

# GenParts 产品使用说明

## 产品简介

GenParts 片段是未经克隆测序的线性双链 DNA 片段，可直接用来进行酶切连接、同源重组以及平末端连接等分子克隆构建载体。相较于传统的基因合成，GenParts 片段具有合成周期短、价格便宜、使用灵活等优点。

## GenParts 片段的溶解与保存

我们提供的 GenParts 片段呈薄膜状或粉末状附着在离心管壁上，开启前请稍作离心确保产品在离心管底部。我们的默认发货量是 400 ng，因此如果要稀释到 20 ng/μl，请加入 20 μl 的 TE 缓冲液，然后盖上管盖震荡使其充分溶解。为了防止降解，请将溶解的片段放置在-20℃保存，避免反复冻融。

## GenParts 片段的扩增方法

GenParts 产品默认提供 400 ng 的片段，足够进行多种克隆反应。但是如有需要，客户可以通过 PCR 的方法扩增获得更多量的片段。片段扩增时有如下的注意事项：

- ✓ 使用高保真的 DNA 聚合酶（如 Phusion 聚合酶）从而降低扩增时引入的突变。
- ✓ 反应中加入约 0.5-5 ng 的 GenParts 片段作为模板。
- ✓ 使用 15-25 个热循环反应，更少的循环数有助于获得更高序列保真度。
- ✓ 可以使用巢式 PCR（即将扩增引物设置在片段内部而非两端）提高扩增产物特异性。

## GenParts 片段的克隆

GenParts 片段可以通过多种方法进行克隆，下表汇总了几种常用的克隆方法及其注意事项。

| 克隆方法           | 方法简介                                                                                                                              | 注意事项                                                                                                                                                                                                          |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 酶切连接           | 传统的酶切连接技术是一种简便快速的克隆 GenParts 片段的方法。                                                                                               | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 需要在组装片段的两端加上适当的酶切位点和 6–8 bp 的保护碱基。</li><li>✓ 连接反应中建议加入约 0.05 pmole 的插入片段（对 750 bp 的片段为 25 ng）和 0.01 pmole 的载体。</li></ul>                                              |
| Gibson 组装      | Gibson 组装是一种不依赖于限制性内切酶的，基于体外同源重组的克隆方法，能够将多个片段同时克隆进入目标载体。                                                                          | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 需要在组装片段之间以及片段与载体之间加入 20-80 bp 的同源臂。</li><li>✓ 建议等摩尔的加入组装片段和载体，每个片段加入约 0.1 pmole（对 750 bp 的片段为 50 ng）。</li></ul>                                                       |
| Golden Gate 克隆 | Golden Gate 克隆基于 Type IIs 限制性内切酶，能够非常高效的实现多个片段的组装。由于它不依赖于同源重组，因此可以进行高度重复片段的克隆。Golden Gate 克隆的一个缺点是组装片段的内部不能含有用于组装的 Type IIs 酶切位点。 | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 组装片段的内部不能含有用于组装的 Type IIs 酶切位点。</li><li>✓ 需要在组装片段的两端加上适当的 Type IIs 酶切位点和 6–8 bp 的保护碱基。</li><li>✓ 克隆反应中建议加入等摩尔的组装片段，每个片段加入约 0.05 pmole（对 750 bp 的片段为 25 ng）。</li></ul> |
| 平末端连接          | GenParts 的片段是平末端的片段，因此可以直接进行平末端连接。                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 建议在片段两端加入 6–8 bp 的保护碱基。</li><li>✓ 连接反应建议加入约 0.1 pmole 的插入片段（对 750 bp 的片段为 50 ng）和 0.02 pmole 的载体。</li></ul>                                                           |
| T/A 克隆         | T/A 克隆方法依赖片段的 3'端的腺嘌呤碱基形成的粘性末端进行连接反应。                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ GenParts 的片段是平末端的片段，因此需要在片段两端加上腺嘌呤的粘性末端才能够进行 T/A 克隆。使用 Taq 聚合酶在含有 ATP 的 buffer 中可以完成此操作。</li><li>✓ 在 15 μl 添反应中，建议加入约 50 ng 的 GenParts 片段，之后取约 5 μl 进行连接反应。</li></ul> |

## 克隆的筛选

使用 GenParts 片段完成分子克隆之后，需要对克隆进行菌落 PCR 验证和测序验证才能够进行后续的应用。为了有>90%的概率获得至少一个正确的克隆，我们建议挑选对 4-6 个菌检阳性克隆进行测序。