致片段摩尔比不合适，影响组装效率。实验室常用两种浓度测定的方法。

5.1. OD260 法测定浓度

5.1.1. 原理

核酸分子在紫外光 260 nm 波长处具有特征性吸收峰。根据 Lambert-Beer 定律，DNA 浓度与 OD260 值成正比。

5.1.2. 测定方法

- (1) 使用 NanoDrop 或其他微量分光光度计，仅 1-2 μL DNA 样品即可测定。
- (2) 用洗脱缓冲液或 ddH_2O 作为空白对照进行校准。
- (3) 读取 OD260 值和浓度。
- (4) 检查 OD260/OD280 比值：纯净 DNA 的比值应在 1.8-2.0 之间。低于 1.8 可能表明蛋白污染，高于 2.0 可能表明 RNA 污染。

如果测定的片段的 OD260/OD280 的比值异常。推荐使用琼脂糖凝胶法估算 DNA 浓度。

- (5) 检查 OD260/OD230 比值：应在 2.0-2.2 之间，低于此值可能表明有机溶剂或盐污染。

注意事项

NanoDrop 无法区分完整 DNA 与降解的游离核苷酸或引物，因此对于 PCR 产物，建议结合凝胶电泳验证。

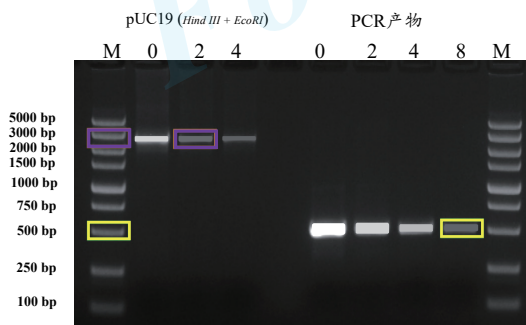
5.2. 琼脂糖凝胶电泳法估算浓度

5.2.1. 原理

通过将 DNA 样品与已知浓度的 DNA Marker 在同一琼脂糖凝胶上进行电泳，比较目的条带与 Marker 中大小相似条带的亮度，从而估算 DNA 浓度。该方法的优点在于可以同时确认 DNA 片段的大小和浓度，并可观察是否存在降解或非特异性扩增。

5.2.2. 具体方法

- (1) 配制 0.8-1.2% 琼脂糖凝胶，含 EB 染料或其他核酸染料。
- (2) 按照 DNA Marker 说明书，加入适当体积（已知各条带质量，如每条带 50 ng 或 5 μL 加样量）加入对照孔。
- (3) 取 1-5 μL DNA 样品，梯度稀释（0, 2, 4, 8 倍稀释），加入 loading buffer 混合后加样。
- (4) 电泳后凝胶成像系统下观察，线性化载体和 PCR 片段在某个稀释梯度下与相近大小的 Marker 条带亮度相似，然后进行换算，如下图所示。如果线性化载体和 PCR 片段浓度太低，则可以稀释 Marker。



此图为示意图，不是真实电泳图。

M: FY 5000 DNA Marker。上样 5 μL ，除 1000 bp 条带为 100 ng 以外，其余条带 DNA 量均为 50 ng。图中紫色框/黄色框分别标记 pUC19 (*Hind III* + *EcoRI*) 和 PCR 片段在某个稀释梯度下与相近大小的 Marker 条带亮度相似。因此：

载体 pUC19 浓度约为：50 ng $\times$ 2 = 100 ng/ μL 。

PCR 产物浓度约为：50 ng $\times$ 8 = 400 ng/ μL 。

该方法虽然精度不如分光光度法，但可以直观地确认片段大小是否正确、是否存在非特异性条带或降解，因此是 Gibson Assembly 前不可或缺的质控步骤。

6. 重组反应与操作

6.1 片段用量粗略计算

试剂盒适用的载体用量为 0.03 pmol，最适插入片段为 0.06 pmol（摩尔比为 1:2），粗略计算如下：

最适载体用量 = $[0.02 \times \text{载体碱基数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$

最适片段用量 = $[0.04 \times \text{插入片段碱基数}] \text{ ng (0.06 pmol)}$

例如 1k 的片段插入 5k 的载体中，则载体最适用量 = $0.02 \times 5000 = 100 \text{ ng}$ ，插入片段的最适用量 = $0.04 \times 1000 = 40 \text{ ng}$

当插入片段长度大于载体时，最适载体与插入片段使用量的计算方式应互换，即将插入片段当做克隆载体，克隆载体当做插入片段进行计算。

6.2. 反应体系的配制

组分	用量	终浓度
2X Gibson Assembly Nova Mix	10 μL	1X
DNA 片段（载体 + 插入片段）	X μL^*	见上表
无核酸酶水 (ddH ₂ O)	补至 20 μL	-
总体积	20 μL	-

*未纯化的 PCR 产物总体积不应超过 Gibson Assembly 反应总体积的 20%（即不超过 4 μL ）。

6.3. 反应条件：

- (1) 2-3 片段（1 插入片段）组装：50°C 孵育 15~30 分钟。
- (2) 4-6 片（3-5 插入片段）段组装：50°C 孵育 60 分钟。
- (3) 反应后可将样品置于冰上或 -20°C 保存，用于后续转化。

6.4. 转化步骤：

- (1) 取 10 μL Gibson Assembly 反应产物加入到化学感受态细胞中，轻弹混匀。
- (2) 冰上孵育 30 分钟。
- (3) 42°C 热激 45 秒。
- (4) 迅速转移至冰上，孵育 2 分钟。
- (5) 加入 950 μL SOC 培养基或 LB，37°C 振荡复苏 60 分钟（Amp 或 Car 抗性可以不用复苏直接涂板，原理请见附录）。
- (6) 将细胞液涂布在含相应抗生素的 LB 平板上，37°C 过夜培养。
- (7) 次日观察平板上克隆，如下图：

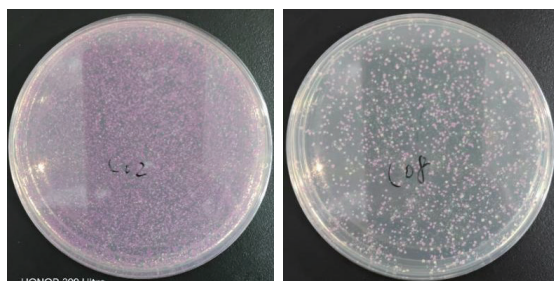


图 2. 使用本试剂盒进行三片段重组。左侧本产品，右侧，市面上产品

片段 1: 527 bp (含 BBa_J23107 promoter 和 mCherry 前半部分)

片段 2: 1016 bp (mCherry 基因后半部分+SacB 部分)

片段 3: 2635 bp (pUC19, *Hind*III + *Eco*R I 酶切, 作为载体)

同源臂长度: 20 bp。

正确同源重组的克隆则显示出图中的紫色, 未正确重组或空质粒的则为白色。

7. 重组产物的鉴定

过夜培养后, 挑取重组反应转化平板上若干个克隆进行菌落 PCR 鉴定, 扩增引物至少使用一条载体上的通用测序引物。如果克隆正确, 应有长度略大于插入片段大小的条带出现。

8. 操作注意事项

8.1 反应配制注意事项:

- (1) Gibson Assembly Master Mix 含有多重敏感酶, 必须始终置于冰上操作, 避免反复冻融。
- (2) 酶液吸取时应缓慢吸打, 确保准确转移。吸取后在管壁擦拭枪头以去除残留。
- (3) 先将 DNA 片段加入 PCR 管, 再加入重组试剂, 最后加 ddH₂O 补足体积。
- (4) 反应前充分混匀(缓慢吹打), 但避免剧烈旋涡。

8.2. DNA 质量注意事项:

- (1) 确保所有片段均已经过凝胶电泳验证大小和纯度。
- (2) 如 PCR 产物存在非特异性条带, 必须进行胶回收纯化。
- (3) 若 PCR 产物为单一明亮条带, 可直接使用或仅经过 PCR 纯化柱纯化。
- (4) 对于以质粒为模板的 PCR 产物, 建议用 DpnI 处理以去除甲基化模板。
- (5) 柱纯化 PCR 产物可提高组装和转化效率 2-10 倍, 特别是在组装 3 个以上片段或片段超过 5 kb 时。

9. 常见问题排查

问题	可能原因	解决方案
转化后无克隆	重叠序列设计有误或长度不足	检查引物设计, 确保重叠区足够且正确; 避免高度回文序列, 否则可能导致重组克隆数降低 10 倍

	DNA 浓度或比例不合适	一般建议载体:插入片段的摩尔比从 1:2 起步, 也可尝试 1:3 甚至 1:5。
	片段数过多, 组装效率下降	2-3 片段组装用 15-25 bp 同源臂 (overlap)、50°C 孵育 15-30 分钟; 4-6 片段组装用 20-80 bp 同源臂、孵育 1 小时
	Gibson 反应液对某些菌株有毒性	Gibson Assembly 与 Stbl3 细胞不兼容, 需更换唯地推荐的感受态细胞或用乙醇沉淀纯化组装产物后再转化
	复苏时间不够	将复苏时间延长到 90-120 分钟; 如果仍无菌落, 可将复苏液室温过夜后全部涂板
	凝胶纯化时紫外/EB 损伤 DNA	使用蓝光切胶仪, 克隆效率可提升约 10 倍
	感受态细胞效率低或已失活	用试剂盒提供的 pUC19 质粒 (100 pg) 检验感受态细胞效率, 应达到 $1-3 \times 10^9$ cfu/ μ g
菌落多但无正确克隆 (假阳性高)	载体未完全线性化, 空载体回环	确保限制性酶切完全或用 <i>DpnI</i> 消化模板质粒, 凝胶纯化线性化载体
	PCR 产物不纯, 含非特异条带	确认 PCR 产物为单一条带且大小正确; 如有非特异条带必须凝胶纯化
	重叠区设计在抗性基因/复制子区域	尽量将接合位点设计在复制起点或筛选标记之间, 可减少假阳性
大量小菌落	插入基因对宿主有毒性	使用低拷贝载体 (如 pACYC184), 或用严格调控表达的启动子; 确认基因未与 lacZ 形成框内融合
	培养板孵育时间过长出现卫星菌落	卫星菌落是抗生素被消耗殆尽后形成的, 挑选大菌落即可
阳性对照也无菌落	试剂盒失活或储存不当	联系厂家。
	感受态细胞操作不当	不可涡旋感受态细胞, 应轻柔吹吸混匀
测序发现缺失/突变	PCR 扩增引入错误	使用高保真聚合酶 (如 Q5 或 KOD plus), 并注意用正确的退火温度
	重叠区 GC 含量过高或形成二级结构	尽量将重叠区 GC 含量控制在 40-60%, T_m 接近 50°C 左右

10. 附录

10.1. 常见抗生素，工作原理，使用浓度等

抗生素	抗性基因	抗性产物位置	抗性建立速度	是否需要复苏	工作浓度
Ampicillin (Amp)	Bla (β-lactamase)	分泌到周质/外环境，降解培养基中抗生素	很快，翻译后立即分泌	✗ 可直接涂板	100 μg/ml
Carbenicillin (Car)*	Bla (β-lactamase)	分泌到周质/外环境，降解培养基中抗生素	很快，翻译后立即分泌	✗ 可直接涂板	50 μg/ml
Kanamycin (Kan)	aph(3')-I、nptII / neo	位于细胞质内，通过修饰 kan 分子使其失活	慢，需要一定表达时间	✓ 需复苏 30-60 min	50 μg/ml
Chloramphenicol (Cm)	Cat	位于细胞内，乙酰化降解抗生素	慢，需要一定表达时间	✓ 需复苏 30-60 min	33 μg/ml
Tetracycline (Tet)	tetA (常与 tetR 一起存在)	细胞膜上，主动外排 tet，减少抗生素累积	慢，需要一定表达时间	✓ 需复苏 30-60 min	10 μg/ml

*注：Car 可替代 Amp，稳定性更好，可减少卫星菌落。

10.2. 摩尔数的计算

(1) 摩尔数计算公式

为确保各片段以合适的摩尔比参与反应，需要计算每个片段的摩尔数。我们推荐使用以下公式：

$$\text{pmols} = [\text{质量 (ng)} \times 1000] / [\text{片段长度 (bp)} \times 650 \text{ Da}]$$

(2) 插入片段摩尔当量计算

当已知载体用量时，可用以下公式计算插入片段的摩尔当量：

$$\text{插入片段用量 (ng)} = [\text{载体用量 (ng)} \times \text{插入片段长度 (bp)}] / \text{载体长度 (bp)}$$

然后将该值乘以插入片段与载体的摩尔比（2-3 倍或等摩尔比）即为最终用量。

(3) 推荐 DNA 用量

组装类型	载体用量	插入片段比例	DNA 总量
2-3 片段	50-100 ng	2-3 倍摩尔过量	0.02-0.5 pmol
4-6 片段	50-100 ng	1:1 摩尔比	0.2-1.0 pmol
<200 bp 片段	50-100 ng	5 倍摩尔过量	根据实际调整

(4) 计算示例

假设：载体为 5000 bp，插入片段为 1000 bp，拟使用 50 ng 载体，插入片段为 3 倍摩尔过量。

$$\text{载体的 pmol 数} = (50 \times 1000) / (5000 \times 650) = 0.0154 \text{ pmol}$$

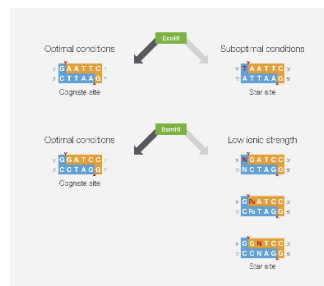
插入片段摩尔当量 (ng) = $[50 \times 1000] / 5000 = 10 \text{ ng}$

3 倍摩尔当量: $10 \times 3 = 30 \text{ ng}$ 插入片段

若插入片段浓度为 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 则需加入 $1.5 \mu\text{L}$ 。

10.3. 酶的星号活 (E.coRI和 BamHI)

星号或“松弛”活性是限制性内切酶的一种固有性质, 表现为会切除其他序列。如 *EcoRI* 和 *BamHI*, 见右图。常见原因为酶过量或孵育时间过长 (过度酶切) 或最终反应液里面离子浓度发生变化。



11. 参考文献

- [1] Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [2] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52-56.
- [3] Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA, Venter JC, Merryman C. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nature Methods*, 2010, 7(11): 901-903.