



已升级所有限制性内切酶缓冲液  
为包含重组白蛋白

# 分子克隆

技术指南



NEW ENGLAND  
*BioLabs*<sup>®</sup> Inc.

be INSPIRED  
drive DISCOVERY  
stay GENUINE



# 分子克隆概述

分子克隆是指在体外对 DNA 分子进行重组，将重组分子导入到宿主细胞中，并在其中进行复制的过程。通常，分子克隆实验包含两部分：

1. 需要克隆的目的 DNA 片段
2. 可在宿主菌体内复制的载体/质粒骨架

需要克隆的目的 DNA 片段，如基因、调控元件、操纵子等，可通过以下方法获得：利用限制性内切酶从源 DNA 处酶切获得；PCR 复制获得；将不同的寡核苷酸片段组装获得。同样线性化的质粒载体也可以用限制性酶切或 PCR 方法获得。质粒是独立于微生物染色体或基因组 DNA 而存在的环状双链 DNA 分子，其分子量较小，可在菌体内复制。将目的 DNA 与质粒载体通过磷酸二酯键进行共价连接，形成重组质粒，并导入宿主细胞内进行复制。携带目的 DNA 的质粒能将目的 DNA 片段大量复制，且可为目的 DNA 的直接转录和翻译提供所需元件。因此，分子克隆已成为表达蛋白质、研究基因表达和分析生物分子功能等的基础工具。

克隆过程中，目的 DNA 的末端及载体的末端需要进行修饰，使其形成互补末端，便于 DNA 连接酶、重组酶及体内 DNA 修复机制发挥连接作用。常用的修饰酶有核酸酶、磷酸酶、激酶和/或连接酶。许多克隆方法和新研发的试剂盒都可以简化和标准化上述过程。

该技术指南将阐明各种克隆方法之间的差异，确定每种方法可选用的 NEB® 产品，并提供经过专家优化的步骤和常见问题解答，以协助解决实验问题，对克隆做到成竹在胸（Clone with Confidence®）。



登陆 [CloneWithNEB.com](http://CloneWithNEB.com) 获取更多信息



- 技术建议和常见问题解答
- 视频和动画
- 更多内容……

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| 3     | 在线工具                  |
| 4–5   | 克隆流程对比                |
| 6     | DNA 组装                |
| 6     | 概述                    |
| 6     | 产品选择                  |
| 7     | Golden Gate 组装试剂盒     |
| 7     | 优化建议                  |
| 8     | Golden Gate 组装优化指南    |
| 9     | NEBuilder® 高保真 DNA 组装 |
| 10    | 操作步骤/优化建议             |
| 10    | Gibson 组装®            |
| 11    | 克隆 & 突变               |
| 11    | NEB PCR 克隆试剂盒         |
| 12    | Q5® 定点突变试剂盒           |
| 12    | 操作步骤/优化建议             |
| 13–24 | DNA 制备                |
| 13    | 核酸纯化                  |
| 13    | 概述                    |
| 14    | cDNA 合成               |
| 14    | 概述                    |
| 15    | 限制性酶切                 |
| 15    | 概述                    |
| 15    | 操作步骤/优化建议             |
| 16–21 | 特性表                   |
| 22    | 在 rCutSmart 缓冲液中的活性   |
| 23    | PCR/扩增                |
| 23    | 概述                    |
| 23    | 产品选择表                 |
| 24    | 操作步骤/优化建议             |
| 25–27 | 常见 DNA 末端修饰           |
| 25    | 概述                    |
| 25    | 磷酸化                   |
| 25    | 操作步骤/优化建议             |
| 25    | 去磷酸化                  |
| 25    | 产品选择表                 |
| 25    | 操作步骤/优化建议             |
| 26    | 末端平齐化/末端修复            |
| 26    | 产品选择表                 |
| 26    | 操作步骤/优化建议             |
| 27    | 加 A 尾                 |
| 27    | 产品选择表                 |
| 27    | 操作步骤                  |
| 28    | DNA 连接                |
| 28    | 载体和插入片段的连接            |
| 28    | 概述                    |
| 28    | 产品选择表                 |
| 29    | 操作步骤/优化建议             |
| 30    | 转化                    |
| 30    | 概述                    |
| 30    | 产品选择表                 |
| 30    | 操作步骤/优化建议             |
| 31    | DNA 分析                |
| 31    | DNA Marker 和 Ladder   |
| 31    | 概述                    |
| 31    | 产品选择表                 |
| 32    | 开始分子克隆实验              |
| 33–34 | 传统克隆实验简捷指南            |
| 35–37 | 克隆问题解决指南              |
| 38–39 | 订购信息                  |



# 克隆相关在线工具

## NEB 与其它品牌同类产品对比推荐软件



使用该软件选择其它公司的感受态细胞产品，找出 NEB 的相应菌株。从可选项中选择产品名称或货号，该软件识别推荐 NEB 产品，并强调其优势，提供产品详细介绍页面的链接。

## DNA 序列和图谱软件



使用 DNA 序列和图谱软件，可以查询常用分子生物学工具的核酸序列，包括质粒、病毒和噬菌体载体。

## 双酶切条件查询软件



为了省时，通常进行双酶切反应，在建立双酶切反应时，使用该软件指导选择最适合的反应缓冲液。选择正确的反应缓冲液可以避免星号活性和产物损失。

## 内切酶查找软件



您可以输入限制性内切酶的名称、识别序列、产生的末端或者内切酶的种类来选择限制性内切酶。输入单字母命名的碱基序列，您就可以查找到最适用的内切酶。

## NEBridge® 连接酶保真度分析软件



将突出末端连接偏嗜可视化，预测高保真连接组合，或者将 DNA 拆分成易于高保真无缝组装的 DNA 序列。

## NEBridge® Golden Gate 克隆组装设计软件



使用该软件进行 Golden Gate DNA 组装的模拟组装设计。它利用合适的 IIS 型限制性酶切位点和重叠片段进行精确的引物设计，支持多种格式序列的快速输入，可导出最终组装序列、引物序列及组装方法。最新版本 (v2.1) 还包含连接酶保真度信息。

## NEBaseChanger® 定点突变设计软件



使用 Q5® 定点突变试剂盒进行突变实验时，使用该软件进行引物设计。该软件也可以根据客户的引物序列推荐退火温度，并且在计算时能够把不匹配的碱基考虑在内。

## NEBcloner® 经典法克隆设计软件



使用该软件为克隆实验的每一步（酶切、末端修饰、连接、转化和突变）选择适合的产品和实验方案。此外，还提供其它相关的工具和资源来优化实验方案。

## NEBcutter® V3.0 酶切位点分析软件



使用 NEBcutter 可以分析 DNA 序列上的限制性内切酶位点。选择 II 型或已经商业化的 III 型限制性内切酶切割您的 DNA，NEBcutter V3.0 会显示切割频率和甲基化敏感性。

## NEBioCalculator® 分子生物学计算软件



由一系列计算及换算器组成，适用于分子生物学实验室中的各种实验设计的计算。

## NEBuilder® 克隆组装设计软件



该软件为 DNA 组装设计引物，只需输入目的片段的序列和扩增使用的聚合酶即可。

## PCR 聚合酶选择软件



帮助在建立 PCR 反应时选择合适的聚合酶。无论扩增子是长片段、复杂片段、高 GC 含量或者仅为单拷贝，该软件都将选择出最合适的 DNA 聚合酶。

## REBASE® 限制性内切酶数据库



通过 REBASE® 数据库了解限制性内切酶领域的发展变化，了解限制性内切酶动态数据及其相关蛋白。

## 退火温度 (T<sub>m</sub>) 计算软件



使用 T<sub>m</sub> 计算软件可以确定扩增反应中的最佳退火温度。直接输入要使用的 DNA 聚合酶、引物浓度和引物序列，即可获得正确的反应条件。

## 手机端软件



### 适用于 iPhone®, iPad® 或 Android™ 的 NEB 工具

NEB 为 iPhone, iPad 和 Android 设备提供最受欢迎的在线工具。

- 使用内切酶查找软件 Enzyme Finder，通过输入需要查找的限制性内切酶的种类、识别序列或者内切酶名称来查找 NEB 内切酶信息。所获得的内切酶信息可发送至邮箱或者直接跳转到 [www.neb.cn](http://www.neb.cn) 相应页面。
- 使用双酶切分析软件 Double Digest Finder 或经典法克隆设计软件 NEBcloner 查找双酶切反应最适缓冲液及反应条件。

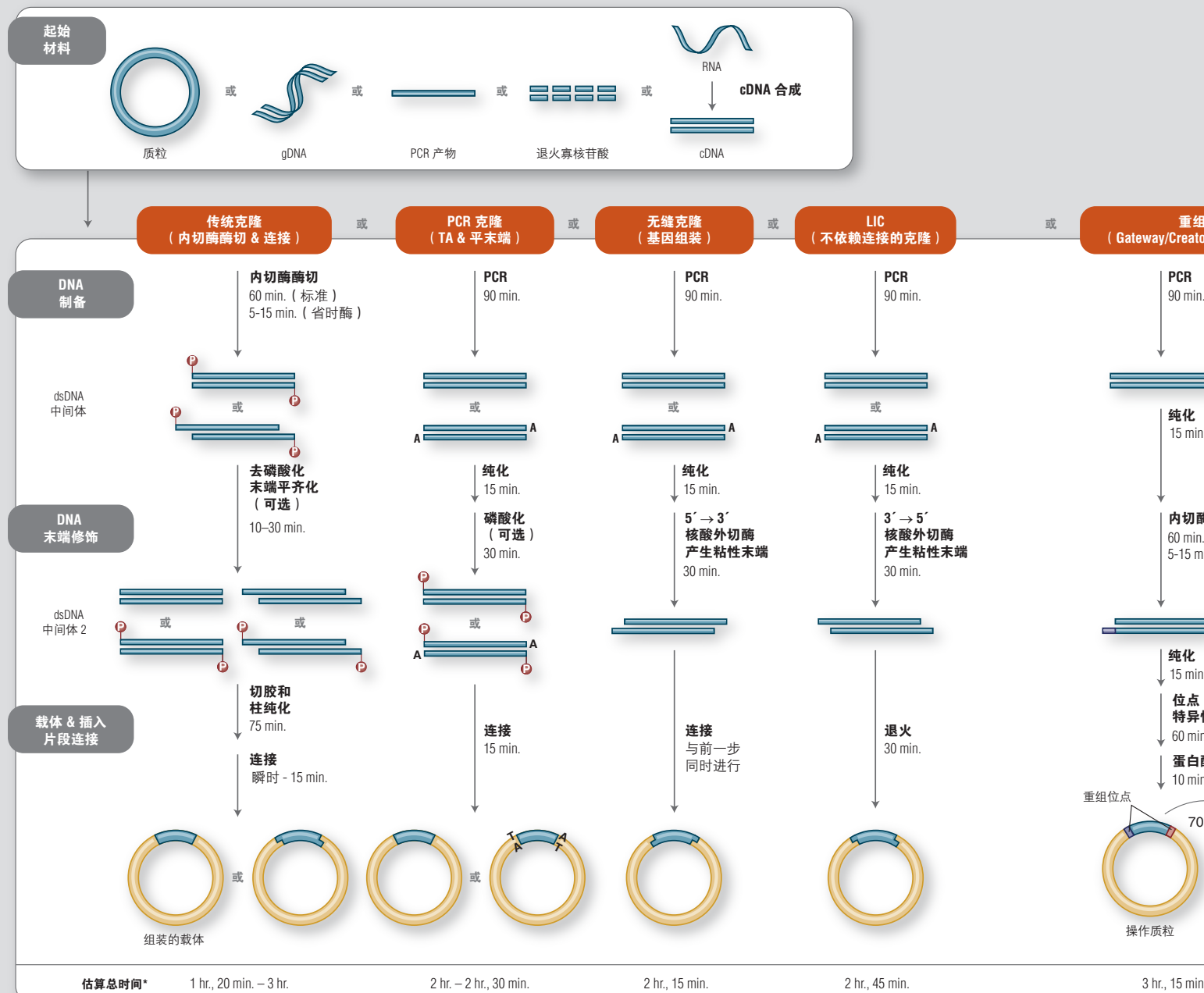
使用这两种工具时，最好选择带 rCutSmart™ 缓冲液标识、HF® 高保真标识和 Time Saver™ 省时标识的内切酶。NEB 工具使您能够快速方便地查找最符合需要的限制性内切酶信息，并快速开展实验。



# 克隆流程对比

以下图表是不同克隆方法及流程中每步实验所需时间的对比图。

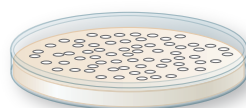
插入片段制备



\* 注意：估算总时间指将基因从一个质粒转入另一个质粒大致所需的时间。如果基因来源于基因组，用传统方法的话，需要增加 2 小时。总时间不包含转化、分离或分析的时间。

\*\* 第二天进行重组需要 70 分钟

转化



DNA 分离  
(质粒纯化)



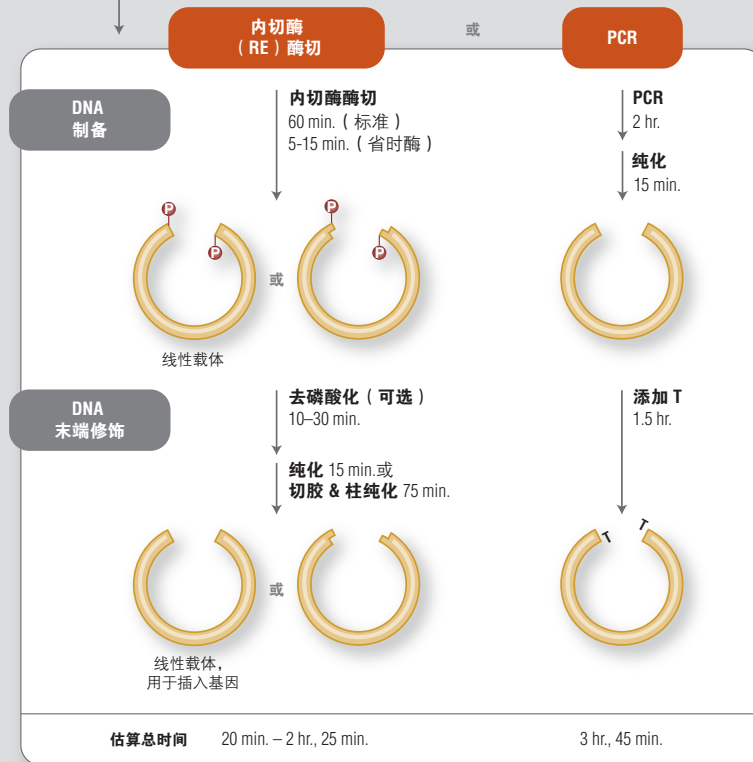
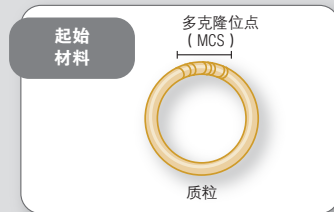


### 选择表 & 操作步骤

如何快速查找产品选择表 & 操作步骤?

- 6 克隆 & 突变
- 13 核酸纯化
- 14 cDNA 合成
- 15 限制性内切酶
- 23 PCR
- 25 磷酸化
- 25 去磷酸化
- 26 平齐化 / 末端修复
- 27 加 A 尾
- 28 连接
- 30 转化
- 31 DNA 分析

#### 载体制备



+

#### DNA 分析



蛋白表达

功能分析

定点突变



# DNA 组装

出于克隆的目的，DNA 组装是指将多个 DNA 片段以头尾相连的方式连接在一起，从而在连接到载体之前实现全部片断都以正确方向完成连接，这个过程是合成生物学的基石，能够使用特定的组分构建新的生物系统和装置。这些方法在体外进行，通常需要酶促驱动，最终构建的 DNA 会导入并保持在微生物宿主细胞中。

根据您的需求选择最合适的 DNA 组装方法，请参阅下面的合成生物学 /DNA 组装选择表。

## DNA 组装选择表

|                                    | NEBuilder® 高保真 DNA 组装<br>(NEB #E2621)<br>(NEB #E5520)<br>(NEB #E2623) | NEB Gibson 组装<br>(NEB #E5510)<br>(NEB #E2611) | NEBridge® Golden Gate 组装试剂盒 ( BsaI-HFv2、BsmBI-v2 ) 和 NEBridge 连接酶预混液 <sup>(1)</sup><br>(NEB #E1601)<br>(NEB #E1602)<br>(NEB #M1100) | USER® 酶<br>(NEB #M5505)<br>热敏 USER II 酶<br>(NEB #M5508) |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>特性</b>                          |                                                                       |                                               |                                                                                                                                     |                                                         |
| 去除 5' 或 3' 末端不匹配序列                 | ★★★                                                                   | ★                                             | N/A                                                                                                                                 | N/A                                                     |
| 连接处高保真组装                           | ★★★                                                                   | ★★                                            | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| 可用于末端重复序列                          | ★                                                                     | ★                                             | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| 产物完全连接                             | ★★★                                                                   | ★★★                                           | ★★★                                                                                                                                 | NR                                                      |
| 双链 DNA 和单链寡核苷酸连接                   | ★★★                                                                   | ★★                                            | NR                                                                                                                                  | NR                                                      |
| 高效组装微量 DNA                         | ★★★                                                                   | ★★                                            | ★★                                                                                                                                  | ★★                                                      |
| 重叠区序列长度可变                          | ★★★                                                                   | ★★★                                           | ★                                                                                                                                   | ★★                                                      |
| <b>应用</b>                          |                                                                       |                                               |                                                                                                                                     |                                                         |
| 2 个片段组装 ( 简单克隆 )                   | ★★★                                                                   | ★★★                                           | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| 3-6 个片段组装 (单管完成)                   | ★★★                                                                   | ★★★                                           | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| 7-11 个片段组装 (单管完成)                  | ★★★                                                                   | ★★                                            | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| 12-50+ 个片段组装 (单管完成) <sup>(1)</sup> | ★                                                                     | ★                                             | ★★★                                                                                                                                 | NR                                                      |
| 用于体外转录的模板制备                        | ★★★                                                                   | ★★★                                           | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| 合成组装全基因组                           | ★★★                                                                   | ★                                             | ★★★                                                                                                                                 | ★                                                       |
| 多位点突变                              | ★★★                                                                   | ★★                                            | ★★                                                                                                                                  | ★★                                                      |
| 文库构建                               | ★★★                                                                   | ★★★                                           | ★★★                                                                                                                                 | ★★                                                      |
| 代谢通路工程                             | ★★★                                                                   | ★★                                            | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| TALENs                             | ★★                                                                    | ★★                                            | ★★★                                                                                                                                 | ★★                                                      |
| 短发夹 RNA 克隆 (shRNA)                 | ★★★                                                                   | ★★                                            | ★                                                                                                                                   | ★                                                       |
| gRNA 文库构建                          | ★★★                                                                   | ★★                                            | ★                                                                                                                                   | ★                                                       |
| 大片段组装 ( > 10kb )                   | ★★★                                                                   | ★★★                                           | ★★★                                                                                                                                 | ★★                                                      |
| 小片段组装 ( < 100bp )                  | ★★★                                                                   | ★                                             | ★★★                                                                                                                                 | ★★★                                                     |
| 连续多轮限制性内切酶组装                       | ★★★                                                                   | ★                                             | NR                                                                                                                                  | ★                                                       |

### 注释

★★★ 最佳选择，推荐该应用

★★ 效果良好

★ 可以完成该实验，但不推荐使用

(1) 详情请登陆 [www.neb.cn/GoldenGate](http://www.neb.cn/GoldenGate)

N/A 不适用

NR 不推荐



## Golden Gate 组装

Golden Gate 组装 (1, 2) 技术可对 DNA 片段进行高效无缝组装, 该技术利用 IIS 型限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的分步 (3) 或同步 (4) 作用, 将多个插入片段组装进载体骨架。Golden Gate 能够实现单片段插入、克隆不同来源的片段用于构建文库, 以及多模块组装。NEB 对于 Golden Gate 技术做出了巨大的创新与改进, 涉及该技术的各项应用领域。

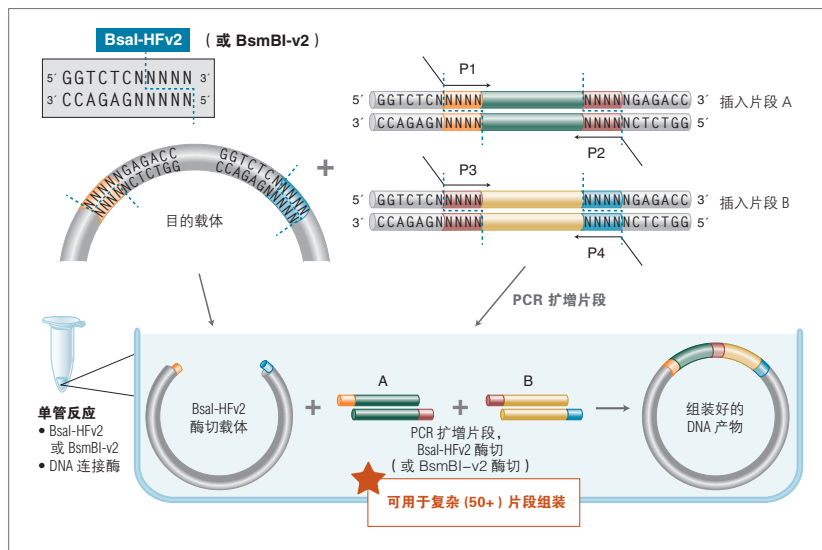
## 连接酶保真度研究进展

随着研究深入, NEB 对连接酶保真度的了解也在不断增加, 例如开发一系列方法分析末端连接保真度, 以预测哪些末端突出可以提高保真度 (5)。该研究让我们能够对末端突出组合进行仔细选择, 这对于实现复杂的 Golden Gate 组装特别重要。

## 用于 Golden Gate 组装的 IIS 型限制性内切酶

NEB 提供的 IIS 型限制性内切酶 (即识别非对称 DNA 序列并在其识别序列之外切割) 比任何其他供应商都多, 其中许多可用于 Golden Gate 组装。这些酶与连接酶保真度数据一起使用, 可实现高效、高准确率 (> 90%) 且低背景的 50+ 片段复杂组装。

### 可用于复杂组装的 Golden Gate 组装流程



以 IIS 型限制性内切酶 BsaI-HFv2 (或 BsmBI-v2) 为例, 进行 Golden Gate 组装时, 需要在 dsDNA 片段的两端加上其识别位点 GGTCTC (或 CGTCTC)。酶切后, 识别位点被移除, 组装片段末端带有设计好的特定 4 碱基突出以指导组装。

### 推荐产品

**NEBridge® Golden Gate 组装试剂盒 (BsaI-HF® v2)**  
(NEB #E1601)

**NEBridge® Golden Gate 组装试剂盒 (BsmBI-v2)**  
(NEB #E1602)

- 无缝克隆 - 克隆后无额外碱基
- 包含 T7/SP6 启动子的目的质粒
- 单次反应实现多片段 (2-50+) 的有序组装
- 也可用于单片段插入和文库构建
- 高效组装高 GC 含量或高重复序列
- 兼容不同长度片段组装 (< 100 bp 到 > 15 kb)

**NEBridge 连接酶预混液 (NEB #M1100)**

- 试剂盒经优化设计, 适用于高效准确的 Golden Gate 组装
- 3X 预混液剂型, 使用便捷
- 搭配 NEB IIS 型限制性内切酶使用

**Golden Gate 中适用的 IIS 型限制性内切酶**

- BbsI (NEB #R0539)
- BbsI-HF (NEB #R3539)
- BsaI-HFv2 (NEB #R3733)
- BsmBI-v2 (NEB #R0739)
- BspQI (NEB #R0712)
- BtgZI (NEB #R0703)
- Esp3I (NEB #R0734)
- PaeCI (NEB #R0745)
- SapI (NEB #R0569)

### 工具 & 资源

登陆 [www.neb.cn/GoldenGate](http://www.neb.cn/GoldenGate) 可查找:

- 连接酶保真度和 Golden Gate 组装的文献及操作说明
- 访问 **NEBridge Golden Gate 克隆组装设计软件**在线实验设计工具
- 登陆连接酶保真度分析软件 NEBridge 连接酶保真度分析软件, 从而有助于高保真 Golden Gate 组装实验设计
- 观看在线视频讲座: [Fidelity and bias in end-joining ligation: Enabling complex multi-fragment Golden Gate DNA Assembly](#)
- 阅读使用指南 [MoClo Overhang Standards Usage Guidelines](#), 并学习教程 [Domestication and Golden Gate Assembly](#)

### 参考文献

1. Engler, C. et al. (2008) *PLoS ONE*, 3: e3647.
2. Engler, C. et al. (2009) *PLoS ONE*, 4: e5553.
3. Lee, J.H. et al. (1996) *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 13: 139-145.
4. Padgett, K.A. and Sorge, J.A. (1996) *Gene*, 168, 31-35.
5. Potapov, V. et al. (2018) *ACS Synth. Biol.* DOI: 10.1021/acssynbio.8b00333.

下载 NEB AR APP\*



\*详情见封底

Golden Gate 组装是如何进行的?



## Golden Gate 组装优化指南

希望在一次反应中组装多个 DNA 片段？在设计 Golden Gate 组装实验时，请记住这几点提示。

### 1. 检查序列

在选择使用哪种 IIS 型内切酶做组装实验之前，先检查序列内部的识别位点。不管序列内部存不存在识别位点，单插入片段的组装实验可以非常高效的获得目的产物，但是多插入片段的组装就不一定了。您可以选择其它的 IIS 型内切酶做组装或者通过去除序列内部的识别位点。我们关于 Golden Gate 组装优化的教程视频提供许多解决序列内部识别位点问题的详细建议。需要注意的一点是，使用具有 7 碱基识别序列的 IIS 型限制性内切酶，如 PaqCI，在任何序列中都不太可能存在内部识别位点。

### 2. 确定引物的方向

通过 PCR 引物设计引入 IIS 型酶识别位点时，不管是扩增子插入片段组装还是用于预克隆插入片段，注意识别位点的方向是朝要组装的 DNA 序列的里面，要了解更多关于识别位点的位置和方向的信息，请查询 Golden Gate 组装试剂盒的说明书，或观看相关视频。

### 3. 选择合适的质粒

考虑换成 pGGAselect 目的质粒用于 Golden Gate 组装。所有的 Golden Gate 组装试剂盒里都包含这个目的质粒，可以用于 BsaI-HFv2、BsmBI-v2 或 BbsI 指导的组装，质粒还特别在组装位点两侧加了 T7 或 SP6 启动子序列，内部没有 BsaI、BsmBI 或 BbsI 识别位点。如果需要，pGGAselect 质粒可以转入任何兼容 pUC19 的大肠杆菌，以自己制备质粒。

### 4. 选择合适的缓冲液

BsaI-HFv2、BsmBI-v2 和 PaqCI 在做 Golden Gate 组装时，在 T4 DNA Ligase 缓冲液 中活性很好。但是，也可以选择其它的缓冲液，比如 BsaI-HFv2 用 NEBuffer r1.1，BsmBI-v2 用 NEBuffer r2.1，PaqCI 用 rCutSmart 缓冲液，以上缓冲液需要补加 1 mM ATP 和 5-10 mM DTT。NEB 也提供 NEBridge DNA 连接酶预混液，这个产品专门优化用于搭配 IIS 型限制性内切酶进行 Golden Gate 组装。

### 5. 增加 Golden Gate 循环数来提高复杂组装的效率

T4 DNA 连接酶、BsaI-HFv2、BsmBI-v2 和 PaqCI 都很稳定，延长循环步骤的时间仍然具有活性，把循环数从 30 个增加到 45-65，这是一个容易的提高组装效率但不降低保真性的办法，甚至在每个循环设置为 5 分钟时，也是可以的。

### 6. 确定制备的质粒不含 RNA

对插入片段或者模块进行预克隆的，请确保质粒不含 RNA，以避免高估您的质粒浓度。

### 7. 避免引物二聚体

插入片段或者模块为扩增子，确保 PCR 扩增子是特异性产物且没有引物二聚体，因为引物二聚体含有 IIS 型内切酶位点（PCR 反应时引物引入的），在组装反应中会被切割，导致错误组装。

### 8. 避免 PCR 引入错配

不要过度扩增，并使用有校正活性的高保真聚合酶，例如 Q5<sup>®</sup> 超保真 DNA 聚合酶。

### 9. 复杂组装，减少插入片段的量

对于大于 10 个片段的复杂组装，每一个预克隆的插入片段或者模块可以从 75 降到 50 ng，不会明显降低组装效率。

### 10. 精心设计每一个插入片段的突出端

一个组装实验的成败取决于它最脆弱的连接处。NEB 的研究增加了对连接酶保真性的了解，开发了详尽的分析末端连接保真性的方法，以预测哪种突出端会提高准确性。NEB Golden Gate 组装试剂盒（BsaI-HFv2 或 BsmBI-v2）结合连接酶保真性信息可以实现高效率、高正确率的复杂组装。请使用 NEB 免费的 Golden Gate 组装工具来设计引物、预测突出端保真性或者为长片段寻找最佳连接点。做大于 20 个片段的复杂组装实验时，请在 NEBeta Tools 网页里参考连接酶保真性工具里的信息。

### 11. 如果组装产物失去功能，请检查序列错误

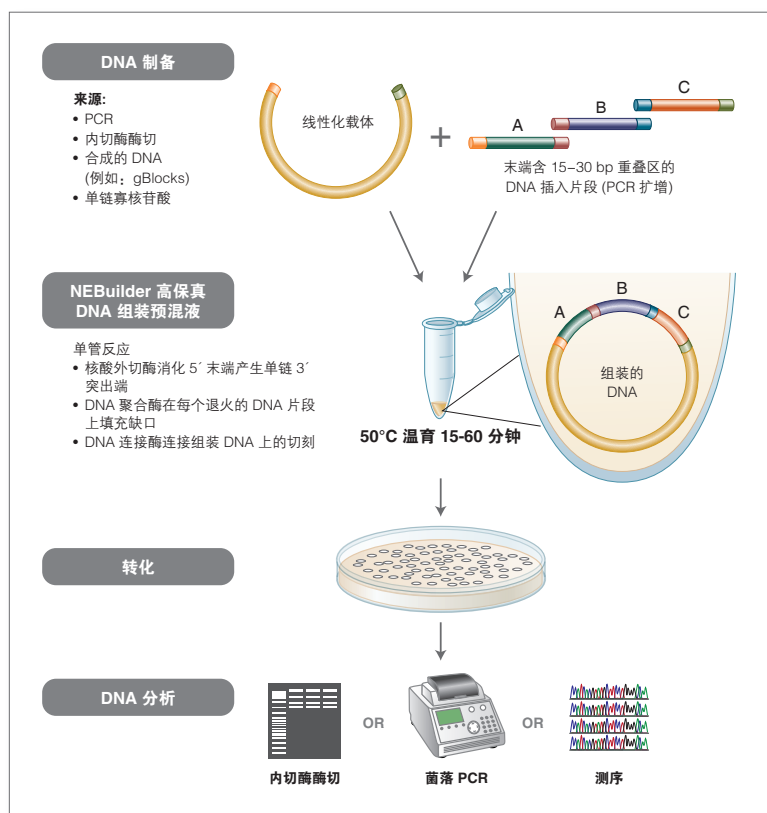
请注意，有时大肠杆菌繁殖过程中出错会损伤预克隆的插入序列或者模块，通常 *E. coli* DNA 聚合酶在一连串的单碱基（例如 AAAA）序列上滑动时，会导致移码突变。如果之前的功能组装元件突然失去功能，可以怀疑是这个问题。



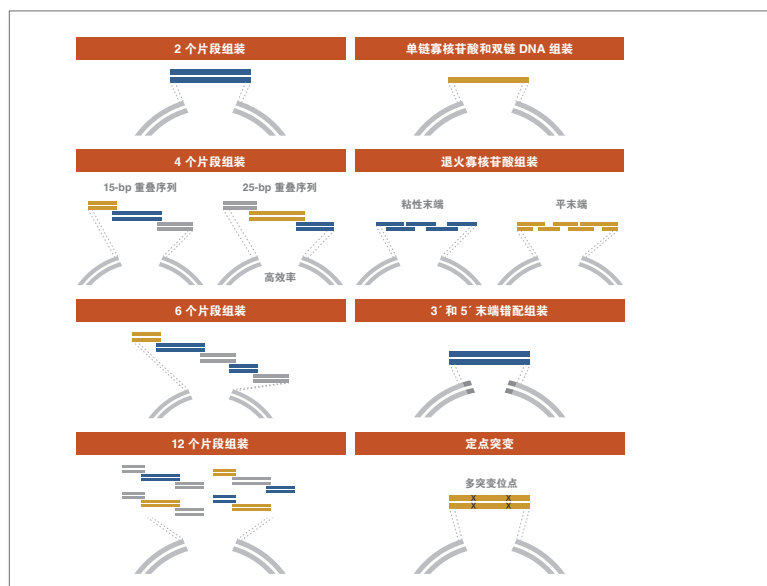
## NEBuilder 高保真 DNA 组装

NEBuilder 高保真 DNA 组装可实现精准的 DNA 片段连接，即便在 5'-端和 3'-端出现错配的情况下，依然如此。试剂盒通过使用新型高保真聚合酶来实现简单快速的无缝克隆，让 NEBuilder 高保真 DNA 组装试剂盒成为 DNA 组装和克隆的首选。

### NEBuilder 高保真 DNA 克隆组装方法概述



### NEBuilder 高保真 DNA 组装可用于不同方法 DNA 组装实验



### 推荐产品

**NEBuilder® 高保真 DNA 组装克隆试剂盒**  
( NEB #E5520, 中国大陆暂不销售 )

**NEBuilder® 高保真 DNA 组装预混液**  
( NEB #E2621 )

**NEBuilder® 高保真 DNA 大片段组装试剂盒**  
( NEB #E2623, 中国大陆暂不销售 )

- 15 分钟内完成简单快速的无缝克隆
- 可用于“标准长度”片段和大片段的组装，片段最多可达 11 个 (20 kb)
- 可直接进行下游实验，DNA 直接用于转化或者作为 PCR 或 RCA 的模板
- 适用性强，适用于各种 DNA 改造，包括定点突变
- 克隆后无需反复筛选、重测序，真正实现无差错、高保真组装
- 由于可去除 5'- 和 3'- 末端的错配序列，NEBuilder HiFi 可进行连续组装
- 使用合成的单链 DNA 寡核苷酸桥式连接两个双链 DNA 片段 (如接头插入或 gRNA 文库)，构建简单又快速
- NEBuilder 产品无技术使用许可费
- NEBuilder 高保真 DNA 组装克隆试剂盒 (NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit) 包含 NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液和 NEB 5-alpha *E. coli* 感受态细胞
- NEBuilder 高保真 DNA 大片段组装试剂盒 (NEBuilder HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments) 包含 NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液和 NEB 10-beta *E. coli* 感受态细胞，可组装大于 15 kb 的质粒

### 工具 & 资源

登陆 [NEBuilderHiFi.com](https://www.neb.com/NEBuilderHiFi.com) 查找:

- 组装和引物设计相关的线上资源
- NEBuilder HiFi 应用指南
- [NEBuilder Assembly Tool](#)，在线引物设计软件



## NEBuilder 高保真 DNA 组装优化建议

### 组装反应

- 如果 PCR 产物在组装体系中的占比 < 20%，则无需纯化 PCR 产物，如果未纯化的 PCR 产物体积高于 20%，可能降低组装效率，所以当组装 3 个或更多 PCR 片段，或者组装的片段长度大于 5 kb 时，强烈推荐对 PCR 产物进行柱纯化。
- 认真阅读操作说明中的指导，使用合适的 DNA 加入量和插入片段与载体的摩尔比。
- 根据组装片段的数量，重叠区的长度可以选择在 15-30 bp 之间。

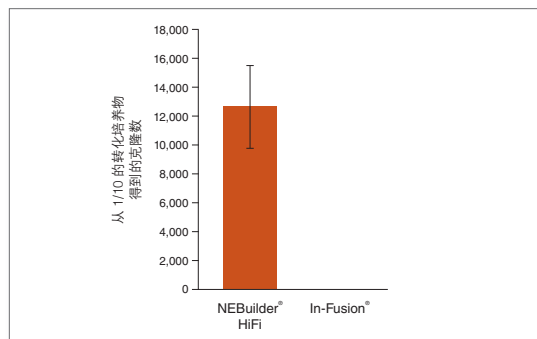
### 引物设计

- 引物设计推荐登陆 [nebuilder.neb.com](http://nebuilder.neb.com)，使用 NEBuilder Assembly Tool。

### 转化

- NEBuilder 高保真 DNA 组装克隆试剂盒 (NEB #E5520) 包含 NEB 5-alpha *E. coli* 感受态细胞 (NEB #C2987)。NEB 建议使用试剂盒提供的高效率感受态细胞。如果不稀释 NEBuilder 组装预混液，其成分可能会抑制其他公司的感受态细胞的功能。NEBuilder 高保真 DNA 大片段组装试剂盒中包含 NEB 10-beta *E. coli* 感受态细胞 (NEB #C3019)，非常适合组装大片段 (> 15 kb)。

### NEBuilder 高保真 DNA 组装克隆试剂盒组装 ssDNA 寡核苷酸与线性化载体



将 1 pmol 的 ssDNA 寡核苷酸与线性化载体 (20 ng, CRISPR 核酸酶 OFP 报告基因) 通过在 50°C 下孵育 15 分钟进行组装反应，将 2 μl 组装后的混合物转化到 NEB 10-beta *E. coli* 感受态细胞 (NEB #C3019) 中，选择 10 个菌落，有 9 个显示正确的序列。而使用 In-Fusion HD 试剂盒则未发现成功组装的 DNA 分子。

## Gibson 组装和 Gibson 组装克隆试剂盒

Gibson 组装是在等温条件下，单管反应实现多个带重叠末端的 DNA 片段的组装，反应不会引入无关序列（无缝组装）。Gibson 组装预混液包含三种不同的酶，且在同一缓冲液中均有活性。将组装好的、完全无缝的质粒转化到 NEB 5-alpha *E. coli* 感受态细胞。整个操作，从组装到转化，只需不到两个小时。登陆 [NEBGibson.com](http://NEBGibson.com) 了解更多信息。



NEBuilder 高保真  
DNA 组装反应  
是如何进行的？

## 操作步骤：组装

使用前，将试剂解冻、完全振荡混匀并置于冰上。

1. 冰上建立如下反应：

|                         | 组装片段建议用量               |                        |         |
|-------------------------|------------------------|------------------------|---------|
|                         | 2-3 个片段组装*             | 4-6 个片段组装**            | 阳性对照*** |
| 建议 DNA 摩尔比              | 载体：插入片段 = 1:2          | 载体：插入片段 = 1:1          |         |
| 片段总量                    | 0.03-0.2 pmol*<br>X μl | 0.2-0.5 pmol**<br>X μl | 10 μl   |
| NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液 | 10 μl                  | 10 μl                  | 10 μl   |
| 去离子水                    | 10-X μl                | 10-X μl                | 0       |
| 总体积                     | 20 μl****              | 20 μl****              | 20 μl   |

\* 载体用量 50-100 ng、插入片段量为载体用量的 2 倍时，组装效率最好。插入片段小于 200 bp 时，插入片段的用量至少为载体用量的 5 倍。未纯化的 PCR 片段的体积不应超过组装反应总体积的 20%。为了得到最佳的组装效率，片段之间应设计 15-20 bp 的重叠区。

\*\* 为达到最佳组装效率，片段之间设计 20-30 bp 的重叠序列，每种片段加入的摩尔量相等（建议：每种片段 0.05 pmol）。

\*\*\* 对照试剂可完成 5 次实验。

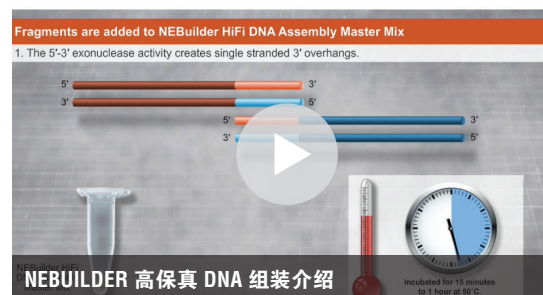
\*\*\*\* 如果组装更多的片段，需增加反应体积，同时增加 NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液的用量。

2. 组装 2-3 个片段，50°C 条件下，在热循环仪中反应 15 分钟；组装 4-6 个片段，50°C 条件下，在热循环仪中反应 60 分钟。反应结束，将样品置于冰上或 -20°C 保存，用于下游转化。

注意：某些情况下，反应时间延长到 60 分钟有助于提高组装效率（详见 FAQ）。

## 操作步骤：NEB 5-alpha *E. coli* 感受态细胞转化

|                      | 标准反应体系                                            |
|----------------------|---------------------------------------------------|
| DNA                  | 2 μl                                              |
| <i>E. coli</i> 感受态细胞 | 50 μl                                             |
| 冰浴时间                 | 冰浴 30 分钟                                          |
| 热激                   | 42°C、30 秒（严格控制时间和反应温度）                            |
| 反应条件                 | 冰上放置 5 分钟，加入 950 μl 室温状态的 SOC 培养基，37°C 振荡培养 60 分钟 |



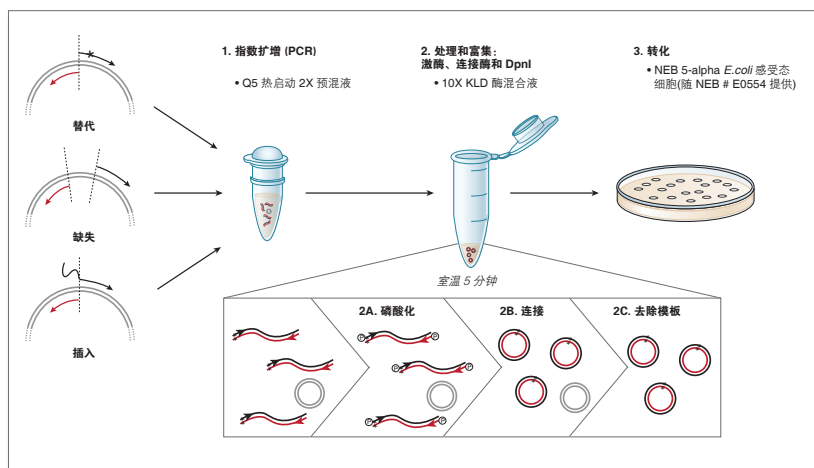




## Q5 定点突变试剂盒

Q5 定点突变试剂盒（含或不含感受态细胞）可以在 2 小时内快速对双链质粒 DNA 进行定点突变。该试剂盒使用 Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶，结合客户自行设计的突变引物，在各种质粒中引入替换、缺失和插入突变。为保证效率，将产物转入高效级 NEB 5-alpha *E. coli* 感受态细胞，质粒长度至少可达 14 kb。

### Q5 定点突变试剂盒概览



## 操作步骤：组装

使用前，完全解冻和混匀预混液后，置于冰上保存。

### 1. 指数扩增

|                           | 25 $\mu$ L 反应体系 | 终浓度         |
|---------------------------|-----------------|-------------|
| Q5 热启动超保真 2X 预混液          | 12.5 $\mu$ L    | 1X          |
| 10 $\mu$ M 正向引物           | 1.25 $\mu$ L    | 0.5 $\mu$ M |
| 10 $\mu$ M 反向引物           | 1.25 $\mu$ L    | 0.5 $\mu$ M |
| 模板 DNA (1–25 ng/ $\mu$ L) | 1 $\mu$ L       | 1–25 ng     |
| 无核酸酶的水                    | 9.0 $\mu$ L     |             |

### 2. KLD 反应

|              | 反应体系      | 终浓度 |
|--------------|-----------|-----|
| PCR 产物       | 1 $\mu$ L |     |
| 2X KLD 反应缓冲液 | 5 $\mu$ L | 1X  |
| 10X KLD 酶预混液 | 1 $\mu$ L | 1X  |
| 无核酸酶的水       | 3 $\mu$ L |     |

## 操作步骤：用 NEB 5-alpha 进行转化

|                      | 标准反应体系                                       |
|----------------------|----------------------------------------------|
| KLD 酶混合液             | 5 $\mu$ L                                    |
| <i>E. coli</i> 感受态细胞 | 50 $\mu$ L                                   |
| 孵育                   | 冰上 30 分钟                                     |
| 热激                   | 精确控制 42°C 30 秒                               |
| 温育                   | 冰上 5 分钟。加入室温的 SOC 950 $\mu$ L, 37°C 振荡 60 分钟 |

### 推荐产品

#### Q5 定点突变试剂盒

(NEB #E0554, 中国大陆暂不销售)

#### Q5 定点突变试剂盒（不含感受态细胞）

(NEB #E0552)

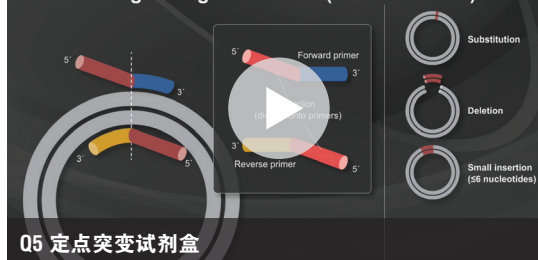
#### KLD 酶混合液 (NEB #M0554)

- 在质粒 DNA 中引入突变、插入或缺失
- 非重叠的引物设计保证高效的指数扩增，并从多种模板中产生高百分比的期望突变
- 分子内连接、NEB 5-alpha 转化可保证菌落的高产量
- Q5 超保真 DNA 聚合酶保真性极高，缩短筛选时间
- 使用常规引物，无需对寡核苷酸进行磷酸化或纯化

### 优化建议

- 登陆 [NEBaseChanger.neb.com](http://NEBaseChanger.neb.com)，使用 [NEBaseChanger](http://NEBaseChanger.neb.com) 在线工具，设计定点突变 (SDM) 引物，以获取最优实验结果
- KLD 反应前后均无需纯化质粒
- 预期突变效率在 90% 以上
- Q5 定点突变 (SDM) 试剂盒提供高效的 NEB 大肠杆菌感受态细胞，但您也可使用自己的化学感受态细胞进行克隆；结果会因感受态细胞的质量和效率不同而有所差异
- KLD 酶混合液 (NEB #M0554) 可单独订购

### Primer design: Large insertions (>6 nucleotides)



了解更多 Q5 定点突变试剂盒的优势。



# 核酸纯化

高质量、高纯度的 DNA 和 RNA 对许多分子克隆工作流程是非常重要的。核酸可从多种样本中纯化，如细胞和组织、酶学反应（如，PCR、连接、酶切）和琼脂糖凝胶基质等。纯化方法已经并将继续针对各种起始样本进行优化，以确保高回收率、高纯度、最小的操作时间及与新兴技术的兼容性。Monarch 核酸纯化产品系列满足了研究人员对分子克隆工作流程上游和下游的需求，该系列包括 DNA 和 RNA 的分离、纯化、质粒提取和胶回收产品。

## Monarch DNA & RNA 纯化试剂盒

### 可持续发展的设计理念

| 产品                                                     | 应用特点                                                                                                                            | 特点                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Monarch 质粒小提试剂盒</b><br>(NEB #T1010)                 | 从细菌培养物中纯化高达 20 µg 的质粒 DNA。                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>洗脱体积低至 30 µl</li> <li>优化的离心柱设计消除了缓冲液和盐残留</li> <li>有色缓冲液系统来监控特定步骤的完成</li> <li>实验开始前无需加入 RNA 酶</li> </ul>                                   |
| <b>Monarch PCR &amp; DNA 纯化回收试剂盒</b><br>(NEB #T1030)   | 从酶学反应中纯化和浓缩高达 5 µg 的 DNA。                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>洗脱体积低至 6 µl</li> <li>优化的离心柱设计消除了缓冲液和盐残留</li> <li>简单的操作优化可纯化 oligos 和其它小 DNA 片段</li> </ul>                                                 |
| <b>Monarch DNA 胶回收试剂盒</b><br>(NEB #T1020)              | 从琼脂糖凝胶中纯化高达 5 µg 的 DNA。                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>洗脱体积低至 6 µl</li> <li>优化的离心柱设计消除了缓冲液和盐残留</li> <li>快速简单的实验操作</li> </ul>                                                                     |
| <b>Monarch 总 RNA 微量提取试剂盒</b><br>(NEB #T2010)           | 从血液、细胞组织和其它样本中提取和纯化高达 100 µg 的总 RNA。                                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>纯化所有片段大小的 RNA，包括 miRNA 和 &gt; 20 nt 的小 RNA</li> <li>提供 DNase I、gDNA 去除离心柱、蛋白酶 K 和稳定试剂</li> <li>提供 RNA 分段提取和 RNA 纯化操作说明书</li> </ul>        |
| <b>Monarch RNA 纯化试剂盒</b><br>(NEB #T2030, T2040, T2050) | 用于在以下实验后纯化和浓缩 RNA:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>提取（如 TRIzol®）</li> <li>体外转录</li> <li>酶学反应</li> <li>凝胶电泳</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>在 5 分钟内分离出高纯度的 RNA</li> <li>快速简单的实验操作</li> <li>优化的离心柱设计消除了缓冲液和盐残留</li> <li>提供 3 种不同结合能力的试剂盒（10 µg, 50 µg 和 500 µg），以灵活满足多种应用需求</li> </ul> |
| <b>Monarch 基因组 DNA 提取试剂盒</b><br>(NEB #T3010)           | 从细胞、血液、组织和其它样本中提取和纯化基因组 DNA。                                                                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>优化的操作说明和缓冲液保证从多种样本中提取得率高</li> <li>提取的 gDNA 长度峰值 &gt; 50 kb</li> <li>试剂盒提供 RNase A 和蛋白酶 K</li> <li>可进行 gDNA 纯化操作</li> </ul>                |

### 优化建议

#### 质粒小提

- **细胞量不要太多**（培养物不应超过 15 O.D. 单位）：使用适量的细胞可增加裂解效率并防止柱子堵塞。
- **完全裂解细胞**：为释放全部的质粒 DNA，所有细胞需要被裂解。完全重悬细胞并按建议时间孵育。
- **细胞裂解后不要震荡**：震荡会引起宿主染色体 DNA 的片段化，导致 gDNA 污染。
- **进行 RNase 处理**：为防止 RNA 污染，不要跳过或省略 RNase 温育步骤（RNase 包含在中和缓冲液中）。
- **不要跳过任何洗涤步骤**：正确的洗涤可确保细胞碎片、内毒素和盐离子的充分去除。

#### 胶回收

- **使用尽可能最小的胶块**：凝胶越多需要的溶解时间越久，需添加更多的溶解缓冲液（引入更多盐离子，与样本共洗脱）
- **缩短暴露在紫外下的时间**：紫外照射会损伤 DNA。只要快速进行切胶操作，损伤可以忽略不计。
- **完全进行凝胶溶解**：凝胶若不完全溶解，DNA 仍留在凝胶中而不被正确提取。

#### DNA 纯化

- **确保柱底不要接触到洗涤后的流经液**：如果不确定，增加一步快速离心。
- **如果质粒大于 > 10 kb**，可将洗脱液加热到 50°C：大的 DNA 结合更牢固；加热有助于从柱子上洗脱 DNA。

#### 基因组 DNA 提取

- **不要重复使用同一套纯化柱**：将纯化柱过度暴露于裂解样本会导致膜脱落。
- **不要超过推荐的样本上样量**：缓冲液体积是根据推荐的上样量优化好的。超过上样量要求会导致裂解不充分和柱子堵塞。
- **确保样本被完全裂解**：样本需要破碎或者完全匀浆以释放全部 DNA。

#### RNA 提取和纯化

- **收集样本后灭活其中的 RNase**：样本中的核酸酶会导致降解，因此有必要对其进行灭活。处理样本要快速，或使用保护试剂，且一直确保在无核酸酶的环境中操作。
- **不要超过推荐的样本上样量**：缓冲液体积是根据推荐的上样量优化好的。超过上样量要求会导致不充分的裂解和柱子堵塞。
- **确保样本被完全匀浆/破碎**：样本需要完全破碎和匀浆以释放全部 RNA。



登陆 [NEBMonarch.com](https://www.neb.com/monarch)  
了解更多信息



# cDNA 合成

RNA 作为起始材料时，可先用反转录酶将其逆转录成 cDNA，然后把 cDNA 作为先前列出的各种克隆方法的模板。根据所遵循的工作流程，生成的 DNA 需要进行纯化。可通过柱离心或胶回收进行纯化。

| cDNA 合成                                                           | 特性                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>试剂盒</b>                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>LunaScript® 反转录 SuperMix 试剂盒</b><br>(NEB #E3010/M3010)         | <ul style="list-style-type: none"><li>• 短片 cDNA 合成的理想选择</li><li>• 一管化的预混液中包含随机引物、oligo-dT 引物、dNTPs、小鼠 RNase 抑制剂和 Luna 反转录酶</li><li>• 可见的蓝色示踪染料方便进行反应体系的建立</li><li>• 13 分钟快速反应流程</li></ul>                                                                                                            |
| <b>LunaScript® 反转录预混液试剂盒 (无引物)</b><br>(NEB #E3025)                | <ul style="list-style-type: none"><li>• 第一链 cDNA 合成的理想选择</li><li>• 兼容随机引物、oligo-dT 引物、基因特异性引物，极大提升了 cDNA 合成的灵活性</li><li>• 5X 的预混液包括 dNTPs、小鼠 RNase 抑制剂和 Luna 反转录酶</li><li>• 可见的蓝色示踪染料方便进行反应体系的建立</li><li>• 13 分钟快速反应流程</li></ul>                                                                     |
| <b>ProtoScript® II cDNA 第一链合成试剂盒</b><br>(NEB #E6560)              | <ul style="list-style-type: none"><li>• 合成长度至少为 10 kb 的 cDNA</li><li>• 含 ProtoScript II 反转录酶，其热稳定性更佳，且降低了 RNase H 活性</li><li>• 便捷的 2 管混合液剂型，含 dNTPs、Oligo-dT 引物和随机引物混合液</li></ul>                                                                                                                    |
| <b>ProtoScript cDNA 第一链合成试剂盒</b><br>(NEB #E6300)                  | <ul style="list-style-type: none"><li>• 合成长度至少为 5 kb 的 cDNA</li><li>• 含 M-MuLV 反转录酶</li><li>• 便捷的 2 管混合液剂型，包含 dNTPs、Oligo-dT 引物和随机引物混合液</li></ul>                                                                                                                                                    |
| <b>模块置换反转录酶混合液</b><br>(NEB #M0466)                                | <ul style="list-style-type: none"><li>• RT 反应过程中，在 cDNA 3' 末端引入一个通用接头序列</li><li>• 对酶混合液和缓冲液进行了优化，提高了模板置换的效率</li><li>• 反转录酶混合液中包含 RNase 抑制剂</li><li>• 高灵敏度的 cDNA 扩增，使以单细胞或低至 2 pg 的人源总 RNA 为起始样品进行 RNA-Seq 转录组分析成为可能</li><li>• 简单实用的操作流程，适用于 5' RACE</li><li>• 完整的 5' 末端转录产物可用于 cDNA 第二链的合成</li></ul> |
| <b>单酶</b>                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>ProtoScript II 反转录酶</b><br>(NEB #M0368)<br>可替代 SuperScript® II | <ul style="list-style-type: none"><li>• M-MuLV 反转录酶降低 RNase H 活性的突变体，提高了热稳定性，降低了 RNase H 活性</li><li>• 提高了反应温度 (37–50°C)</li></ul>                                                                                                                                                                    |
| <b>M-MuLV 反转录酶</b><br>(NEB #M0253)                                | <ul style="list-style-type: none"><li>• 适合多种模板的高效反转录酶</li><li>• 标准反应温度为 37–45°C</li></ul>                                                                                                                                                                                                            |
| <b>AMV 反转录酶</b><br>(NEB #M0277)                                   | <ul style="list-style-type: none"><li>• 高效反转录酶，温度范围覆盖广 (37–52°C)</li><li>• 适用于更高反应温度要求的模板</li></ul>                                                                                                                                                                                                  |
| <b>WarmStart® RTx 反转录酶</b><br>(NEB #M0380)                        | <ul style="list-style-type: none"><li>• 可在室温下进行反应体系的建立</li><li>• 提高反应温度 (50–65°C)</li><li>• 专为 RT-LAMP 等温检测进行了优化</li></ul>                                                                                                                                                                           |

## 优化建议

### 起始材料

- 高纯度完整的 RNA 对产生克隆用的 cDNA 是必要的。
- 总 RNA 或 mRNA 可用于反转录反应。总 RNA 一般足以用于 cDNA 合成反应。但如果需要，可以使用 mRNA 磁性分离试剂盒 (NEB #S1550) 轻松获得 mRNA。
- cDNA 克隆所需 RNA 的量取决于目的转录序列的丰度。一般而言，总 RNA 推荐 1 ng 至 1 µg，mRNA 推荐 0.1 至 100 ng。

### 产品选择

- 使用 ProtoScript II cDNA 第一链合成试剂盒 (NEB #E6560) 简化您的反应流程。试剂盒包含 ProtoScript II 反转录酶 (NEB #M0368)，该酶是热稳定的 M-MuLV (RNase H<sup>-</sup>) 反转录酶，酶的预混液内还包含重组的 RNase 抑制剂，此外，试剂盒还包括单独的含 dNTP 的反应混合液和两种经优化的反转录引物混合液。

### 产量

- ProtoScript II 反转录酶能够在温度最高达 48°C 时生成长度超过 10 kb 的 cDNA。我们推荐常规的反转录在 42°C 进行。
- 您可以使用加倍的酶和 dNTP 的量来提高长 cDNA 产物的产量。

### 添加剂

- 大部分 RT-PCR 反应，无需 RNase H 处理。但对于一些复杂的扩增子或敏感的实验，向反应中加入 2 单位的 *E. coli* RNase H，37°C 温育 20 分钟。

## 操作步骤：cDNA 合成

| 变性反应体系                        |                      |
|-------------------------------|----------------------|
| 总 RNA                         | 1–6 µl (最大量 1 µg)    |
| d(T) <sub>23</sub> VN (50 µM) | 2 µl                 |
| 无核酸酶的水                        | 加至总体积 8 µl           |
| 温育                            | 65°C, 5 分钟。简短离心后置于冰上 |

| 合成反应体系  |                     |
|---------|---------------------|
| 变性的 RNA | 8 µl                |
| 反应预混液   | 10 µl               |
| 酶预混液    | 2 µl                |
| 温育      | 80°C, 5 分钟。–20°C 保存 |



# 限制性酶切

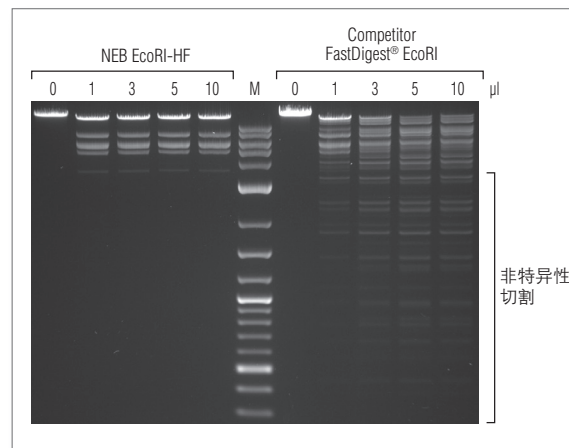
限制性内切酶位点应该选择在插入片段和载体上都有且唯一的位点。做定向克隆时，选择使用两种不同内切酶，酶切位点分别位于插入片段的两端并且是唯一一位点。选择不同内切酶时，片段末端可能是平末端也可能是粘性末端。传统克隆通常要用到限制性内切酶。

## 操作步骤：限制性内切酶反应

|                     | 标准反应体系     | 省时酶切反应体系   |
|---------------------|------------|------------|
| <b>DNA</b>          | up to 1 µg | up to 1 µg |
| <b>10X NEBuffer</b> | 5 µl (1X)  | 5 µl (1X)  |
| <b>限制性内切酶</b>       | 10 单位*     | 1 µl       |
| <b>总体积</b>          | 50 µl      | 50 µl      |
| <b>温育温度</b>         | 因酶而异       | 因酶而异       |
| <b>温育时间</b>         | 60 分钟      | 5–15 分钟**  |

\*足够切割所有类型的 DNAs。

\*\*省时内切酶也可以过夜酶切而不会出现星号活性。



*EcoRI-HF (NEB #R3101) 过夜酶切未产生任何星号活性，即使使用了高浓度的酶也是如此。在 50 µl 的推荐缓冲液反应体系中，加入 1 µg Lambda DNA，酶量如图所示，37°C 条件下温育过夜。Marker M 是 1 kb DNA ladder (NEB #N3232)。*

## 优化建议

### 内切酶

- 从冰箱取出后请一直置于冰上。
- 酶最后加入到反应体系中。
- 加入酶之前将反应混合液混匀，可以用移液枪上下吹打或轻弹管壁，然后在离心机中瞬时离心。切忌振荡混匀。
- 一般情况下，我们推荐使用 5-10 单位酶量/µg DNA，基因组 DNA 用 10-20 单位酶量消化 1 小时。
- 一些限制性内切酶需要多个识别位点才能有效切割，这些酶用“多识别位点”图标 标出。请访问 [www.neb.cn](http://www.neb.cn) 查看使用这些酶的建议。

### 星号活性

- 当内切酶在非最适条件下使用时，可能会产生非特异性切割，例如：
  - 酶过量
  - 温育时间过长
  - 未使用推荐的 Buffer
  - 甘油浓度高于 5%
- 可以通过以下方法降低星号活性：使用高保真（HF）内切酶、减少酶量、缩短温育时间、使用省时（Time-Saver™）内切酶或者增大反应体系。

### DNA

- 避免酚、氯仿、酒精、EDTA、变性剂或盐离子的污染。柱纯化能够轻松做到这一点，或者在纯化过程中增加洗涤次数。
- DNA 的甲基化会抑制某些酶的切割效率。更多信息请登陆 [www.neb.cn/methylation](http://www.neb.cn/methylation)。

### 缓冲液

- 使用终浓度为 1X 的缓冲液。
- 重组白蛋白已被添加到 NEBuffer r1.1、r2.1、r3.1 和 rCutSmart® 缓冲液中，无需额外添加白蛋白。

### 反应体系

- 建议在 50 µl 反应体系中消化 ≤ 1 µg 底物 DNA。这有利于小提制备的 DNA 带来的盐离子维持在较低的水平，而不会影响酶的活性。
- 加入内切酶的量应不超过总体积的 10%，以避免甘油过量引起的星号活性。
- 内切酶贮存液中的添加物（如：甘油和盐）和底物溶液中尚存的污染物（如：盐、EDTA 或乙醇）会导致在小反应体系中出现星号活性。

|              | 酶量*   | DNA    | 10X NEBUFFER |
|--------------|-------|--------|--------------|
| 10 µl 反应体系** | 1 单位  | 0.1 µg | 1 µl         |
| 25 µl 反应体系   | 5 单位  | 0.5 µg | 2.5 µl       |
| 50 µl 反应体系   | 10 单位 | 1 µg   | 5 µl         |

\* 当内切酶用量小时，用推荐稀释液稀释后使用。

\*\* 使用 10 µl 反应体系时，温育时间不要超过 1 小时，以防蒸发。

### 温育时间

- 标准条件温育 1 小时，省时酶切条件温育 5–15 分钟。
- 请登陆 [www.neb.cn/timesaver](http://www.neb.cn/timesaver) 查询省时酶列表。
- 许多内切酶都可以用更少量的酶延长酶切时间，达到同样效果，最长酶切时间可达 16 小时。详情请登陆 [www.neb.cn](http://www.neb.cn)。

### 贮存和稳定性

- 大多数内切酶建议保存在 -20°C。少数内切酶建议保存在 -80°C。详细的贮存信息请登陆 [www.neb.cn](http://www.neb.cn)。
- 10X NEBuffers 应保存在 -20°C。
- 有效期在每管产品的标签上。
- 在任何情况下，都应尽可能的避免将酶置于高于 -20°C 的条件下。



## 限制性内切酶特性表

NEB 目前提供超过 210 种在 rCutSmart 缓冲液中活性为 100% 的内切酶。这大大提高了使用效率、灵活性和简便性，尤其是进行双酶切时。

下表是限制性内切酶性能表，总结了 NEB 限制性内切酶的特性。为了方便选择双酶切的最佳反应条件，该表列出了每种内切酶随酶提供的最佳 NEBuffer 和在其它四种标准缓冲液中的活性。需要注意的是现在已经将重组白蛋白添加到缓冲液中，不再单独提供。此外，特性表中列出了反应温度、热失活温度、推荐稀释液、甲基化敏感性、是否有省时酶（Time-Saver）特性（即在推荐的反应条件下，5 - 15 分钟可完全切割底物，过夜酶切也不会降解 DNA）以及是否对于含有多个酶识别位点的底物可以更好地发挥作用。

### 图标注释

|          |                                            |            |                                                                    |
|----------|--------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>U</b> | 表示该酶使用的是特殊缓冲液，不同于四种标准缓冲液。表中标明了酶与标准缓冲液的兼容性。 | <b>SAM</b> | 单独提供 S-腺苷甲硫氨酸（SAM）。为使相应的酶达到 100% 的活性，需将 SAM 加入到 1X 缓冲液中至说明书标明的终浓度。 |
|          | 重组酶                                        |            | dcm 甲基化敏感                                                          |
|          | 省时而内切酶（Time-Saver）                         |            | CpG 甲基化敏感                                                          |
|          | 经过基因工程改造其活性更佳                              |            | 表示限制性内切酶需要两个或更多位点才能进行酶切                                            |
|          | dam 甲基化敏感                                  |            | 热启动/温启动                                                            |

注意：NEB 已经完成了从含 BSA 的缓冲液（NEBuffer 1.1, 2.1, 3.1 和 CutSmart® 缓冲液）到含重组白蛋白（rAlbumin）的缓冲液（NEBuffer r1.1、r2.1、r3.1 和 rCutSmart™ 缓冲液）的转换。使用含 rAlbumin 或 BSA 的缓冲液，内切酶的活性没有差异。我们已经发布了提供含 rAlbumin 的缓冲液，但列出了两组缓冲液的活性百分比。使用含 rAlbumin 或 BSA 的缓冲液，内切酶的活性没有差异。我们已经发布了提供含 rAlbumin 的缓冲液，但列出了在两组缓冲液的活性百分比。

### 工具 & 资源

登陆 [NEBRestrictionEnzymes.com](https://www.neb.com/restriction-enzymes) 查找：

- HF 限制性内切酶的完整列表
- 最新内切酶活性/性能表
- 限制性酶切反应建立、双酶切和技术问题解答的视频

### 活性注释（见活性表最后一列）

#### 星号活性注释

1. 延长酶切时间、高酶浓度或者甘油浓度超过 5% 可能会导致星号活性。
  2. 延长酶切时间可能会导致星号活性。
  3. 甘油浓度超过 5% 可能会导致星号活性。
- \* 在该缓冲液中可能会出现星号活性。
- \* 为了增加灵活性，NEB 提供一种同裂酶或 HF 酶，配有 rCutSmart 缓冲液。

#### 连接和重新酶切注释

- a. 不足 10% 的酶切片段发生连接
- b. 25% - 75% 的酶切片段发生连接
- c. 低于 5% 的酶切片段可在连接后重新酶切
- d. 50% - 75% 的酶切片段可在连接后重新酶切
- e. 无法实现连接和连接后的重新酶切，原因可能是该酶是切割内切酶或是受甲基化影响，也可能是识别序列包含可变序列。

|  | 内切酶     | 随酶提供的<br>NEBUFFER | 在 NEBUFFER 中的活性 (%) |             |             |                       | 反应<br>温度<br>(°C) | 热失活<br>温度<br>(°C) | 稀释液 | 单位定义<br>底物     | 甲基化<br>敏感性 | 注意<br>事项 |
|--|---------|-------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------------|------------------|-------------------|-----|----------------|------------|----------|
|  |         |                   | r1.1<br>1.1         | r2.1<br>2.1 | r3.1<br>3.1 | rCUTSMART<br>CUTSMART |                  |                   |     |                |            |          |
|  | AatII   | rCutSmart         | < 10                | 50*         | 50          | 100                   | 37°              | 80°               | B   | Lambda         |            |          |
|  | AbaSI   | rCutSmart + DTT   | 25                  | 50          | 50          | 100                   | 25°              | 65°               | C   | T4 wt Phage    |            | e        |
|  | AccI    | rCutSmart         | 50                  | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            |          |
|  | Acc65I  | r3.1              | 10                  | 75*         | 100         | 25                    | 37°              | 65°               | A   | pBC4           |            |          |
|  | AcI     | rCutSmart         | < 10                | 25          | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         |            | d        |
|  | AcII    | rCutSmart         | < 10                | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda         |            |          |
|  | AcuI    | rCutSmart         | 50                  | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda         |            | 1, b, d  |
|  | AfeI    | rCutSmart         | 25                  | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pXba           |            |          |
|  | AfiII   | rCutSmart         | 50                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | phiX174        |            |          |
|  | AfiIII  | r3.1              | 10                  | 50          | 100         | 50                    | 37°              | 80°               | B   | Lambda         |            |          |
|  | AgeI-HF | rCutSmart         | 100                 | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         |            |          |
|  | AhdI    | rCutSmart         | 25                  | 25          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         |            | a        |
|  | AleI-v2 | rCutSmart         | < 10                | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda         |            |          |
|  | AluI    | rCutSmart         | 25                  | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 80°               | B   | Lambda         |            | b        |
|  | AlwI    | rCutSmart         | 50                  | 50          | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda dam-    |            | 1, b, d  |
|  | AlwNI   | rCutSmart         | 10                  | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            |          |
|  | Apal    | rCutSmart         | 25                  | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pXba           |            |          |
|  | ApaLI   | rCutSmart         | 100                 | 100         | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda HindIII |            |          |
|  | ApeKI   | r3.1              | 25                  | 50          | 100         | 10                    | 75°              | No                | B   | Lambda         |            |          |
|  | ApoI    | r3.1              | 10                  | 75          | 100         | 75                    | 50°              | 80°               | A   | Lambda         |            |          |
|  | ApoI-HF | rCutSmart         | 10                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | B   | Lambda         |            |          |
|  | AscI    | rCutSmart         | < 10                | 10          | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            |          |



|  | 内切酶       | 随酶提供的<br>NEBUFFER | 在 NEBUFFER 中的活性 (%) |             |             |                       | 反应<br>温度<br>(°C) | 热失活<br>温度<br>(°C) | 稀释液 | 单位定义<br>底物          | 甲基化<br>敏感性 | 注意<br>事项 |
|--|-----------|-------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------------|------------------|-------------------|-----|---------------------|------------|----------|
|  |           |                   | r1.1<br>1.1         | r2.1<br>2.1 | r3.1<br>3.1 | rCUTSMART<br>CUTSMART |                  |                   |     |                     |            |          |
|  | Asel      | r3.1              | < 10                | 50*         | 100         | 10                    | 37°              | 65°               | B   | Lambda              |            | 3        |
|  | AsiSI     | rCutSmart         | 100                 | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 80°               | B   | pXba (Xho digested) | CpG        | 2, b     |
|  | Aval      | rCutSmart         | < 10                | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda              | CpG        |          |
|  | Avall     | rCutSmart         | 50                  | 75          | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda              | dcm        | CpG      |
|  | AvrII     | rCutSmart         | 100                 | 50          | 50          | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda HindIII      |            |          |
|  | Bael      | rCutSmart + SAM   | 50                  | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda              | CpG        | e        |
|  | BaeGI     | r3.1              | 75                  | 75          | 100         | 25                    | 37°              | 80°               | A   | Lambda              |            |          |
|  | BamHI     | r3.1              | 75*                 | 100*        | 100         | 100*                  | 37°              | No                | A   | Lambda              |            | 3        |
|  | BamHI-HF  | rCutSmart         | 100                 | 50          | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda              |            |          |
|  | BanI      | rCutSmart         | 10                  | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda              | dcm        | CpG      |
|  | BanII     | rCutSmart         | 100                 | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda              |            | 2        |
|  | BbsI      | r2.1              | 100                 | 100         | 25          | 75                    | 37°              | 65°               | B   | Lambda              |            |          |
|  | BbsI-HF   | rCutSmart         | 10                  | 10          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda              |            |          |
|  | BbvI      | rCutSmart         | 100                 | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pBR322              |            | 3        |
|  | BbvCI     | rCutSmart         | 10                  | 100         | 50          | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda              | CpG        | 1, a     |
|  | BclI      | rCutSmart         | 100                 | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pXba                |            | 3, b     |
|  | BceAI     | r3.1              | 100*                | 100*        | 100         | 100*                  | 37°              | 65°               | A   | pBR322              | CpG        | 1        |
|  | BcgI      | r3.1              | 10                  | 75*         | 100         | 50*                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda              | dam        | CpG      |
|  | BciVI     | rCutSmart         | 100                 | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | 80°               | C   | Lambda              |            | b        |
|  | BclI      | r3.1              | 50                  | 100         | 100         | 75                    | 50°              | No                | A   | Lambda dam-         | dam        |          |
|  | BclI-HF   | rCutSmart         | 100                 | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda dam-         | dam        |          |
|  | BcoDI     | rCutSmart         | 50                  | 75          | 75          | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda              | CpG        |          |
|  | Bfal      | rCutSmart         | < 10                | 10          | < 10        | 100                   | 37°              | 80°               | B   | Lambda              |            | 2, b     |
|  | BfuAI     | r3.1              | < 10                | 25          | 100         | 10                    | 50°              | 65°               | B   | Lambda              | CpG        | 3        |
|  | BglI      | r3.1              | 10                  | 25          | 100         | 10                    | 37°              | 65°               | B   | Lambda              | CpG        |          |
|  | BglII     | r3.1              | 10                  | 10          | 100         | < 10                  | 37°              | No                | A   | Lambda              |            |          |
|  | BipI      | rCutSmart         | 50                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda              |            | d        |
|  | BmgBI     | r3.1              | < 10                | 10          | 100         | 10                    | 37°              | 65°               | B   | Lambda              | CpG        | 3, b, d  |
|  | Bmrl      | r2.1              | 75                  | 100         | 75          | 100*                  | 37°              | 65°               | B   | Lambda HindIII      |            | b        |
|  | BmtI      | r3.1              | 100                 | 100         | 100         | 100*                  | 37°              | 65°               | B   | pXba                |            | 2        |
|  | BmtI-HF   | rCutSmart         | 50                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pXba                |            |          |
|  | BpmI      | r3.1              | 75                  | 100         | 100         | 100*                  | 37°              | 65°               | B   | Lambda              |            | 2, d     |
|  | Bpu10I    | r3.1              | 10                  | 25          | 100         | 25                    | 37°              | 80°               | B   | Lambda              |            | 3, b, d  |
|  | BpuEI     | rCutSmart         | 50*                 | 100         | 50*         | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda              |            | d        |
|  | BsaI-HFv2 | rCutSmart         | 100                 | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | B   | pXba                | dcm        | CpG      |
|  | BsaAI     | rCutSmart         | 100                 | 100         | 100         | 100                   | 37°              | No                | C   | Lambda              | CpG        |          |
|  | BsaBI     | rCutSmart         | 50                  | 100         | 75          | 100                   | 60°              | 80°               | B   | Lambda dam-         | dam        | CpG      |
|  | BsaHI     | rCutSmart         | 50                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | C   | Lambda              | dcm        | CpG      |
|  | BsaJI     | rCutSmart         | 50                  | 100         | 100         | 100                   | 60°              | 80°               | A   | Lambda              |            |          |
|  | BsaWI     | rCutSmart         | 10                  | 100         | 50          | 100                   | 60°              | 80°               | A   | Lambda              |            |          |
|  | BsaXI     | rCutSmart         | 50*                 | 100*        | 10          | 100                   | 37°              | No                | C   | Lambda              |            | e        |
|  | BseRI     | rCutSmart         | 100                 | 100         | 75          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda              |            | d        |
|  | BseYI     | r3.1              | 10                  | 50          | 100         | 50                    | 37°              | 80°               | B   | Lambda              | CpG        | d        |
|  | BsgI      | rCutSmart         | 25                  | 50          | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda              |            | d        |
|  | BsiEI     | rCutSmart         | 25                  | 50          | < 10        | 100                   | 60°              | No                | A   | Lambda              | CpG        |          |
|  | BsiHKA1   | rCutSmart         | 25                  | 100         | 100         | 100                   | 65°              | No                | A   | Lambda              |            |          |
|  | BsiWI     | r3.1              | 25                  | 50*         | 100         | 25                    | 55°              | 65°               | B   | phiX174             | CpG        |          |
|  | BsiWI-HF  | rCutSmart         | 50                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | No                | B   | phiX174             | CpG        |          |
|  | BsII      | rCutSmart         | 50                  | 75          | 100         | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda              | dcm        | CpG      |
|  | BsmI      | rCutSmart         | 25                  | 100         | < 10        | 100                   | 65°              | 80°               | A   | Lambda              |            |          |
|  | BsmAI     | rCutSmart         | 50                  | 100         | 100         | 100                   | 55°              | No                | B   | Lambda              | CpG        |          |
|  | BsmBI-v2  | r3.1              | < 10                | 50          | 100         | 25                    | 55°              | 80°               | B   | Lambda              | CpG        |          |



| RN | 内切酶        | 随酶提供的<br>NEBUFFER | 在 NEBUFFER 中的活性 (%) |             |             |                       | 反应<br>温度<br>(°C) | 热失活<br>温度<br>(°C) | 稀释液 | 单位定义<br>底物     | 甲基化<br>敏感性 | 注意<br>事项 |
|----|------------|-------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------------|------------------|-------------------|-----|----------------|------------|----------|
|    |            |                   | r1.1<br>1.1         | r2.1<br>2.1 | r3.1<br>3.1 | rCUTSMART<br>CUTSMART |                  |                   |     |                |            |          |
| RN | BsmFI      | rCutSmart         | 25                  | 50          | 50          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | pBR322         | dam CpG    | 1        |
| RN | BsoBI      | rCutSmart         | 25                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            |          |
| RN | Bsp1286I   | rCutSmart         | 25                  | 25          | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         |            | 3        |
| RN | BspCNI     | rCutSmart         | 100                 | 75          | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            | b        |
| RN | BspDI      | rCutSmart         | 25                  | 75          | 50          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         | dam CpG    |          |
| RN | BspEI      | r3.1              | < 10                | 10          | 100         | < 10                  | 37°              | 80°               | B   | Lambda dam-    | dam CpG    |          |
| RN | BspHI      | rCutSmart         | 10                  | 50          | 25          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         | dam        |          |
| RN | BspMI      | r3.1              | 10                  | 50*         | 100         | 10                    | 37°              | 65°               | B   | Lambda         |            |          |
| RN | BspQI      | r3.1              | 100*                | 100*        | 100         | 100*                  | 50°              | 80°               | B   | Lambda         |            | 3        |
|    | BsrI       | r3.1              | < 10                | 50          | 100         | 10                    | 65°              | 80°               | B   | phiX174        |            | b        |
| RN | BsrBI      | rCutSmart         | 50                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         | CpG        | d        |
| RN | BsrDI      | r2.1              | 10                  | 100         | 75          | 25                    | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            | 3, d     |
| RN | BsrFI-v2   | rCutSmart         | 25                  | 25          | 0           | 100                   | 37°              | No                | C   | pBR322         | CpG        |          |
| RN | BsrGI      | r2.1              | 25                  | 100         | 100         | 25                    | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            |          |
| RN | BsrGI-HF   | rCutSmart         | 10                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda         |            |          |
| RN | BssHII     | rCutSmart         | 100                 | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda         | CpG        |          |
| RN | BssSI-v2   | rCutSmart         | 10                  | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda         |            |          |
| RN | BstAPI     | rCutSmart         | 50                  | 100         | 25          | 100                   | 60°              | 80°               | A   | Lambda         | CpG        | b        |
| RN | BstBI      | rCutSmart         | 75                  | 100         | 10          | 100                   | 65°              | No                | A   | Lambda         | CpG        |          |
| RN | BstEII     | r3.1              | 10                  | 75*         | 100         | 75*                   | 60°              | No                | A   | Lambda         |            | 3        |
| RN | BstEII-HF  | rCutSmart         | < 10                | 10          | < 10        | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda         |            |          |
| RN | BstNI      | r3.1              | 10                  | 100         | 100         | 75                    | 60°              | No                | A   | Lambda         |            | a        |
|    | BstUI      | rCutSmart         | 50                  | 100         | 25          | 100                   | 60°              | No                | A   | Lambda         | CpG        | b        |
| RN | BstXI      | r3.1              | < 10                | 50          | 100         | 25                    | 37°              | 80°               | B   | Lambda         | dam        | 3        |
| RN | BstYI      | rCutSmart         | 25                  | 100         | 75          | 100                   | 60°              | No                | A   | Lambda         |            |          |
| RN | BstZ17I-HF | rCutSmart         | 100                 | 100         | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda         | CpG        | b        |
| RN | Bsu36I     | rCutSmart         | 25                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | C   | Lambda HindIII |            | b        |
| RN | BtgI       | rCutSmart         | 50                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | B   | pBR322         |            |          |
| RN | BtgZI      | rCutSmart         | 10                  | 25          | < 10        | 100                   | 60°              | 80°               | A   | Lambda         | CpG        | 3, b, d  |
| RN | BtsI-v2    | rCutSmart         | 100                 | 100         | 25          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda         |            | 1        |
| RN | BtsIMutI   | rCutSmart         | 100                 | 50          | 10          | 100                   | 55°              | 80°               | A   | pUC19          |            | b        |
| RN | BtsCI      | rCutSmart         | 10                  | 100         | 25          | 100                   | 50°              | 80°               | B   | Lambda         |            |          |
|    | Cac8I      | rCutSmart         | 50                  | 75          | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda         | CpG        | b        |
| RN | Clal       | rCutSmart         | 10                  | 50          | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda dam-    | dam CpG    |          |
| RN | CspCI      | rCutSmart         | 10                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         |            | e        |
| RN | CviAII     | rCutSmart         | 50                  | 50          | 10          | 100                   | 25°              | 65°               | C   | Lambda         |            |          |
| RN | CviK1-1    | rCutSmart         | 25                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | No                | A   | pBR322         |            | 1, b     |
| RN | CviQI      | r3.1              | 75                  | 100*        | 100         | 75*                   | 25°              | No                | C   | Lambda         |            | b        |
| RN | DdeI       | rCutSmart         | 75                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda         |            |          |
| RN | DpnI       | rCutSmart         | 100                 | 100         | 75          | 100                   | 37°              | 80°               | B   | pBR322         | CpG        | b        |
| RN | DpnII      | U                 | 25                  | 25          | 100*        | 25                    | 37°              | 65°               | B   | Lambda dam-    | dam        |          |
| RN | DraI       | rCutSmart         | 75                  | 75          | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         |            |          |
| RN | DraIII-HF  | rCutSmart         | < 10                | 50          | 10          | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda         | CpG        | b        |
| RN | DrdI       | rCutSmart         | 25                  | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pUC19          | CpG        | 3        |
| RN | EaeI       | rCutSmart         | 10                  | 50          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         | dam CpG    | b        |
| RN | EagI-HF    | rCutSmart         | 25                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pXba           | CpG        |          |
| RN | EarI       | rCutSmart         | 50                  | 10          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda         | CpG        | b, d     |
| RN | EciI       | rCutSmart         | 100                 | 50          | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         | CpG        | 2        |
| RN | Eco53kI    | rCutSmart         | 100                 | 100         | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pXba           | CpG        | 3, b     |
| RN | EcoNI      | rCutSmart         | 50                  | 100         | 75          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda         |            | b        |
| RN | EcoO109I   | rCutSmart         | 50                  | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda HindIII | dam        | 3        |

1. 延长酶切时间、高酶浓度或者甘油浓度超过 5%可能会导致星号活性。

2. 延长酶切时间可能会导致星号活性。  
3. 甘油浓度超过 5%可能会导致星号活性。

\* 在该缓冲液中可能会出现星号活性。  
† NEB 提供兼容这种缓冲液的同裂酶或 HF 酶



|  |  |       | 内切酶        | 随酶提供的<br>NEBUFFER       | 在 NEBUFFER 中的活性 ( % ) |             |             |                       | 反应<br>温度<br>(°C) | 热失活<br>温度<br>(°C) | 稀释液 | 单位定义<br>底物            | 甲基化<br>敏感性 | 注意<br>事项 |         |
|--|--|-------|------------|-------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-----------------------|------------------|-------------------|-----|-----------------------|------------|----------|---------|
|  |  |       |            |                         | r1.1<br>1.1           | r2.1<br>2.1 | r3.1<br>3.1 | rCUTSMART<br>CUTSMART |                  |                   |     |                       |            |          |         |
|  |  | 2*alt | EcoP15I    | r3.1 + ATP              | 75                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pUC19                 |            | e        |         |
|  |  |       | EcoRI      | U                       | 25                    | 100*        | 50          | 50*                   | 37°              | 65°               | C   | Lambda                | CpG        |          |         |
|  |  | e     | EcoRI-HF   | rCutSmart               | 10                    | 100         | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | C   | Lambda                | CpG        |          |         |
|  |  |       | EcoRV      | r3.1                    | 10                    | 50          | 100         | 10                    | 37°              | 80°               | A   | Lambda                | CpG        |          |         |
|  |  | e     | EcoRV-HF   | rCutSmart               | 25                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda                | CpG        |          |         |
|  |  |       | Esp3I      | rCutSmart               | 100                   | 100         | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda                | CpG        |          |         |
|  |  |       | FatI       | r2.1                    | 10                    | 100         | 50          | 50                    | 37°              | 80°               | A   | pUC19                 |            |          |         |
|  |  |       | FauI       | rCutSmart               | 100                   | 50          | 10          | 100                   | 55°              | 65°               | A   | Lambda                | CpG        | 3, b, d  |         |
|  |  |       | Fnu4HI     | rCutSmart               | < 10                  | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda                | CpG        | a        |         |
|  |  | 2*alt | FokI       | rCutSmart               | 100                   | 100         | 75          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                | dcm        | CpG      | 3, b, d |
|  |  |       | FseI       | rCutSmart               | 100                   | 75          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pBC4                  | dcm        | CpG      |         |
|  |  |       | FspI       | rCutSmart               | 10                    | 100         | 10          | 100                   | 37°              | No                | C   | Lambda                |            | CpG      | b       |
|  |  |       | FspEI      | rCutSmart + Enz. Activ. | < 10                  | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | 80°               | B   | pBR322                | dcm        |          | 1, e    |
|  |  |       | HaeII      | rCutSmart               | 25                    | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | HaeIII     | rCutSmart               | 50                    | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda                |            |          |         |
|  |  |       | HgaI       | r1.1                    | 100                   | 100         | 25          | 100*                  | 37°              | 65°               | A   | phiX174               |            | CpG      | 1       |
|  |  |       | HhaI       | rCutSmart               | 25                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | HincII     | rCutSmart               | 25                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | HindIII    | r2.1                    | 25                    | 100         | 50          | 50                    | 37°              | 80°               | B   | Lambda                |            |          | 2       |
|  |  | e     | HindIII-HF | rCutSmart               | 10                    | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | B   | Lambda                |            |          |         |
|  |  |       | HinfI      | rCutSmart               | 50                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | HinPII     | rCutSmart               | 100                   | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | HpaI       | rCutSmart               | < 10                  | 75*         | 25          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda                |            | CpG      | 1       |
|  |  |       | HpaII      | rCutSmart               | 100                   | 50          | < 10        | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | HphI       | rCutSmart               | 50                    | 50          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda                | dam        | CpG      | 1, b, d |
|  |  |       | Hpy99I     | rCutSmart               | 50                    | 10          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | Hpy166II   | rCutSmart               | 100                   | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | C   | pBR322                |            | CpG      |         |
|  |  |       | Hpy188I    | rCutSmart               | 25                    | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pBR322                | dam        |          | 1, b    |
|  |  |       | Hpy188III  | rCutSmart               | 100                   | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pUC19                 | dam        | CpG      | 3, b    |
|  |  |       | HpyAV      | rCutSmart               | 100                   | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 65°               |     | Lambda                |            | CpG      | 3, b, d |
|  |  |       | HpyCH4III  | rCutSmart               | 100                   | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                |            |          | b       |
|  |  |       | HpyCH4IV   | rCutSmart               | 100                   | 50          | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pUC19                 |            | CpG      |         |
|  |  |       | HpyCH4V    | rCutSmart               | 50                    | 50          | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                |            |          |         |
|  |  |       | I-CeuI     | rCutSmart               | 10                    | 10          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pBHS Scal-linearized  |            |          |         |
|  |  |       | I-SceI     | rCutSmart               | 10                    | 50          | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pGPS2 NotI-linearized |            |          |         |
|  |  |       | KasI       | rCutSmart               | 50                    | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pBR322                |            | CpG      | 3       |
|  |  | e     | KpnI-HF    | rCutSmart               | 100                   | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | No                | A   | pXba                  |            |          |         |
|  |  |       | LpnPI      | rCutSmart + Enz. Activ. | < 10                  | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pBR322                |            |          | 1, e    |
|  |  |       | MboI       | rCutSmart               | 75                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda dam-           | dam        | CpG      |         |
|  |  | 2*alt | MboII      | rCutSmart               | 100*                  | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | C   | Lambda dam-           | dam        |          | b       |
|  |  | e     | MfeI-HF    | rCutSmart               | 75                    | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda                |            |          |         |
|  |  |       | MluI       | r3.1                    | 10                    | 50          | 100         | 25                    | 37°              | 80°               | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  | e     | MluI-HF    | rCutSmart               | 25                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda                |            | CpG      |         |
|  |  |       | MluCI      | rCutSmart               | 100                   | 10          | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda                |            |          |         |
|  |  |       | MlyI       | rCutSmart               | 50                    | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                |            |          | b, d    |
|  |  | 2*alt | MmeI       | rCutSmart               | 50                    | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | phiX174               |            | CpG      | b, c    |
|  |  |       | MnII       | rCutSmart               | 75                    | 100         | 50          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda                |            |          | b       |
|  |  |       | MscI       | rCutSmart               | 25                    | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | C   | Lambda                | dcm        |          |         |
|  |  |       | MseI       | rCutSmart               | 75                    | 100         | 75          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda                |            |          |         |
|  |  |       | MsiI       | rCutSmart               | 50                    | 50          | < 10        | 100                   | 37°              | 80°               | A   | Lambda                |            |          |         |
|  |  |       | MspI       | rCutSmart               | 75                    | 100         | 50          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda                |            |          |         |

a. 不足 10% 的酶切片段发生连接  
b. 25% – 75% 的酶切片段发生连接

c. 低于 5% 的酶切片段可在连接后重新酶切  
d. 50% – 75% 的酶切片段可在连接后重新酶切

e. 无法实现连接和连接后的重新酶切，原因可能是该酶是切刻内切酶或是受甲基化影响，也可能是识别序列包含可变序列。



## DNA 制备 – 限制性酶切

|  | 内切酶                | 随酶提供的<br>NEBUFFER       | 在 NEBUFFER 中的活性 (%) |             |             |                       | 反应<br>温度<br>(°C) | 热失活<br>温度<br>(°C) | 稀释液 | 单位定义<br>底物      | 甲基化<br>敏感性 | 注意<br>事项 |
|--|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------------|------------------|-------------------|-----|-----------------|------------|----------|
|  |                    |                         | r1.1<br>1.1         | r2.1<br>2.1 | r3.1<br>3.1 | rCUTSMART<br>CUTSMART |                  |                   |     |                 |            |          |
|  | MspA1I             | rCutSmart               | 10                  | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda          | CpG        |          |
|  | MspJI              | rCutSmart + Enz. Activ. | < 10                | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pBR322          |            | 1, e     |
|  | MwoI               | rCutSmart               | < 10                | 100         | 100         | 100                   | 60°              | No                | B   | Lambda          | CpG        |          |
|  | 2' site<br>NaeI    | rCutSmart               | 25                  | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | No                | A   | pXba            | CpG        | b        |
|  | 2' site<br>NarI    | rCutSmart               | 100                 | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pXba            | CpG        |          |
|  | Nb.BbvCI           | rCutSmart               | 25                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | A   | pUB             |            | e        |
|  | Nb.BsmI            | r3.1                    | < 10                | 50          | 100         | 10                    | 65°              | 80°               | A   | pBR322          |            | e        |
|  | Nb.BsrDI           | rCutSmart               | 25                  | 100         | 100         | 100                   | 65°              | 80°               | A   | pUC19           |            | e        |
|  | Nb.BssSI           | r3.1                    | 10                  | 100         | 100         | 25                    | 37°              | No                | B   | pUC19           |            | e        |
|  | Nb.BtsI            | rCutSmart               | 75                  | 100         | 75          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | phiX174         |            | e        |
|  | NciI               | rCutSmart               | 100                 | 25          | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda          | CpG        | b        |
|  | NcoI               | r3.1                    | 100                 | 100         | 100         | 100+                  | 37°              | 80°               | A   | Lambda          |            |          |
|  | NcoI-HF            | rCutSmart               | 50                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | B   | Lambda          |            |          |
|  | NdeI               | rCutSmart               | 75                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda          |            |          |
|  | 2' site<br>NgoMIV  | rCutSmart               | 100                 | 50          | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | pXba            | CpG        | 1        |
|  | NheI-HF            | rCutSmart               | 100                 | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | 80°               | C   | Lambda HindIII  | CpG        |          |
|  | NlaIII             | rCutSmart               | < 10                | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | phiX174         |            |          |
|  | NlaIV              | rCutSmart               | 10                  | 10          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pBR322          | dcm        | CpG      |
|  | 2' site<br>NmeAIII | rCutSmart               | 10                  | 10          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | phiX174         |            | c        |
|  | NotI               | r3.1                    | < 10                | 50          | 100         | 25                    | 37°              | 65°               | C   | pBC4            | CpG        |          |
|  | NotI-HF            | rCutSmart               | 25                  | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pBC4            | CpG        |          |
|  | NruI               | r3.1                    | < 10                | 10          | 100         | 10                    | 37°              | No                | A   | Lambda          | dam        | CpG      |
|  | NruI-HF            | rCutSmart               | 0                   | 25          | 50          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda          | dam        | CpG      |
|  | NsiI               | r3.1                    | 10                  | 75          | 100         | 25                    | 37°              | 65°               | B   | Lambda          |            |          |
|  | NsiI-HF            | rCutSmart               | < 10                | 20          | < 10        | 100                   | 37°              | 80°               | B   | Lambda          |            |          |
|  | NspI               | rCutSmart               | 100                 | 100         | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda          |            |          |
|  | Nt.AlwI            | rCutSmart               | 10                  | 100         | 100         | 100                   | 37°              | 80°               | A   | pUC101 dam-dcm- | dam        | e        |
|  | Nt.BbvCI           | rCutSmart               | 50                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 80°               | A   | pUB             | CpG        | e        |
|  | Nt.BsmAI           | rCutSmart               | 100                 | 50          | 10          | 100                   | 37               | 65°               | A   | pBR322          | CpG        | e        |
|  | Nt.BspQI           | r3.1                    | < 10                | 25          | 100         | 10                    | 50°              | 80°               | B   | pUC19           |            | e        |
|  | Nt.BstNBI          | r3.1                    | 0                   | 10          | 100         | 10                    | 55°              | 80°               | A   | T7              |            | e        |
|  | Nt.CviPII          | rCutSmart               | 10                  | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pUC19           | CpG        | e        |
|  | PacI               | rCutSmart               | 100                 | 75          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pNEB193         |            |          |
|  | PaeR7I             | rCutSmart               | 25                  | 100         | 10          | 100                   | 37°              | No                | A   | Lambda HindIII  | CpG        |          |
|  | 2' site<br>PaqCI   | rCutSmart               | < 10                | 100         | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda          | CpG        | 1        |
|  | PciI               | r3.1                    | 50                  | 75          | 100         | 50*                   | 37°              | 80°               | B   | pXba            |            |          |
|  | PfiFI              | rCutSmart               | 25                  | 100         | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pBC4            |            | b        |
|  | PfIMI              | r3.1                    | 0                   | 100         | 100         | 50                    | 37°              | 65°               | A   | Lambda          | dcm        | 3, b, d  |
|  | PI-PspI            | U                       | 10                  | 10          | 10          | 10                    | 65°              | No                | B   | pAKR XmnI       |            |          |
|  | PI-SceI            | U                       | 10                  | 10          | 10          | 10                    | 37°              | 65°               | B   | pBSvdeX XmnI    |            |          |
|  | 2' site<br>PleI    | rCutSmart               | 25                  | 50          | 25          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda          | CpG        | b, d     |
|  | 2' site<br>PluTI   | rCutSmart               | 100                 | 25          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | pXba            | CpG        | b        |
|  | PmeI               | rCutSmart               | < 10                | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda          | CpG        |          |
|  | PmlI               | rCutSmart               | 100                 | 50          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda HindIII  | CpG        |          |
|  | PpuMI              | rCutSmart               | < 10                | < 10        | < 10        | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda HindIII  | dcm        |          |
|  | PshAI              | rCutSmart               | 25                  | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | A   | Lambda          | CpG        |          |
|  | 2' site<br>PstI-v2 | rCutSmart               | 25                  | 50          | 10          | 100                   | 37°              | 65°               | B   | Lambda          |            | 3        |
|  | PspGI              | rCutSmart               | 25                  | 100         | 50          | 100                   | 75°              | No                | A   | T7              | dcm        | 3        |
|  | PspOMI             | rCutSmart               | 10                  | 10          | < 10        | 100                   | 37°              | 65°               | B   | pXba            | dcm        | CpG      |
|  | PspXI              | rCutSmart               | < 10                | 100         | 25          | 100                   | 37°              | No                | B   | Lambda HindIII  | CpG        |          |
|  | PstI               | r3.1                    | 75                  | 75          | 100         | 50*                   | 37°              | 80°               | C   | Lambda          |            |          |

1. 延长酶切时间、高酶浓度或者甘油浓度超过 5% 可能会导致星号活性。

2. 延长酶切时间可能会导致星号活性。  
3. 甘油浓度超过 5% 可能会导致星号活性。

\* 在该缓冲液中可能会出现星号活性。  
† NEB 提供兼容这种缓冲液的同裂酶或 HF 酶



|                                                                                     | 内切酶                    | 随酶提供的<br>NEBUFFER | 在 NEBUFFER 中的活性 ( % ) |             |             |                       | 反应<br>温度<br>(℃) | 热失活<br>温度<br>(℃) | 稀释液 | 单位定义<br>底物          | 甲基化<br>敏感性                                                                            | 注意<br>事项                                                                              |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|-------------|-------------|-----------------------|-----------------|------------------|-----|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------|
|                                                                                     |                        |                   | r1.1<br>1.1           | r2.1<br>2.1 | r3.1<br>3.1 | rCUTSMART<br>CUTSMART |                 |                  |     |                     |                                                                                       |                                                                                       |         |
|    | PstI-HF                | rCutSmart         | 10                    | 75          | 50          | 100                   | 37°             | No               | C   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|    | PvuI                   | r3.1              | < 10                  | 25          | 100         | < 10                  | 37°             | No               | B   | pXba                |    |                                                                                       |         |
|    | PvuI-HF                | rCutSmart         | 25                    | 100         | 100         | 100                   | 37°             | No               | B   | pXba                |    |                                                                                       |         |
|    | PvuII                  | r3.1              | 50                    | 100         | 100         | 100*                  | 37°             | No               | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|    | PvuII-HF               | rCutSmart         | < 10                  | < 10        | < 10        | 100                   | 37°             | No               | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|    | RsaI                   | rCutSmart         | 25                    | 50          | < 10        | 100                   | 37°             | No               | A   | Lambda              |    |                                                                                       |         |
|    | RsrII                  | rCutSmart         | 25                    | 75          | 10          | 100                   | 37°             | 65°              | C   | Lambda              |    |                                                                                       |         |
|    | SacI-HF                | rCutSmart         | 10                    | 50          | < 10        | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda HindIII      |    |                                                                                       |         |
|   | SacII                  | rCutSmart         | 10                    | 100         | 10          | 100                   | 37°             | 65°              | A   | pXba                |   |                                                                                       |         |
|  | Sall                   | r3.1              | < 10                  | < 10        | 100         | < 10                  | 37°             | 65°              | A   | Lambda HindIII      |  |                                                                                       |         |
|  | Sall-HF                | rCutSmart         | 10                    | 100         | 100         | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda HindIII      |  |                                                                                       |         |
|  | SapI                   | rCutSmart         | 75                    | 50          | < 10        | 100                   | 37°             | 65°              | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | Sau3AI                 | r1.1              | 100                   | 50          | 10          | 100 <sup>+</sup>      | 37°             | 65°              | A   | Lambda              |  | b                                                                                     |         |
|  | Sau96I                 | rCutSmart         | 50                    | 100         | 100         | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda              |  |  |         |
|  | SbfI-HF                | rCutSmart         | 50                    | 25          | < 10        | 100                   | 37°             | 80°              | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | Scal-HF                | rCutSmart         | 100                   | 100         | 10          | 100                   | 37°             | 80°              | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | ScrFI                  | rCutSmart         | 100                   | 100         | 100         | 100                   | 37°             | 65°              | C   | Lambda              |  |  | 2, a    |
|  | SexAI                  | rCutSmart         | 100                   | 75          | 50          | 100                   | 37°             | 65°              | A   | pBC4 dcm-           |  |                                                                                       | 3, b, d |
|  | SfaNI                  | r3.1              | < 10                  | 75          | 100         | 25                    | 37°             | 65°              | B   | phiX174             |  |                                                                                       | 3, b    |
|  | SfiI                   | rCutSmart         | 75                    | 50          | 25          | 100                   | 37°             | 65°              | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       | 3       |
|  | SfiI                   | rCutSmart         | 25                    | 100         | 50          | 100                   | 50°             | No               | C   | pXba                |  |  |         |
|  | SfoI                   | rCutSmart         | 50                    | 100         | 100         | 100                   | 37°             | No               | B   | Lambda HindIII      |  |  |         |
|  | SgrAI                  | rCutSmart         | 100                   | 100         | 10          | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda              |  |                                                                                       | 1       |
|  | SmaI                   | rCutSmart         | < 10                  | < 10        | < 10        | 100                   | 37°             | 65°              | B   | Lambda HindIII      |  |                                                                                       | b       |
|  | SmlI                   | rCutSmart         | 25                    | 75          | 25          | 100                   | 55°             | No               | A   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       | b       |
|  | SnaBI                  | rCutSmart         | 50*                   | 50          | 10          | 100                   | 37°             | 80°              | A   | T7                  |  |                                                                                       | 1       |
|  | SpeI-HF                | rCutSmart         | 25                    | 50          | 10          | 100                   | 37°             | 80°              | C   | pXba                |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | SphI                   | r2.1              | 100                   | 100         | 50          | 100 <sup>+</sup>      | 37°             | 65°              | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       | 2       |
|  | SphI-HF                | rCutSmart         | 50                    | 25          | 10          | 100                   | 37°             | 65°              | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | SrfI                   | rCutSmart         | 10                    | 50          | 0           | 100                   | 37°             | 65°              | B   | pNEB193-SrFI        |  |                                                                                       |         |
|  | SspI                   | U                 | 50                    | 100         | 50          | 50                    | 37°             | 65°              | C   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | SspI-HF                | rCutSmart         | 25                    | 100         | < 10        | 100                   | 37°             | 65°              | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | StuI                   | rCutSmart         | 50                    | 100         | 50          | 100                   | 37°             | No               | A   | Lambda              |  |                                                                                       |         |
|  | StyD4I                 | rCutSmart         | 10                    | 100         | 100         | 100                   | 37°             | 65°              | B   | Lambda              |  |  |         |
|  | StyI-HF                | rCutSmart         | 25                    | 100         | 25          | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | Swal                   | r3.1              | 10                    | 10          | 100         | 10                    | 25°             | 65°              | B   | pXba                |                                                                                       |                                                                                       | b, d    |
|  | TaqI-v2                | rCutSmart         | 50                    | 100         | 50          | 100                   | 65°             | No               | B   | Lambda              |  |                                                                                       |         |
|  | TfiI                   | rCutSmart         | 50                    | 100         | 100         | 100                   | 65°             | No               | C   | Lambda              |  |                                                                                       |         |
|  | TseI                   | rCutSmart         | 75                    | 100         | 100         | 100                   | 65°             | No               | B   | Lambda              |  |                                                                                       | 3       |
|  | Tsp45I                 | rCutSmart         | 100                   | 50          | < 10        | 100                   | 65°             | No               | A   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | TspMI                  | rCutSmart         | 50*                   | 75*         | 50*         | 100                   | 75°             | No               | B   | pUCAAdeno           |  |                                                                                       | d       |
|  | TspRI                  | rCutSmart         | 25                    | 50          | 25          | 100                   | 65°             | No               | B   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | Tth111I                | rCutSmart         | 25                    | 100         | 25          | 100                   | 65°             | No               | B   | pBC4                |                                                                                       |                                                                                       | b       |
|  | WarmStart®<br>Nt.BstNI | r3.1              | 0                     | 10          | 100         | 25                    | 55°             | 80°              | A   | T7                  |                                                                                       |                                                                                       |         |
|  | XbaI                   | rCutSmart         | < 10                  | 100         | 75          | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda HindIII dam- |  |                                                                                       |         |
|  | XcmI                   | r2.1              | 10                    | 100         | 25          | 100*                  | 37°             | 65°              | C   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       | 2       |
|  | XhoI                   | rCutSmart         | 75                    | 100         | 100         | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda HindIII      |                                                                                       |                                                                                       | b       |
|  | XmaI                   | rCutSmart         | 25                    | 50          | < 10        | 100                   | 37°             | 65°              | A   | pXba                |  |                                                                                       | 3       |
|  | XmnI                   | rCutSmart         | 50                    | 75          | < 10        | 100                   | 37°             | 65°              | A   | Lambda              |                                                                                       |                                                                                       | b       |
|  | ZraI                   | rCutSmart         | 100                   | 25          | 10          | 100                   | 37°             | 80°              | B   | Lambda              |  |                                                                                       |         |

a. 不足 10% 的酶切片段发生连接  
b. 25% – 75% 的酶切片段发生连接

c. 低于 5% 的酶切片段可在连接后重新酶切  
d. 50% – 75% 的酶切片段可在连接后重新酶切

e. 无法实现连接和连接后的重新酶切，原因可能是该酶是切刻内切酶或是受甲基化影响，也可能是识别序列包含可变序列。



## DNA 修饰酶在 rCutSmart 反应缓冲液中的活性表

选出了一系列 DNA 修饰酶用 rCutSmart 缓冲液代替随酶提供的缓冲液进行酶活检测。比较酶在 rCutSmart 缓冲液（添加必须的辅助因子）和随酶提供的缓冲液中的活性。反应体系根据修饰酶的推荐反应体系建立，用 rCutSmart 缓冲液替代随酶提供的反应缓冲液。

| 酶                                     | 在 rCutSmart 缓冲液中的活性 | 必须的辅助因子                   |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| 热敏磷酸酶                                 | +++                 | Requires Zn <sup>2+</sup> |
| <i>Bst</i> DNA 聚合酶                    | +++                 |                           |
| CpG 甲基转移酶 (M.SssI)                    | +++                 |                           |
| DNA 聚合酶 I                             | +++                 |                           |
| DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow)                | +++                 |                           |
| Klenow 片段 (3' → 5' exo <sup>-</sup> ) | +++                 |                           |
| DNase I (无 RNase)                     | +++                 | Requires Ca <sup>2+</sup> |
| <i>E. coli</i> DNA 连接酶                | +++                 | Requires NAD              |
| 核酸内切酶 III (Nth)                       | +++                 |                           |
| 核酸内切酶 VIII                            | +++                 |                           |
| 核酸外切酶 I                               | +++                 |                           |
| 核酸外切酶 III                             | +++                 |                           |
| 核酸外切酶 VII                             | +++                 |                           |
| 核酸外切酶 V (RecBCD)                      | +++                 | Requires ATP              |
| 8- 氧代鸟嘌呤 DNA 糖基化酶 (Fpg)               | +++                 |                           |
| GpC 甲基转移酶 (M.CviPI)                   | +                   | Requires DTT              |
| Hi-T4™ 耐热 DNA 连接酶                     | +++                 | Requires ATP              |
| Lambda 核酸外切酶                          | ++                  |                           |
| McrBC                                 | +++                 |                           |
| 微球菌核酸酶                                | +++                 | Requires Ca <sup>2+</sup> |
| phi29 DNA 聚合酶                         | +++                 | Requires DTT              |
| 快速 CIP                                | +++                 |                           |
| RecJ <sub>1</sub> 核酸外切酶               | +++                 |                           |
| Salt-T4™ 耐盐 DNA 连接酶                   | +                   | Requires ATP              |
| 虾碱性磷酸酶 (rSAP)                         | +++                 |                           |
| T3 DNA 连接酶                            | +++                 | Requires ATP + PEG        |
| T4 DNA 连接酶                            | +++                 | Requires ATP              |
| T4 DNA 聚合酶                            | +++                 |                           |
| T4 噬菌体 β- 葡萄糖基转移酶 (T4-BGT)            | +++                 |                           |
| T4 多聚核苷酸激酶 (T4 PNK)                   | +++                 | Requires ATP + DTT        |
| T4 多聚核苷酸激酶 (3' 磷酸酶活性缺失)               | +++                 | Requires ATP + DTT        |
| T5 核酸外切酶                              | +++                 |                           |
| T7 DNA 连接酶                            | +++                 | Requires ATP + PEG        |
| T7 DNA 聚合酶 (未修饰)                      | +++                 |                           |
| T7 核酸外切酶                              | +++                 |                           |
| 热敏核酸外切酶 I                             | +++                 |                           |
| USER® 酶, 重组                           | +++                 |                           |

+++ 具有 100% 功能活性

++ 具有 50–100% 功能活性

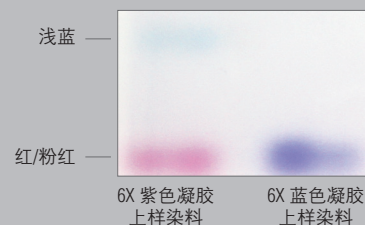
+ 具有 0–50% 功能活性

### 推荐产品

#### 6X 紫色凝胶上样染料 (NEB #B7024)

NEB 随大部分限制性内切酶提供紫色凝胶上样染料 (6X)。

- 无紫外阴影，可以得到出版级电泳图
- 包含 Ficoll®，便于获得更亮更清晰的条带
- 包含 SDS，有助于得到更锐利的条带
- 包含 EDTA，用于终止酶促反应
- 可用于琼脂糖和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳
- 我们的紫色凝胶上样染料可以得到更清晰锐利的条带，消除其它染料容易出现的紫外阴影，并且提供不含 SDS 的版本 (NEB #B7025)



使用不同凝胶上样染料电泳图谱比较



## PCR / 扩增

因所用聚合酶不同，扩增产物（插入片段）也会不同，可生成平末端插入片段或带 1 个碱基突出末端的插入片段。此外，引物可将内切酶识别位点整合到产物上。扩增后的插入片段可直接使用或克隆到保持载体中，或进行酶切产生粘性末端。扩增通常是 PCR 克隆、无缝克隆、非连接依赖的克隆和重组克隆的第一步。

### 克隆用 PCR 聚合酶产品选择表

近 50 年来，NEB 公司在生命科学研究和生产试剂领域，一直处于领导者地位。NEB 提供各种 DNA 聚合酶，并致力于为 PCR 和相关应用研发具有创新性和高品质的工具。下表简要描述了如何针对您的克隆实验选择最佳的聚合酶。

| 特性               | 标准 PCR                    |                    | 高保真 PCR              |                                  |                         | 特殊 PCR                          |                        |              |
|------------------|---------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------|
|                  | OneTaq®/<br>OneTaq<br>热启动 | Taq/<br>Taq<br>热启动 | 最高保真度                |                                  | 中等<br>保真度               | 长片段<br>扩增                       | 含 dU<br>片段扩则           |              |
|                  |                           |                    | Q5®/Q5<br>热启动        | Phusion® (4)<br>/Phusion<br>Flex | Vent®/<br>Deep<br>Vent™ | LongAmp®/<br>LongAmp<br>热启动 Taq | Epimark®<br>热启动<br>Taq | Q5U™         |
| 保真度与 Taq 比较      | 2X                        | 1X                 | ~280X <sup>(2)</sup> | > 39X                            | 5-6X                    | 2X                              | 1X                     | ND           |
| 扩增长度             | < 6 kb                    | ≤ 5 kb             | ≤ 20 kb              | ≤ 20 kb                          | ≤ 6 kb                  | ≤ 30 kb                         | ≤ 1 kb                 | app-specific |
| 延伸速率             | 1 kb/min                  | 1 kb/min           | 6 kb/min             | 4 kb/min                         | 1 kb/min                | 1.2 kb/min                      | 1 kb/min               | 2 kb/min     |
| 产物末端结构           | 3' A/平末端                  | 3' A               | 平末端                  | 平末端                              | 平末端                     | 3' A/平末端                        | 3' A                   | 平末端          |
| 3'→5' 外切酶活性      | 有                         | 无                  | 有                    | 有                                | 有                       | 有                               | 无                      | 有            |
| 5'→3' 外切酶活性      | 有                         | 有                  | 无                    | 无                                | 无                       | 有                               | 有                      | 无            |
| Units/50 µl 反应体系 | 1.25                      | 1.25               | 1.0                  | 1.0                              | 0.5-1.0                 | 5.0                             | 1.25                   | 1.0          |
| 退火温度             | Tm-5                      | Tm-5               | Tm-3                 | Tm-3                             | Tm-5                    | Tm-5                            | Tm-5                   | Tm-3         |
| <b>应用</b>        |                           |                    |                      |                                  |                         |                                 |                        |              |
| 常规 PCR           | ★                         | •                  | •                    | •                                | •                       | •                               |                        |              |
| 菌落 PCR           | ★                         | •                  |                      |                                  |                         |                                 |                        |              |
| 增强保真度            | •                         |                    | ★                    | •                                | •                       | •                               |                        |              |
| 高保真度             |                           |                    | ★                    | •                                |                         |                                 |                        |              |
| 高产量              | ★                         | •                  | ★                    | •                                |                         |                                 |                        |              |
| 快速               |                           |                    | ★                    | •                                |                         |                                 |                        |              |
| 长片段扩增            |                           |                    | ★                    | •                                |                         | ★                               |                        |              |
| 富含 GC 模板         | ★                         |                    | ★                    |                                  | •                       | •                               |                        |              |
| 富含 AT 模板         | ★                         | •                  | ★                    | •                                |                         | •                               | •                      | ★            |
| 高通量              | •                         | •                  | •                    | •                                |                         |                                 | •                      | ★            |
| 多重 PCR           | •                         | ★ <sup>(1)</sup>   | •                    | •                                |                         |                                 |                        |              |
| DNA 标记           |                           | ★                  |                      |                                  |                         |                                 |                        |              |
| 定点突变             |                           |                    | ★                    | •                                |                         |                                 |                        |              |
| 预防污染             |                           |                    |                      |                                  |                         |                                 | •                      | ★            |
| USER® 克隆         |                           |                    |                      |                                  |                         |                                 | •                      | ★            |
| <b>剂型</b>        |                           |                    |                      |                                  |                         |                                 |                        |              |
| 热启动              | •                         | •                  | •                    | •                                |                         | •                               | •                      | •            |
| 试剂盒              |                           | •                  | •                    | •                                |                         | •                               |                        | •            |
| 预混液              | •                         | •                  | •                    | •                                |                         | •                               |                        | •            |
| 直接凝胶上样           | •                         | •                  |                      |                                  |                         |                                 |                        |              |

(1) Phusion DNA 聚合酶是由 Finnzymes Oy (现为 Thermo Fisher Scientific 的子公司) 研发。

本产品由 NEB 按照 Thermo Fisher Scientific 公司的性能并获得允许生产。

(2) 使用多重 PCR 5X 预混液。

(3) 由于错配率非常低，像 Q5 等高保真酶的错误率是很难通过严谨的统计学方法得到。我们会继续探究检测 Q5 的极低错配率，以确保给出最准确的保真度数据。(Popatov, V. and Ong, J.L. (2017) PLoS One, 12(1):e0169774. doi:10.1371/journal.pone.0169774)

★ 应用推荐

### 开始 PCR 实验

- 选择聚合酶时，我们推荐从 OneTaq 或 Q5 DNA 聚合酶（左表中用橙色突出显示）开始。两款酶都具有超强扩增能力且适用于多种模板（常规模板，富含 AT 和富含 GC 的模板）。Q5 具有最高的保真度，也有专门优化用于二代测序的剂型。

### 工具 & 资源

登陆 [NEBPCRPolymerases.com](http://NEBPCRPolymerases.com) 查找：

- 聚合酶完整列表
- 常见问题解答和问题解决指南
- 实验设计相关的互动工具
- 建立 PCR 反应的线上教程



了解如何扩增富含 GC 的 DNA



选择您 PCR 实验的最  
适聚合酶，可登陆  
[PCRSelector.neb.com](http://PCRSelector.neb.com)  
使用 NEB 的 PCR Selector  
工具

为何选择用 Q5  
进行 PCR 反应？





## 操作步骤：用 Q5 进行高保真 PCR

|                  | 25 µl<br>反应体系 | 50 µl<br>反应体系 | 终浓度                 |
|------------------|---------------|---------------|---------------------|
| 5X Q5 反应缓冲液*     | 5 µl          | 10 µl         | 1X                  |
| 10 mM dNTPs      | 0.5 µl        | 1 µl          | 200 µM              |
| 10 µM 引物（正向和反向）  | 1.25 µl       | 2.5 µl        | 0.5 µM              |
| 模板 DNA           | 因模板而异         | 因模板而异         | < 1 µg              |
| 无核酸酶的水           | to 25 µl      | to 50 µl      |                     |
| Q5 超保真 DNA 聚合酶** | 0.25 µl       | 0.5 µl        | 0.02 units/50 µl 反应 |

\* 困难模板扩增可使用 Q5 High GC Enhancer。

\*\* 若扩增子 > 6 kb，每 50 µl 反应体系可添加酶量到 2 units。

|       | 循环数 | 温度       | 时间           |
|-------|-----|----------|--------------|
| 预变性：  | 1   | 98°C     | 30 秒         |
| 变性    | 30  | 98°C     | 5–10 秒       |
| 退火    |     | 50–72°C* | 10–30 秒      |
| 延伸    |     | 72°C     | 20–30 秒 / kb |
| 再延伸：  | 1   | 72°C     | 2 分钟         |
| Hold： | 1   | 4–10°C   |              |

\* 使用 NEB 的 Tm calculator ([TmCalculator.com](https://www.neb.com/tools-and-resources/online-tools/tm-calculator)) 确定退火温度。请注意 Q5 和 Phusion® 推荐的特殊退火温度。

## 操作步骤：用 OneTaq® 进行常规 PCR

|                    | 25 µl<br>反应体系 | 50 µl<br>反应体系 | 终浓度                 |
|--------------------|---------------|---------------|---------------------|
| 5X OneTaq 标准反应缓冲液* | 5 µl          | 10 µl         | 1X                  |
| 10 mM dNTPs        | 0.5 µl        | 1 µl          | 200 µM              |
| 10 µM 引物（正向和反向）    | 0.5 µl        | 1 µl          | 0.2 µM              |
| 模板 DNA             | 因模板而异         | 因模板而异         | < 1 µg              |
| 无核酸酶的水             | to 25 µl      | 加至 50 µl      |                     |
| OneTaq DNA 聚合酶**   | 0.125 µl      | 0.25 µl       | 1.25 units/50 µl 反应 |

\* 如果缓冲液是 5X，则体积加倍。

\*\* 聚合酶的添加量因所用聚合酶而异。登陆 [neb.com](https://www.neb.com) 了解更多信息。

|       | 循环数 | 温度       | 时间        |
|-------|-----|----------|-----------|
| 预变性：  | 1   | 94°C     | 30 秒      |
| 变性    | 30  | 94°C     | 15–30 秒   |
| 退火    |     | 45–68°C* | 15–60 秒   |
| 延伸    |     | 68°C     | 1 分钟 / kb |
| 再延伸：  | 1   | 68°C     | 5 分钟      |
| Hold： | 1   | 4–10°C   |           |

\* 使用 NEB 的 Tm calculator ([TmCalculator.com](https://www.neb.com/tools-and-resources/online-tools/tm-calculator)) 确定退火温度。

## 优化建议

当从 Taq 酶转换到高保真聚合酶时，请使用：

- 更高的退火温度 – 检索 [TmCalculator.neb.com](https://www.neb.com) 了解
- 更高的变性温度 – 尤其是在处理困难模板时更为有利
- 更高的引物浓度
- 更短的循环步骤

## DNA 模板

- 尽可能使用高质量、经过纯化的 DNA 模板。扩增未纯化的 DNA 时（如菌落 PCR 或直接 PCR），请参阅特定的产品信息。
- 低复杂度的模板（如质粒、λ 或 BAC DNA），每 50 µl 反应体系加入 1 pg–10 ng DNA
- 高复杂度的模板（如基因组 DNA），每 50 µl 反应体系加入 1 ng–1 µg DNA
- DNA 浓度增高会降低扩增特异性，尤其是循环次数较多时

## 引物

- 通常引物长度为 20–30 个核苷酸，GC 含量为 40–60%
- 引物的 Tm 值可通过 NEB 的 Tm Calculator 计算 ([TmCalculator.neb.com](https://www.neb.com/tools-and-resources/online-tools/tm-calculator))
- 两条引物间 Tm 差值应在 5°C 以内
- 避免引物形成引物内二级结构（如发卡结构）以及引物二聚体

- 引物浓度过高会降低特异性
- 当在引物末端引入限制性酶切位点时，需要在识别位点 5' 端额外添加 6 个碱基

## 聚合酶浓度

- 聚合酶的最佳浓度因酶而异
- 预混液剂型已包含针对大多数应用的最佳的酶浓度

## 镁离子浓度

- NEB 提供的大多数 PCR 缓冲液在 1X 浓度下已含有足够浓度的 Mg<sup>2+</sup>
- Mg<sup>2+</sup> 浓度过高可能导致非特异性扩增产物。Mg<sup>2+</sup> 浓度过低可能导致反应失败

## dNTPs

- 理想的 dNTP 浓度通常为每种 200 µM
- 当使用古细菌 PCR 聚合酶时，引物、模板或 dNTP 混合液中的尿嘧啶会导致反应失败。针对这类反应可使用 OneTaq、Taq 或 Q5U DNA 聚合酶。

## 建立反应

- 除非使用热启动聚合酶，否则需在冰上混合各种反应组分
- 尽可能最后加入聚合酶
- 将反应体系放入已经预热至变性温度的

热循环仪中。在使用热启动聚合酶（如 Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶或 OneTaq 热启动 DNA 聚合酶）时无需预加热循环仪。

## 变性

- 避免长时间或高温温育，除非因模板富含 GC 需要
- NEB 提供基于核酸适配子的热启动聚合酶，无需额外的变性步骤来激活聚合酶

## 退火

- 引物的 Tm 值可通过 NEB 的 Tm Calculator 计算 ([TmCalculator.neb.com](https://www.neb.com/tools-and-resources/online-tools/tm-calculator))
- 通过优化退火温度或改用热启动 DNA 聚合酶（如 Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶或 OneTaq 热启动 DNA 聚合酶）可避免非特异产物

## 延伸

- 延伸速率因酶而异。一般而言，延伸速率范围为 15–60 s/kb。
- 过长的延伸时间会增加错配率，增加非特异扩增和/或减少扩增子产量



# 常见 DNA 末端修饰

做分子克隆实验，通常需要对双链 DNA 末端进行修饰。连接酶要求在供体的 5' 末端含有单磷酸基，在受体的 3' 末端含有羟基。不仅如此，还需求两个要连接的片段带有互补序列，可以是平末端连接平末端，也可以是粘性末端连接互补的粘性末端。末端修饰可以确保要连接的末端具有互补性，并且提高克隆效率。

## 磷酸化

经酶切后的载体和插入片段，含克隆所需的末端修饰（5' 磷酸基和 3' 羟基），但 PCR 扩增的片段末端可能无此修饰。常见 PCR 不使用磷酸化引物，因此，扩增子的 5' 末端未被磷酸化，需要通过激酶（如 T4 PNK，NEB #M0201）处理后加上磷酸基团。此外，可订购带 5' 磷酸基的引物进行 PCR，产生带有 5' 磷酸化末端的扩增片段，以省略激酶处理步骤。

## 操作步骤：用 T4 PNK 磷酸化

|                | 标准反应体系          |
|----------------|-----------------|
| DNA            | 1-2 μg          |
| 10X T4 PNK 缓冲液 | 5 μl            |
| 10 mM ATP      | 5 μl (终浓度 1 mM) |
| T4 PNK         | 1 μl (10 单位)    |
| 无核酸酶的水         | 至 50 μl         |
| 温育条件           | 37°C 30 分钟      |

## 去磷酸化

传统克隆的去磷酸化操作，可防止载体在连接过程中的再环化。如果用 1 种内切酶对载体进行线性化或 2 种内切酶进行双酶切，但末端又互补，这时就需要用磷酸酶对载体 5' 末端进行去磷酸化处理，以减少载体分子间的内连接而发生重新环化的概率，从而降低后期转化反应的背景。如果是载体去磷酸化了，则插入片段一定要含有 5' 磷酸基，以确保后续连接。在转化（和体内修复）之前，连接点的双链 DNA 中，至少有一条链形成了完整的磷酸二酯键。

## 磷酸酶产品选择表

|                  | 重组碱性磷酸酶 (NEB #M0371) | 热敏磷酸酶 (AP) (NEB #M0289) | 快速 CIP (NEB #M0525) |
|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| FEATURES         |                      |                         |                     |
| 100%热失活          | 5 分钟 / 65°C          | 2 分钟 / 80°C             | 2 分钟 / 80°C         |
| 高比活性             | ●                    |                         | ●                   |
| 改进稳定性            | ●                    |                         | ●                   |
| 直接用于 NEB buffers | ●                    | ●                       | ●                   |
| 需额外添加            |                      | ● (Zn <sup>2+</sup> )   |                     |
| 省时步骤             |                      |                         | ●                   |

## 操作步骤：使用快速 CIP 进行去磷酸化

|                   | 标准反应体系          |
|-------------------|-----------------|
| DNA               | 1 pmol 的 DNA 末端 |
| 10X rCutSmart 缓冲液 | 2 μl            |
| 快速 CIP            | 1 μl            |
| 无核酸酶的水            | 加至 20 μl        |
| 温育                | 37°C 10 分钟      |
| 热失活               | 80°C 2 分钟       |

### 优化建议

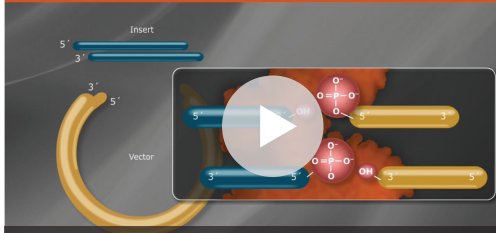
#### 酶

- T4 PNK (NEB #M0201) 和 T4 DNA 连接酶 (NEB #M0202) 可在 T4 DNA 连接酶缓冲液中联合使用。
- T4 PNK 活性受到以下因素抑制：高盐 (150 mM NaCl 可抑制 50%活性)、高磷酸盐 (7 mM 磷酸盐可抑制 50%活性) 和高铵离子浓度 (7 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 可抑制 75%活性)。
- 使用 T4 PNK 处理 5' 凹陷末端，先将反应体系在 70°C 的条件下加热 10 分钟，迅速置于冰上冷却，然后加入 ATP (或含有 ATP 的连接酶缓冲液) 和酶，进行 37°C 温育。

#### 添加剂

- 添加 PEG 8000 (≤ 5%) 可以提高实验效率。

### DNA 去磷酸化概述



### 去磷酸化原理

### 优化建议

#### 酶

- 当对内切酶酶切后的片段去磷酸化时，若使用的内切酶不能热失活，则需要进行 DNA 纯化。推荐使用 Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒 (NEB #T1030)。
- 使用以下可热失活的磷酸酶，连接前无需 DNA 纯化，如：快速 CIP (NEB #M0525)、重组碱性磷酸酶 (NEB #M0371) 或热敏磷酸酶 (NEB #M0289)。

#### 添加剂

- 热敏磷酸酶 (AP) 反应时要添加 Zn<sup>2+</sup>，若使用其它 NEBuffers 时，要在反应体系中补加 1X 热敏磷酸酶反应缓冲液。

去磷酸化概述





## 末端平齐化/末端修复

末端平齐化可对限制性酶切所产生的单链突出进行补平，或以突出序列作为聚合模板在互补链上添加核苷酸，或使用外切酶切割突出末端。通常将载体和插入片段“平齐化”，以便连接非互补序列。平齐化会丢失或改变序列信息，因此要谨慎。通常，若平齐化未发生在翻译区及关键调控区时，进行平末端改造影响不大。但对翻译编码序列区进行平齐化常会造成读码框移位。最常用于补平 5' 突出末端 (5'→3') 和切割 3' 突出末端 (3'→5') 的酶是 DNA 聚合酶，如 DNA 聚合酶 I (Klenow 片段) 和快速末端平齐化试剂盒 (NEB #E1201) 中提供的 T4 DNA 聚合酶。切除 5' 突出末端可以用核酸酶来完成，如绿豆核酸酶 (NEB #M0250)。

## 平齐化产品选择表

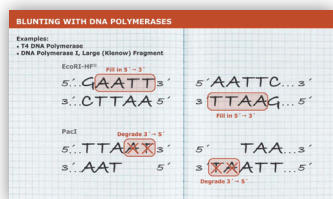
|           | T4 DNA 聚合酶*<br>(NEB #M0203) | DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow)<br>(NEB #M0210) | 快速末端平齐化试剂盒<br>(NEB #E1201) | 绿豆核酸酶<br>(NEB #M0250) |
|-----------|-----------------------------|----------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 应用        |                             |                                        |                            |                       |
| 5' 突出末端补平 | ●                           | ●                                      | ●                          |                       |
| 3' 突出末端切割 | ●                           | ●                                      | ●                          | ●                     |
| 5' 突出末端切割 |                             |                                        |                            | ●                     |

\* T4 DNA 聚合酶有很强的 3'→5' 外切酶活性。

## 操作步骤：使用快速末端平齐化试剂盒进行末端平齐化

|                | STANDARD PROTOCOL                                    |
|----------------|------------------------------------------------------|
| DNA            | up to 5 µg                                           |
| 平齐化缓冲液(10X)    | 2.5 µl                                               |
| dNTP 混合液(1 mM) | 2.5 µl                                               |
| 平齐化酶混合液        | 1 µl                                                 |
| 无核酸酶的水         | 加至 25 µl                                             |
| 温育             | 室温；内切酶消化的 DNA 温育 15 分钟；打断的/雾化的 DNA 或 PCR 产物*温育 30 分钟 |
| 热失活            | 70°C 10 分钟                                           |

\* PCR 产物 DNA 在平齐化之前，必须先进行纯化，可以使用纯化试剂盒 (NEB #T1030)、苯酚萃取/乙醇沉淀或胶回收 (NEB #T1020)。



DNA 平齐化教程教你如何识别突出末端类型、选择适用于平齐该末端的酶以及使用方法。

## 优化建议

### 酶

- 选择正确的酶来进行平齐化。快速末端平齐化试剂盒 (NEB #E1201)、T4 DNA 聚合酶 (NEB #M0203) 和 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow) (NEB #M0210) 可补平 5' 突出末端并切割 3' 突出末端。绿豆核酸酶 (NEB #M0250) 可切割 5' 突出末端。
- T4 DNA 聚合酶和 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow) 在所有的 NEBuffers 中都有活性，反应需添加 dNTPs。

### 纯化

- 当对内切酶酶切后的片段进行平齐化时，如果内切酶可热失活，则在平齐化前无需纯化。如果内切酶不可热失活，建议在平齐化前纯化 DNA。
- 平齐化 PCR 扩增产物时，有必要事先进行 DNA 纯化 (例如，Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒，NEB #T1030) 以去除核苷酸和聚合酶。
- 末端平齐化后进行去磷酸化时，需要在平齐化步骤后先纯化 DNA (例如，Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒，NEB #T1030)，然后再用磷酸酶去除磷酸基。

### 温度

- 用绿豆核酸酶进行平齐化时，建议室温孵育，因为较高温度可能会导致 dsDNA 末端降解。使用的酶量和反应时间可以凭经验确定，以获得最佳结果为准。

### 热失活

- 不要对绿豆核酸酶反应进行热失活。尽管绿豆核酸酶自身可被热失活，但不推荐，因为在绿豆核酸酶失活之前，DNA 开始“呼吸”，此时绿豆核酸酶会导致不可控的 DNA 降解。用苯酚/氯仿萃取结合乙醇沉淀或离心柱 (NEB #T1030) 纯化 DNA。



## 加 A 尾

加尾是通过酶学方法，将非模板核苷酸添加到双链 DNA 分子的 3' 平末端。在 TA 克隆中，加尾通常用于 T 载体的制备，或者给高保真聚合酶（非 *Taq* DNA 聚合酶）的 PCR 产物末端加 A 尾。TA 克隆是一种快速克隆 PCR 产物的方法，在连接和转化反应前，它利用 T 载体的 T（胸腺嘧啶）与 *Taq* DNA 聚合酶引入的单碱基 A（腺苷）互补结合。该技术不涉及内切酶使用，而是直接使用无需修饰的 PCR 产物。此外，PCR 引物不需要设计限制性酶切位点，简化操作。缺点是该方法是非定向克隆，插入片段克隆进载体的方向是双向的。

### 优化建议

- 用高保真度聚合酶扩增的片段，需在加尾反应前纯化 DNA。我们推荐 Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）。若不纯化，反应体系中的高保真聚合酶将移除添加到扩增片段末端的任意非模板核苷酸。

## 加 A 尾产品选择表

|        | Klenow 片段<br>(3'→5' exo <sup>-</sup> )<br>(NEB #M0212) | <i>Taq</i> DNA 聚合酶 |
|--------|--------------------------------------------------------|--------------------|
| 特性     |                                                        |                    |
| 反应温度   | 37°C                                                   | 75°C               |
| 热失活    | 75°C 20 分钟                                             | No                 |
| 核苷酸辅因子 | dATP                                                   | dATP               |

## 操作步骤：用 Klenow 片段（3'→5' exo<sup>-</sup>）加 A 尾

|                                                  | 标准反应体系              |
|--------------------------------------------------|---------------------|
| 纯化的平末端 DNA                                       | 1–5 µg*             |
| NEBuffer 2 (10X)                                 | 5 µl                |
| dATP (1 mM)                                      | 0.5 µl (终浓度 0.1 mM) |
| Klenow 片段 (3'→5' exo <sup>-</sup> ) (NEB #M0212) | 3 µl                |
| 水                                                | 加至 50 µl            |
| 温育                                               | 37°C 30 分钟          |

\* 如果起始样本是平末端 DNA，且该 DNA 是 PCR 产物或是经过平齐化获得的 DNA，DNA 必须先纯化以去除反应体系中的酶。



# 载体和插入片段连接

## DNA 连接

DNA 连接是现代分子生物学流程中的关键步骤。DNA 连接酶可催化双链 DNA 上由单链断裂产生的相邻残基之间的切刻连接，也可催化双链断裂的连接。相邻 DNA 残基的 3' 羟基和 5' 磷酸基间形成磷酸二酯键，分三步完成：首先，连接酶与游离 ATP 反应进行自腺苷化；接着，腺苷基团转移到“供体”DNA 链的 5' 磷酸基末端；最后，腺苷化的 DNA 链的 5' 磷酸基末端与相邻 DNA 链的 3' 羟基发生反应并释放 AMP，形成磷酸二酯键。在生物体内，DNA 连接酶是 DNA 复制和修复的关键酶。在实验室中，DNA 连接被用于克隆和非克隆实验。

分子克隆用于制备重组 DNA，重组 DNA 是能在微生物宿主内自主复制的独立于染色体存在的环状 DNA 分子。DNA 连接常用于分子克隆实验，将 DNA 载体与目的 DNA 片段（“插入片段”）进行共价连接。DNA 片段的末端可以是平末端也可以是粘性末端，且至少有一个片段的 5' 末端含有单磷酸基团。遵循上述机制，DNA 分子间形成共价键，生成闭环环状 DNA 分子，并能够转化宿主细菌。转化到宿主体内的重组 DNA 质粒可进行扩增并用于多种下游应用，如 DNA 测序、蛋白质表达或基因表达/功能分析。

最近，NEB 发表了关于 T4 DNA 连接酶保真度的研究。这些信息有助于改进 DNA 组装方法（如 Golden Gate 组装）。

有关详细信息，请访问 [www.neb.cn/GoldenGate](http://www.neb.cn/GoldenGate)

## 克隆用 DNA 连接酶产品选择表

|                            | 瞬时粘性末端连接酶预混液<br>(NEB #M0370) | 平末端 /TA 连接酶预混液<br>(NEB #M0367) | Electroligase® 电转连接酶<br>(NEB #M0369) | T4 DNA 连接酶<br>(NEB #M0202) | 快速试剂盒<br>(NEB #M220) | T3 DNA 连接酶<br>(NEB #M0317) | T7 DNA 连接酶<br>(NEB #M0318) | Taq 高保真 DNA 连接酶<br>(NEB #M0647) | SALT-T4® 耐盐 DNA 连接酶<br>(NEB #M0467) | Hi-T4™ 耐热 DNA 连接酶<br>(NEB #M262) | NEBridge® 连接酶预混液<br>(NEB #M100) |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <b>DNA 应用</b>              |                              |                                |                                      |                            |                      |                            |                            |                                 |                                     |                                  |                                 |
| 连接粘性末端                     | ●●●                          | ●●                             | ●●                                   | ●●                         | ●●●                  | ●●                         | ●●                         | ●                               | ●●                                  | ●●                               | ●                               |
| 连接平末端                      | ●                            | ●●●                            | ●●                                   | ●●                         | ●●●                  | ●●                         |                            |                                 | ●●                                  | ●●                               | ●                               |
| T/A 克隆                     | ●                            | ●●●                            | ●●                                   | ●●                         | ●●                   | ●                          | ●                          |                                 | ●●                                  | ●●                               |                                 |
| 电转化                        |                              |                                | ●●●                                  | ●●                         |                      |                            |                            |                                 |                                     | ●●                               |                                 |
| 仅连接粘性末端                    |                              |                                |                                      |                            |                      |                            | ●●●                        |                                 |                                     |                                  |                                 |
| dsDNA 切刻修复                 | ●●                           | ●●                             | ●●                                   | ●●●                        | ●●                   | ●●                         | ●●                         | ●●                              | ●●●                                 | ●●●                              |                                 |
| 构建复杂克隆文库                   | ●●                           | ●●                             | ●●                                   | ●●●                        | ●●                   |                            |                            |                                 |                                     |                                  |                                 |
| <b>特性</b>                  |                              |                                |                                      |                            |                      |                            |                            |                                 |                                     |                                  |                                 |
| 盐离子耐受力<br>(≥2X T4 DNA 连接酶) |                              |                                |                                      |                            |                      | ✓                          |                            |                                 | ✓                                   |                                  |                                 |
| 15 分钟或更快速连接                | ✓                            | ✓                              |                                      | ✓                          | ✓                    | ✓                          | ✓                          | ✓                               | ✓                                   | ✓                                |                                 |
| 预混液剂型                      | ✓                            | ✓                              |                                      |                            |                      |                            |                            |                                 |                                     |                                  | ✓                               |
| 热稳定                        |                              |                                |                                      |                            |                      |                            |                            | ✓                               |                                     |                                  |                                 |
| 耐热                         |                              |                                |                                      |                            |                      |                            |                            |                                 |                                     | ✓                                |                                 |
| 重组酶                        | ✓                            | ✓                              | ✓                                    | ✓                          | ✓                    | ✓                          | ✓                          | ✓                               | ✓                                   | ✓                                | ✓                               |

### 准备实验

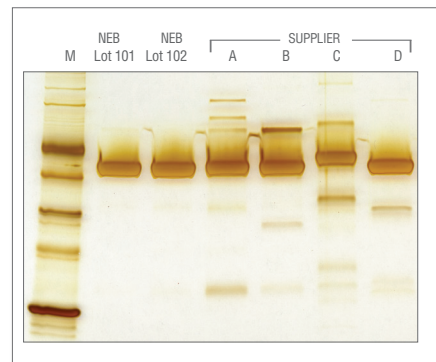
传统克隆实验操作，请遵循连接酶供应商给出的连接操作指南。若供应商建议插入序列与载体的摩尔比为 3:1，请首先尝试此操作以获得最佳结果。质量比跟摩尔比不是一个概念，除非插入序列和载体的质量相同，两者才会等同。计算要添加的插入序列和载体的用量，请使用 [NEBioCalculator.neb.com](http://NEBioCalculator.neb.com) 网站的 **NEBioCalculator** 计算器。连接反应通常很快，一般无需进行长时间温育，除非克隆实验需要捕获每种可能的连接产物以生成高度复杂的文库。

### 工具 & 资源

登陆 [NEBStickTogether.com](http://NEBStickTogether.com) 以查找：

- DNA 连接酶完整列表
- 常见问题解答
- 连接反应视频，包括指导如何建立反应体系

## 使用 NEB 的 T4 DNA 连接酶体验极高的酶纯度



上样等量的酶，并使用 SilverXpress 进行银染。Marker M 是 NEB 的 Broad Range Protein Marker (NEB #P7702)。

### KEY

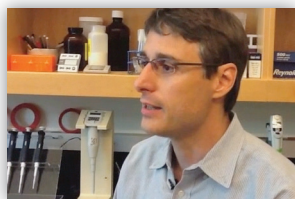
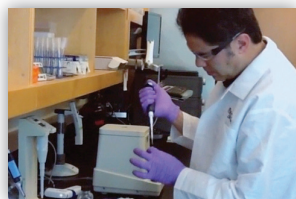
- 最佳选择，该应用的推荐产品
- 效果良好
- 可以完成该实验，但不推荐使用



## 操作步骤：连接

|             | 快连试剂盒<br>(NEB #M2200) | T4 DNA 连接酶<br>(NEB #M0202) | 瞬时粘性末端连接酶预混液<br>(NEB #M0370) | 平末端 / TA 连接酶预混液<br>(NEB #M0367) |
|-------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 产品剂型        | 试剂盒                   | 单酶                         | 预混液                          | 预混液                             |
| 载体 (4 kb)   | 50 ng                 | 50 ng                      | 50 ng                        | 50 ng                           |
| 插入片段 (1 kb) | 37.5 ng               | 37.5 ng                    | 37.5 ng                      | 37.5 ng                         |
| 缓冲液         | 2X 快连缓冲液              | T4 DNA 连接酶反应缓冲液            | 5 $\mu$ l (预混液)              | 5 $\mu$ l (预混液)                 |
| 连接酶         | 1 $\mu$ l             | 1 $\mu$ l                  | N/A                          | N/A                             |
| 无核酸酶的水      | 加至 20 $\mu$ l         | 加至 20 $\mu$ l              | 加至 10 $\mu$ l                | 加至 10 $\mu$ l                   |
| 温育          | 25°C, 5 分钟            | 25°C, 2 小时; 16°C, 过夜*      | N/A, 瞬时连接                    | 25°C, 15 分钟                     |

\* 粘性末端连接，温育时间可缩短至 25°C, 10 分钟。



连接机制和优化建议的更多信息，请登陆  
[NEBStickTogether.com](http://NEBStickTogether.com) 观看视频

### 优化建议

#### 反应缓冲液

- T4 DNA 连接酶缓冲液 (NEB #B0202) 应置于实验台上或手掌中解冻，而不是在 37°C 下解冻 (以防止 ATP 分解)。
- 解冻后，将 T4 DNA 连接酶缓冲液置于冰上。
- 连接可在四种标准限制性内切酶缓冲液，或 T4 PNK 缓冲液 (NEB #B0201) 中进行，需补充 1 mM ATP。
- 当添加 ATP 时，请使用核糖-ATP (NEB #P0756)，脱氧核糖-ATP 会抑制连接。
- 连接前，热失活内切酶，或通过柱纯化 (例如，Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒，NEB #T1030) 或苯酚/乙醇沉淀来去除内切酶。

#### DNA

- 连接前热失活或去除磷酸酶 (AP、rSAP、快速 CIP)。
- 总 DNA 浓度：5–10  $\mu$ g/ml。

- 单片段插入时，载体与插入片段最佳摩尔比区间为 1:1 和 1:10。
- 克隆多片段时，建议使用 NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液 (NEB #E2621) 或克隆试剂盒 (NEB #E5520)。
- 若 DNA 浓度不确定，以不同的比例进行多次连接。

#### 连接酶

- 粘性末端连接，可使用标准的 T4 DNA 连接酶，推荐使用瞬时粘性末端连接酶预混液或快连试剂盒。
- 平末端和单碱基突出连接，建议使用平末端 / TA 连接酶预混液。
- 与电穿孔兼容的连接，建议使用电转连接酶。
- 标准 T4 DNA 连接酶可通过在 65°C 条件下孵育 20 分钟热失活。
- 不要热失活快连试剂盒或连接酶预混液。

#### 转化

- 将 1–5  $\mu$ l 的连接混合液添加到感受态细胞中进行转化。
- 反应缓冲液中含 PEG 时，连接时间不要超过推荐时间，否则会降低转化效率。
- 对于较大的载体 (> 10,000 bp)，建议采用电穿孔。如果之前使用了快连试剂盒或连接酶预混液请透析样品或使用柱纯化。
- 与电穿孔兼容的连接，建议使用电转连接酶。

连接概述

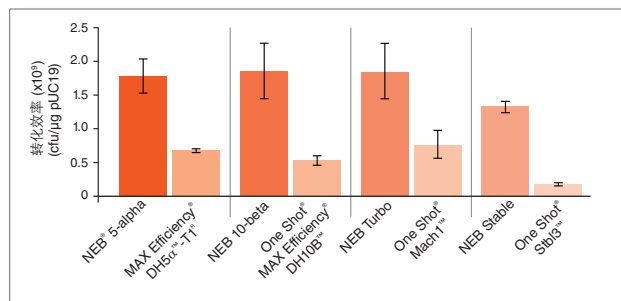




## 转化

转化是生物体获得外源 DNA 的过程。转化有两种方式：自然转化和人工转化。自然转化是指细胞从自然环境中摄取和整合裸 DNA 的过程。人工转化则通过一系列方法促成生物对外源 DNA 的获取。克隆操作中使用人工转化方法将重组 DNA 导入宿主细胞。人工转化细菌的最常见方法是用二价阳离子（如：氯化钙）增加细菌细胞膜的通透性，使其成为化学感受态，从而增加外源 DNA 进入细胞的可能性。另一种人工转化方法是电穿孔，细菌被电流冲击后在细胞膜上产生孔洞，有了新的受损的细胞膜，重组 DNA 就容易进入细菌的胞浆中。不管使用哪种转化方法，转化后的细菌都要进行培养，以修复受损的细胞表面，并对转化了含抗生素抗性的外源 DNA 的重组细菌进行筛选。

## 得益于高转化效率



转化效率比较，根据各生产商的推荐操作步骤建立反应，结果取自 3 组平行实验。

## 感受态细胞产品选择表

|                          | NEB 5-alpha<br><i>E. coli</i><br>感受态细胞<br>(NEB #C2987) | NEB Turbo<br><i>E. coli</i><br>感受态细胞<br>(NEB #C2984) | NEB 5-alpha<br><i>F' lac E. coli</i><br>感受态细胞<br>(NEB #C2992) | NEB 10-beta<br><i>E. coli</i><br>感受态细胞<br>(NEB #C3019) | <i>dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup></i><br><i>E. coli</i><br>感受态细胞<br>(NEB #C2925) | NEB Stable<br><i>E. coli</i><br>感受态细胞<br>(NEB #C3040) |
|--------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 特性                       |                                                        |                                                      |                                                               |                                                        |                                                                                   |                                                       |
| 多用途                      | ●                                                      |                                                      |                                                               |                                                        |                                                                                   | ●                                                     |
| 快速生长 (< 8 hours)         |                                                        | ●                                                    |                                                               |                                                        |                                                                                   |                                                       |
| 毒性基因克隆                   |                                                        |                                                      | ●                                                             |                                                        |                                                                                   | ●                                                     |
| 大质粒 / BAC 克隆             |                                                        |                                                      |                                                               | ●                                                      |                                                                                   |                                                       |
| Dam / Dcm 缺失质粒生长         |                                                        |                                                      |                                                               |                                                        | ●                                                                                 |                                                       |
| 逆转录病毒/慢病毒的载体克隆           |                                                        |                                                      |                                                               |                                                        |                                                                                   | ●                                                     |
| <i>recA</i> <sup>-</sup> | ●                                                      |                                                      | ●                                                             | ●                                                      |                                                                                   | ●                                                     |
| 类型                       |                                                        |                                                      |                                                               |                                                        |                                                                                   |                                                       |
| 化学感受态                    | ●                                                      | ●                                                    | ●                                                             | ●                                                      | ●                                                                                 | ●                                                     |
| 电感受态                     |                                                        |                                                      |                                                               | ●                                                      |                                                                                   |                                                       |
| 亚克隆                      | ●                                                      |                                                      |                                                               |                                                        |                                                                                   |                                                       |
| 96 孔                     | ●                                                      |                                                      |                                                               | ●                                                      |                                                                                   |                                                       |
| 384 孔                    | ●                                                      |                                                      |                                                               |                                                        |                                                                                   |                                                       |
| 12 x 8 联排管               | ●                                                      |                                                      |                                                               |                                                        |                                                                                   |                                                       |

## 优化建议

### 解冻

- 细胞最好置于冰上解冻
- 管中的冰融化后，立即加入 DNA
- 可以手握解冻细胞，但是一旦温度高于 0°C 时，转化效率就会下降

### DNA

- 至多可从连接混合物中取出 10 µl DNA 用于转化，此时效率降低一半。

### 冰浴和热激

- 冰浴 30 分钟。预计每缩短 10 分钟，会降低转化效率一半。
- 温度和时间取决于转化体积和使用的容器，一般推荐 42°C 热激 30 秒，但 BL21 感受态 (NEB #C2530) 热激时间为 10 秒。

### 生长

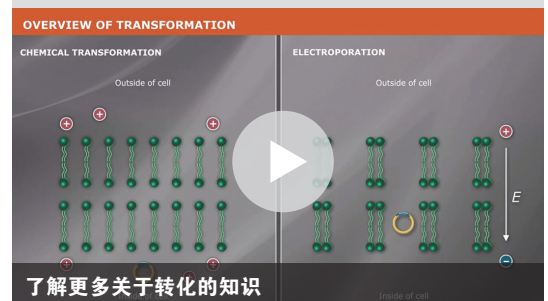
- 37°C 条件下培养 1 小时，可以使细胞复苏和抗生素抗药性表达达到最佳，预计每缩短 15 分钟，转化效率会降低一半。
- 使用 SOC 培养基相比使用 LB 培养基提高转化效率 1 倍。
- 孵育时晃动或旋转试管可提高转化效率 1 倍。

### 涂平板

- 筛选平板的温/冷、干/湿不会明显影响转化效率。
- 温暖而干燥的平板利于涂布，并能快速长出菌落。

## 需避免的 DNA 污染物

| 污染物    | 清除方法                                        |
|--------|---------------------------------------------|
| 去污剂    | 乙醇沉淀                                        |
| 苯酚     | 氯仿抽提和乙醇沉淀                                   |
| 乙醇或异丙醇 | 重悬前干燥 DNA                                   |
| PEG    | 柱纯化（例如，Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒）或酚/氯仿抽提和乙醇沉淀 |

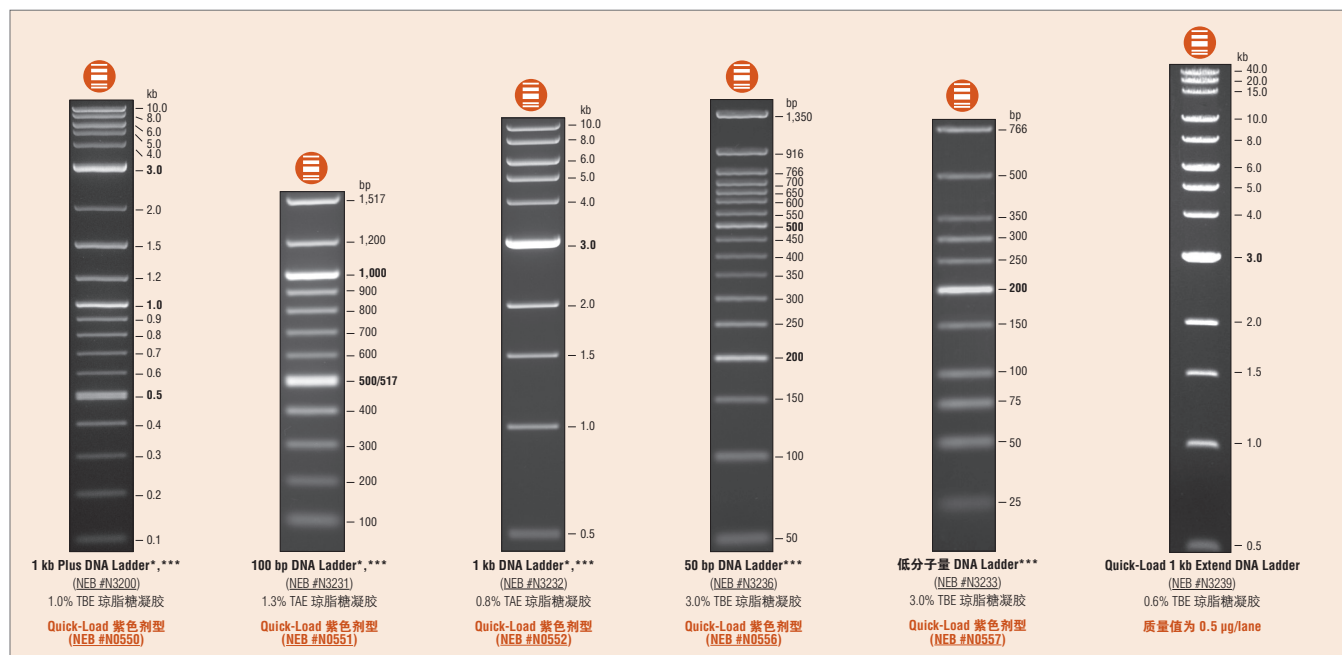




## DNA Marker 和 Ladder

琼脂糖凝胶电泳是分离、鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。用可视化染料浸润或者预制凝胶可使 DNA 在凝胶上可见，如 溴化乙锭 EB，它是一种 DNA 插入剂，经紫外照射会发出荧光。DNA Marker 和 Ladder 是由已知分子量和质量的 DNA 片段组成，常用作确定目的 DNA 分子大小和相对质量的参考。取决于所使用的可视化染料的不同，DNA 条带在紫外或者蓝光照射下可见。DNA Marker 和 DNA 样品需与上样染料联合使用，以将样品沉降在胶孔里并追踪其凝胶迁移；方便起见，有些 NEB 的 ladder 中预混了上样染料。

## Quick-Load 和 Quick-Load 紫色剂型 DNA Ladder



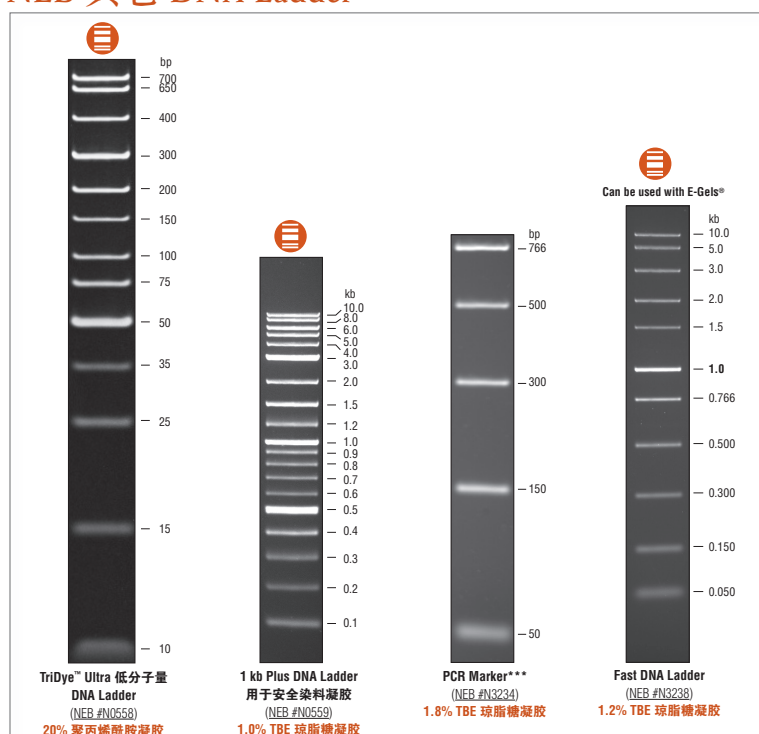
\*有 Quick-Load® 和 TriDye™ 剂型



即用型

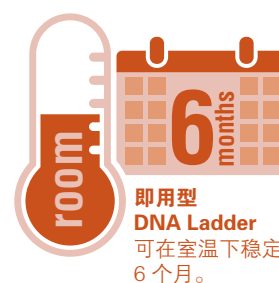
\*\*\* 包含免费上样染料

## NEB 其它 DNA Ladder



- 条带清晰均一
- 质量好且性价比高
- 方便的 1 kb Plus DNA Ladder 存在多种剂型，甚至包含一种专门针对安全染料（例如 GelRed® 和 SYBR® Safe）优化后的剂型
- TriDye 超低分子量 DNA Ladder 分子量范围低至 10 bp，适用于聚丙烯酰胺凝胶电泳
- 关于选择 Ladder 的更多信息，请访问

[www.neb.com/DNAmarkersandladders](http://www.neb.com/DNAmarkersandladders)





# 开始分子克隆实验

## 提高克隆效率的简单技巧

无论选择哪种克隆方法，以下要点都可以提高实验效率和克隆成功率。访问 [NEBcloner.neb.com](http://NEBcloner.neb.com)，为每个克隆步骤找到合适的产品和操作步骤。

### 1. 精心设计实验

注意连接处的序列，以及对翻译序列的阅读框的影响。在设计包含相似酶切位点序列的引物之前，先检查载体和插入片段内部的酶切位点（我们建议使用 [NEBcutter.neb.com](http://NEBcutter.neb.com) 的酶切位点分析软件 NEBcutter）。确认载体的抗生素选择标记与所选宿主菌是否相容。

### 2. 使用高纯度的、正确浓度的 DNA

确保你的 DNA 无污染，不含有核酸酶和多余的酶活性。使用商品化的离心柱来纯化起始 DNA（例如，使用 Monarch 质粒小提试剂盒，NEB #T1010，提质粒；使用 Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒，NEB #T1030，纯化 DNA 片段）。在操作 DNA 之前，应完全去除所有的溶剂，例如苯酚、氯仿和乙醇。使用无盐离子的缓冲液将 DNA 从离心柱上洗脱下来，以避免对下游实验（酶切或是 PCR 扩增实验）造成影响。

### 3. 谨慎进行酶切实验

反应体积应便于进行下游操作（例如应比凝胶上样孔体积小一些）。一般的克隆反应，通常在 20-50  $\mu$ l 之间。加入的内切酶体积应不超过总反应体系的 10%，以确保甘油浓度低于 5%，这是降低星号活性（非特异性切割）的重要方法。

### 4. 注意末端序列

克隆实验中，假设待连接的 DNA 末端是互补的，经过酶切的末端无需进一步修饰即可用于连接实验。如果末端不互补，则需要用末端平齐化试剂，磷酸酶等进行修饰。

通过 PCR 制备用于克隆的 DNA，如果使用了 Taq DNA 聚合酶（NEB #M0273）进行扩增，会产生 3' 端带单个腺嘌呤（A）残基的产物。高保真 DNA 聚合酶，例如 Q5（NEB #M0491），产生平末端。除非引物的 5' 端进行了磷酸化，使用标准的商品化引物进行 PCR，产生非磷酸化的片段。PCR 产物在与去磷酸化的载体连接之前，需要激酶处理，在 5' 端加上一个磷酸基团。

### 5. 连接载体和插入片段之前，纯化 DNA

这一步可以使用凝胶电泳或柱纯化（例如，Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒，NEB #T1030）的方法。将目的 DNA 从多余的原始载体和/或其它 DNA 片段中分离出来，能够大大改善克隆结果。

连接前进行琼脂糖凝胶电泳确认酶切的 DNA 片段。对于单一产物，取少量的酶切产物电泳，剩余的进行柱纯化回收（例如，Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒，NEB #T1030）。当产生了多种片段，只有其中一种片段用于实验时，将片段进行电泳，在紫外灯下切出目的片段。使用长波长（365 nm）的紫外灯可减少辐射对 DNA 片段带来的损伤。使用胶回收试剂盒（Monarch DNA 胶回收试剂盒，NEB #T1020）或  $\beta$ -琼脂糖酶 I（NEB #M0392）从切下的琼脂糖胶块中回收 DNA 片段。

### 6. 定量回收产物

简单的定量方法，如使用质量标准品为参照的凝胶电泳，或者微量分光光度计的光谱学定量（例如 NanoSpec<sup>®</sup>），确保用于下游连接反应的样本量在合适的范围。

### 7. 按照生产商的指南进行连接反应

使用传统方法克隆时，请遵从连接酶生产商的推荐指南。如果推荐插入片段和载体的摩尔比为 3:1，则先按此建议进行实验。质量比与摩尔比是不同的概念（除非插入片段和载体大小质量相等）。连接反应通常很快，除非克隆实验需要得到高复杂度的文库，并要求获得所有可能产生的连接产物，否则没有必要进行长时间温育。

按照生产商的指南进行 PCR 克隆和无缝克隆中的连接反应。如果您是第一次进行克隆实验，为了获得理想的结果请严格遵循推荐的实验体系。

### 8. 选择满足需求的感受态细胞

某些实验室自己制备感受态细胞，其转化效率很少能够达到商品化感受态细胞的高水平。商品化感受态细胞节约时间和资源，让克隆有更好的可重复性。



# 传统克隆实验简捷指南

## 准备插入片段和质粒

### 来源于质粒的插入片段

- 选择适当的限制性内切酶切割质粒，获得能直接克隆于载体的 DNA 片段。选择产生非互补末端的两种限制性内切酶来进行定向克隆。

### 来源于 PCR 的插入片段

- 引物设计时引入能定向克隆到载体的限制性酶切位点
- 在识别位点上游添加 6 个保护碱基可满足大多数限制性内切酶的需要
- 如需高保真扩增可以选择具有校读功能的聚合酶，如：Q5<sup>®</sup> 超保真 DNA 聚合酶（NEB #M0491）
- 其它 PCR 优化指南请登陆 [www.NEBPCRPolymersases.com](http://www.NEBPCRPolymersases.com) 和 [www.neb-china.com](http://www.neb-china.com)
- PCR 产物可通过切胶回收或离心柱纯化（例如 Monarch DNA 胶回收试剂盒，NEB #T1020，Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒，NEB #T1030）
- 选择适当的限制性内切酶进行酶切

### 限制性内切酶标准反应体系

|              |                    |
|--------------|--------------------|
| DNA          | 1 µg               |
| 10X NEBuffer | 5 µl (1X)          |
| 限制性内切酶       | 10 单位足够反应，常使用 1 µl |
| 无核酸酶污染的水     | 加至 50 µl           |
| 温育时间         | 1 小时*              |
| 温育温度         | 因酶而异               |

\* 使用具有省时酶特性的内切酶可减少温育时间

### 省时酶反应体系

|              |           |
|--------------|-----------|
| DNA          | 1 µg      |
| 10X NEBuffer | 5 µl (1X) |
| 限制性内切酶       | 1 µl      |
| 无核酸酶污染的水     | 加至 50 µl  |
| 温育时间         | 5–15 分钟*  |
| 温育温度         | 因酶而异      |

\* 具有省时酶特性的内切酶也可过夜反应而没有星号活性

### 来源于退火寡核苷酸的插入片段

- 用退火的寡核苷酸引入 DNA 片段（如启动子和多聚接头等）
- 两条互补的寡核苷酸退火后形成 5' 或 3' 突出末端，能被连接到用适合的限制性内切酶切割的载体中
- 未磷酸化的寡核苷酸用 T4 PNK（NEB #M0201）磷酸化

### 常规退火反应

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| 寡核苷酸 1            | 终浓度 20 µM          |
| 寡核苷酸 2            | 终浓度 20 µM          |
| 10X NEBuffer r2.1 | 5 µl               |
| 无核酸酶水             | 加至 50 µl           |
| 温育                | 95°C 5 分钟，缓慢冷却至室温。 |

## 载体

- 选择适当的限制性内切酶消化载体，最好使用能产生不匹配末端的内切酶组合，以防载体自连

## 去磷酸化

- 去磷酸化反应是用来防止自身连接。NEB 提供 3 种 DNA 去磷酸化的产品：
- 快速 CIP（NEB #M0525），虾碱磷酸酶（rSAP）（NEB #M0371）和热敏磷酸酶（AP）（NEB #M0289）是可热失活的磷酸酶。三者可在所有的 NEBuer 中反应，但 AP 需要在反应中额外添加 Zn<sup>2+</sup>。

### 使用快速 CIP 进行 DNA 5' 端的去磷酸化

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| DNA               | 1 pmol 的 DNA 末端 |
| 10X rCutSmart 缓冲液 | 2 µl            |
| 快速 CIP            | 1 µl            |
| 无核酸酶污染的水          | 加至 20 µl        |
| 温育                | 37°C 10 分钟      |
| 热失活               | 80°C 2 分钟       |

注：可按比例扩大反应体系。

## 平齐化

- 有时插入的片段和载体需要进行末端平齐化
- 用具有校读活性的聚合酶进行 PCR，其绝大多数产物是平末端
- T4 DNA 聚合酶（NEB #M0203）或 Klenow（NEB #M0210）能补平 5' 突出末端，切割 3' 突出末端
- 快速末端平齐化试剂盒（NEB #E1201）能在 30 分钟内完成 DNA 末端的平齐化和磷酸化

### 使用快速末端平齐化试剂盒进行末端平齐化

|                |                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------|
| DNA            | ≤ 5 µg                                                |
| 平齐化缓冲液（10X）    | 2.5 µl                                                |
| dNTP 混合液（1 mM） | 2.5 µl                                                |
| 平齐化酶混合液        | 1 µl                                                  |
| 无核酸酶污染的水       | 加至 25 µl                                              |
| 温育             | 室温；内切酶消化的/打断的 DNA 温育 15 分钟；零化的 DNA 或 PCR 产物* 温育 30 分钟 |
| 热失活            | 70°C 10 分钟                                            |

\* PCR 产物 DNA 在平齐化之前，必须使用商品化的纯化试剂盒（NEB #T1030）、苯酚萃取/乙醇沉淀或胶回收（NEB #T1020）进行纯化。



# 传统克隆实验简捷指南（续）

## 磷酸化

- 连接两个 DNA 片段时，至少其中一个片段（插入片段或载体）的 5' 末端必须含有磷酸基团
- 引物通常以非磷酸化形式提供，因此 PCR 产物的 5' 末端为非磷酸化
- 限制性内切酶消化的 DNA 其 5' 末端都有磷酸基
- DNA 片段可以通过与 T4 PNK（NEB #M0201）温育进行磷酸化

### T4 PNK 磷酸化

|                |                     |
|----------------|---------------------|
| DNA（20 个碱基）    | 高达 300 pmol 的 5' 末端 |
| 10X T4 PNK 缓冲液 | 5 $\mu$ l           |
| 10 mM ATP      | 5 $\mu$ l（终浓度 1 mM） |
| T4 PNK         | 1 $\mu$ l（10 单位）    |
| 无核酸酶污染的水       | 至 50 $\mu$ l        |
| 温育             | 37°C 30 分钟          |

## 纯化载体和插入片段

- 用凝胶电泳切胶回收或离心柱回收方法纯化载体和插入片段，例如 Monarch DNA 胶回收试剂盒或 PCR & DNA 纯化试剂盒（NEB #T1020 或 #T1030）
- $\beta$ -琼脂糖酶 I（NEB #M0392）可以用于纯化低熔点琼脂糖中的 DNA，DNA 的纯化还可用离心柱及树脂法
- 分析琼脂糖凝胶电泳结果时，使用长波 UV（365 nm），以减少 UV 照射可能造成的 DNA 损伤

## 连接载体和插入片段

- 载体和插入片段的摩尔比为 1:3。使用 NEBioCalculator 计算摩尔比。
- 如果使用 T4 DNA 连接酶（NEB #M0202）或快速连接试剂盒（NEB #M2200），在室温下解冻并重悬连接缓冲液。如果使用连接酶预混液，则无需解冻。
- 快速连接试剂盒（NEB #M2200）对粘性末端和平末端的连接均进行了优化
- 瞬时粘性末端连接酶预混液（NEB #M0370）对瞬时的粘性末端连接进行了优化
- 平末端 / TA 连接酶预混液（NEB #M0367）对平末端或单碱基突出末端的连接进行了优化，效果优于使用 T4 DNA 连接酶
- 连接后置于冰上并进行转化反应
- 用快速连接缓冲液或连接酶预混液时勿热失活，以免抑制转化反应
- 如果要做电转，请使用电转连接酶（NEB #M0369），其可以用于粘性末端和平末端的连接（无需纯化步骤）
- 选择高保真的突出末端可以提高 Golden Gate 组装的效率 [Potapov, V. et al. (2018) *ACS Synth. Biol.* 7(11), 2665–2674.]

### 快速连接试剂盒的连接

|                |                     |
|----------------|---------------------|
| 载体 DNA（3 kb）   | 50 ng               |
| 插入片段 DNA（1 kb） | to 50 ng            |
| 2X 快速连接缓冲液     | 10 $\mu$ l          |
| 快速 T4 DNA 连接酶  | 1 $\mu$ l           |
| 无核酸酶污染的水       | 加至 20 $\mu$ l（混合均匀） |
| 温育             | 室温 5 分钟             |

### 瞬时粘性末端连接酶预混液的连接

|                |              |
|----------------|--------------|
| 载体 DNA（3 kb）   | 50 ng        |
| 插入片段 DNA（1 kb） | 50 ng        |
| 预混液            | 5 $\mu$ l    |
| 无核酸酶污染的水       | 至 10 $\mu$ l |
| 温育             | 无需温育         |

### 平末端 / TA 连接酶预混液的连接

|                |              |
|----------------|--------------|
| 载体 DNA（3 kb）   | 50 ng        |
| 插入片段 DNA（1 kb） | 50 ng        |
| 预混液            | 5 $\mu$ l    |
| 无核酸酶污染的水       | 至 10 $\mu$ l |
| 温育             | 室温 15 分钟     |

## 转化

- 如果要 8 小时内获得转化子，使用 NEB Turbo *E. coli* 感受态细胞（NEB #C2984）
- 如担心重组反应的问题，请使用 *RecA*<sup>-</sup> 菌株 NEB 5-alpha *E. coli* 感受态细胞（NEB #C2987）或 NEB-10 beta *E. coli* 感受态细胞（NEB #C3019）或 NEB Stable *E. coli* 感受态细胞（NEB #C3040）
- NEB-10 beta *E. coli* 感受态细胞尤其适合构建大于 5 kb 的质粒
- NEB Stable *E. coli* 感受态细胞（NEB #C3040）适合构建的含重复序列的质粒，如慢病毒质粒
- 如果需要进行电转，使用 NEB-10 beta *E. coli* 电转级感受态细胞（NEB #C3020）
- 使用预热的筛选平板
- 涂板时在培养基中进行几次 10 倍的梯度稀释

### NEB 5-alpha *E. coli* 感受态细胞的转化

|                      |                                                   |
|----------------------|---------------------------------------------------|
| DNA                  | 1–5 $\mu$ l 含 1 pg–100 ng 质粒的 DNA                 |
| <i>E. coli</i> 感受态细胞 | 50 $\mu$ l                                        |
| 孵育                   | 冰上 30 分钟                                          |
| 热激                   | 精确控制 42°C 30 秒                                    |
| 孵育                   | 冰上 5 分钟，加入室温的 SOC 培养基 950 $\mu$ l，37°C 振荡培养 60 分钟 |



# 克隆问题解决指南

我们强烈建议在转化时进行下列对照实验。这些对照实验能够帮助找到克隆实验中哪一步出现了问题。

- 1 转化 100 pg-1 ng 未酶切的质粒来检查感受态细胞的存活性，计算转化效率，确认质粒的抗生素抗性。
- 2 转化酶切后的质粒，确定未切开的质粒造成的背景情况。本对照中的菌落数应小于未酶切的质粒转化对照组（第 1 组对照）中的菌落数的 1%。
- 3 转化酶切后仅进行了连接反应的质粒，该质粒的末端应不能重连，因为末端序列不匹配（例如，使用两种内切酶进行消化，产生不互补末端），或者去磷酸化反应去除了 5' 端的磷酸基团（例如，使用 rSAP 处理平末端）。本组转化对照应产生和第 2 组对照中相同的菌落数。
- 4 使用单酶切消化载体 DNA，重连并转化。该载体 DNA 的末端应互补，连接反应时可轻易地连上，转化后菌落数应与第 1 组对照相近。

克隆过程中，精确定量 DNA 十分重要，建议尽量随时定量 DNA。

| 问题             | 原因                                                      | 解决方案                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 没有转化子<br>或转化子少 | 细胞死亡                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>转化未酶切的质粒（例如 pUC19），计算感受态的转化效率。若转化效率较低（<math>&lt; 10^4</math>），重新制备感受态细胞，或使用商品化的高效级感受态细胞</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                | 不正确的抗生素或抗生素浓度                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>确认抗生素和抗生素的浓度</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                | 目的 DNA 片段对细胞有毒性                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>把平板放在较低的温度（25–30°C）下培养</li> <li>可能需要使用对目的 DNA 片段转录调控更严格的菌株（例如 NEB-5-alpha F' <i>luc</i> <i>E. coli</i> 感受态细胞（NEB #C2992））进行转化</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                | 使用化学感受态时进行了错误的热激步骤                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>谨遵生产商建议的转化步骤（注意：在热激时，实际温度超过推荐温度会造成感受态细胞的死亡）</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                | 使用电转级感受态时，连接体系中存在 PEG                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>在转化前用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）纯化 DNA</li> <li>使用 NEB 的电转连接酶（NEB #M0369）</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                | 使用电转级感受态，观察到了电弧作用，或是没有通电                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>在连接步骤前纯化 DNA</li> <li>轻敲电击杯除去其中的气泡</li> <li>确认按照厂家规定的电转参数进行</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                | 构建的质粒过大                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>选择能够高效转化较大质粒的感受态细胞菌株（<math>\geq 10</math> kb，我们推荐使用 NEB 10-beta <i>E. coli</i> 感受态细胞（NEB #C3019）</li> <li>对于构建非常大的质粒（<math>&gt; 10</math> kb），考虑使用电转</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                | 构建的载体易发生重组反应                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>选择 <i>RecA</i> 菌株，例如 NEB 5-alpha（NEB #C2987）或 NEB 10-beta <i>E. coli</i>（NEB #C3019）或 NEB Stable 感受态细胞（NEB #C3040）</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                | 插入的片段直接来源于哺乳动物或植物 DNA，含有甲基化的胞嘧啶，易被很多种 <i>E. coli</i> 降解 | <ul style="list-style-type: none"> <li>选择缺失 <i>McrA</i>、<i>McrBC</i> 和 <i>Mrr</i> 的菌株，例如 NEB 10-beta <i>E. coli</i> 感受态细胞</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                | 连接混合物过多                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>转化时使用 <math>&lt; 5 \mu\text{l}</math> 连接反应体系</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                | 连接效率低                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>确保至少有一个待连接的片段含有 5' 磷酸基团</li> <li>调整载体与插入片段的摩尔比，范围从 1:1 至 1:10。使用 NEBioCalculator 计算摩尔比。</li> <li>用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（5 <math>\mu\text{g}</math>）（NEB #T1030）纯化 DNA，去除污染物（例如盐和 EDTA）</li> <li>反复冻融会造成 ATP 的降解；使用新的缓冲液重新连接</li> <li>在连接前将磷酸酶失活或去除</li> <li>对单碱基突出末端的连接（最为困难），可使用平末端 / TA 连接酶预混液（NEB #M0367）、快速连接试剂盒（NEB #M2200）或高浓度的 T4 DNA 连接酶（NEB #M0202）</li> <li>使用 HindIII 消化的 Lambda DNA（NEB #N3012）作为连接对照组，检测连接酶的活性</li> </ul>                                                                                                                                              |
|                | 磷酸化效率低                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>在磷酸化前用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（5 <math>\mu\text{g}</math>）（NEB #T1030）纯化 DNA。过量的盐离子，磷酸盐或铵离子可能抑制激酶的活性</li> <li>如果是平末端或 5' 凹陷末端，70°C 加热底物/缓冲液的混合物 10 分钟，置于冰上快速降温，再加入 ATP 和酶，37°C 温育</li> <li>未加入 ATP。在反应中添加 1 mM 的 ATP，因为 T4 多聚核苷酸激酶（NEB #M0201）需要 ATP</li> <li>也可以使用 1X T4 DNA 连接缓冲液（含 1 mM ATP）来代替 1X T4 PNK 缓冲液</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                | 平齐化效率低                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>在平齐化前，热失活或去除限制性内切酶</li> <li>用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（5 <math>\mu\text{g}</math>）（NEB #T1030）在平齐化前纯化 PCR 片段</li> <li>超声打断的 gDNA 应至少进行 30 分钟的平齐化反应</li> <li>不应使用超过 1 单位的酶 / <math>\mu\text{g}</math> DNA</li> <li>温育时间不应超过 15 分钟</li> <li>温育温度不超过 12°C（T4 DNA 聚合酶，NEB #M0203），或不超过 24°C（Klenow，NEB #M0210）</li> <li>确保反应中加入足量的 dNTP（DNA 聚合酶 I 大片段（Klenow），NEB #M0210 每种 dNTP 加入 33 <math>\mu\text{M}</math>；T4 DNA 聚合酶，NEB #M0203，每种 dNTP 加入 100 <math>\mu\text{M}</math>）</li> <li>当使用绿豆核酸酶（NEB #M0250）时，室温孵育。不要使用超过 1 单位的酶 / <math>\mu\text{g}</math> DNA，反应孵育时间不要超过 30 分钟</li> </ul> |



## 克隆问题解决指南（续）

| 问题                   | 原因                 | 解决方案                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 没有转化子或转化子少（续）        | 加 A 尾效率低           | <ul style="list-style-type: none"> <li>加 A 尾前纯化 PCR 产物，NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）。高保真酶会去除任何非配对核苷酸</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                      | 内切酶没有完全切割          | <ul style="list-style-type: none"> <li>查看该酶的甲基化敏感性，确定是否由于识别位点的甲基化阻断了酶切反应</li> <li>使用随酶提供的缓冲液</li> <li>纯化 DNA 以去除可能抑制酶活的污染物，NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）。</li> <li>当酶切 PCR 片段时，确保在识别位点和 DNA 分子的末端之间至少存在 6 个核苷酸</li> </ul>                                                                                                                                                                      |
| 菌落内无质粒               | 使用的抗生素水平过低         | <ul style="list-style-type: none"> <li>增加平板的抗生素含量至推荐的量</li> <li>使用新配制的抗生素的平板</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                      | 选取了卫星菌落            | <ul style="list-style-type: none"> <li>选择大的生长良好的菌落用于分析</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 菌落内构建的质粒不正确          | 发生质粒的重组反应          | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用 <i>RecA</i><sup>-</sup> 菌株例如 NEB 5-alpha 或 NEB 10-beta 或 NEB Stable <i>E. coli</i> 感受态细胞</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                      | 克隆中使用了错误的 PCR 扩增产物 | <ul style="list-style-type: none"> <li>优化 PCR 条件</li> <li>切胶纯化正确的 PCR 片段，NEB 推荐 Monarch DNA 胶回收试剂盒（NEB #T1020）</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                      | 内部存在内切酶识别位点        | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用酶切位点分析软件 NEBcutter 分析插入序列内部是否存在识别位点</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                      | 目的 DNA 片段对细胞有毒性    | <ul style="list-style-type: none"> <li>平板在较低的温度（25–30℃）培养</li> <li>可能需要使用对目的 DNA 片段转录调控更严格的菌株（例如 NEB 5-alpha F' /<sup>ts</sup> <i>E. coli</i> 感受态细胞进行转化）</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                               |
|                      | 序列中存在突变            | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用高保真聚合酶（例如 Q5 超保真 DNA 聚合酶，NEB #M0491）</li> <li>重新测序</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 背景过多                 | 去磷酸化效率低            | <ul style="list-style-type: none"> <li>在去磷酸化前将内切酶热失活或去除</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                      | 存在激酶（活性）           | <ul style="list-style-type: none"> <li>磷酸化步骤后将激酶热失活。有活性的激酶会再次磷酸化去磷酸化的载体</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                      | 内切酶没有完全切割          | <ul style="list-style-type: none"> <li>查看该酶的甲基化敏感性，确定是否由于识别位点的甲基化阻断了酶切反应</li> <li>使用随酶提供的缓冲液</li> <li>纯化 DNA 以去除污染物（例如高浓度盐类），NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）。</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                         |
|                      | 抗生素水平过低            | <ul style="list-style-type: none"> <li>确认正确的抗生素浓度</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 连接后凝胶电泳未发现连接产物       | 连接效率低              | <ul style="list-style-type: none"> <li>确保至少有一个待连接的片段含有 5' 磷酸基团</li> <li>调整载体与插入片段的摩尔比，范围从 1:1 至 1:10。使用 NEBioCalculator 计算摩尔比。</li> <li>纯化 DNA，去除污染物（例如盐和 EDTA），NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）</li> <li>反复冻融会造成 ATP 的降解；使用新的缓冲液重新连接</li> <li>在连接前将磷酸酶热失活或去除</li> <li>单碱基突出末端的连接（最为困难），可使用平末端 / TA 连接酶预混液、快速连接试剂盒或高浓度的 T4 DNA 连接酶</li> <li>使用 HindIII 消化的 Lambda DNA 作为连接对照组，检测连接酶的活性</li> </ul> |
| 连接后的 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈弥散状 | 连接酶与底物 DNA 结合      | <ul style="list-style-type: none"> <li>在跑胶前使用蛋白酶 K（NEB #P8107）处理连接反应体系</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 酶切后的 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈弥散状 | 内切酶与底物结合           | <ul style="list-style-type: none"> <li>降低使用的酶量</li> <li>向上样缓冲液中加入 SDS（0.1–0.5%）以分离与 DNA 结合的酶</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                      | 核酸酶污染              | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用新配制的无污染的电泳液</li> <li>使用新配制的琼脂糖凝胶</li> <li>纯化 DNA，NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 酶切不完全                | 甲基化阻断酶切            | <ul style="list-style-type: none"> <li>从细菌源分离的 DNA 可能被 Dam 和 Dcm 甲基化阻断</li> <li>从真核生物分离的 DNA 可能被 CpG 甲基化阻断</li> <li>查看该酶的甲基化敏感性，确定是否由于识别位点的甲基化阻断了酶切反应</li> <li>如果酶被 Dam 和 Dcm 甲基化抑制活性，将质粒在 <i>dam</i><sup>-</sup> / <i>dcm</i><sup>-</sup> 菌株中培养（NEB #C2925）</li> </ul>                                                                                                                                           |
|                      | 盐的抑制               | <ul style="list-style-type: none"> <li>在含有盐的缓冲液（NEBuffer r3.1）中活性低的酶，可能是对盐敏感，故在酶切前先纯化 DNA，NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）</li> <li>使用离心柱的 DNA 纯化步骤可能会造成高盐离子水平，从而抑制酶活性。Monarch 试剂盒（NEB #T1010, #T1020, #T1030）使用特别设计的离心柱以减少残留在洗脱 DNA 中的盐离子，使用这些产品可减少高盐离子残留的问题。要避免该情况发生，DNA 溶液体积不应超过总反应体系的 25%</li> </ul>                                                                                          |
|                      | PCR 组分的抑制          | <ul style="list-style-type: none"> <li>在进行酶切前先纯化 PCR 片段，NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                      | 使用错误的缓冲液           | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用随酶提供的推荐缓冲液</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                      | 使用的酶量过少            | <ul style="list-style-type: none"> <li>每 μg 的 DNA 至少使用 5-10 单位的酶</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                      | 温育时间过短             | <ul style="list-style-type: none"> <li>增加温育时间</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                      | 消化超螺旋 DNA          | <ul style="list-style-type: none"> <li>某些酶对于超螺旋 DNA 活性较低。在反应中增加酶量</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                      | 位点切割缓慢             | <ul style="list-style-type: none"> <li>某些酶对一些特异性的位点表现出较慢的切割速度。增加温育时间，一般 1–2 小时即可</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                      | 需要两个识别位点           | <ul style="list-style-type: none"> <li>某些酶的有效切割需要两个识别位点的存在。更多信息可登陆 <a href="http://neb.cn">neb.cn</a> 查询“Restriction Enzymes Requiring Multi-sites”表</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                      | DNA 被抑制剂污染         | <ul style="list-style-type: none"> <li>同时加入酶切底物和对照 DNA。如果抑制剂存在，对照 DNA 也无法切割。小量制备的 DNA 尤其容易被污染。NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）</li> <li>用离心柱 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒（NEB #T1030）、树脂或透析纯化 DNA，或者增大反应体系以稀释污染物</li> </ul>                                                                                                                                                                        |



| 问题               | 原因                             | 解决方案                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 胶中出现多余的条带        | 如果胶中发现比预期更大的条带，这可能是由于酶与底物结合    | <ul style="list-style-type: none"> <li>降低反应中的酶量</li> <li>向上样缓冲液中加入 SDS (0.1–0.5%) 以分离与底物结合的酶</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                  | 星号活性                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用随酶提供的推荐缓冲液</li> <li>降低反应中酶量</li> <li>确保酶量不超过反应总体积的 10%。这样确保甘油总浓度不超过 5% v/v</li> <li>减少温育时间。使用完全酶切所需的最短反应时间，以避免星号活性</li> <li>使用高保真 (HF) 限制性内切酶。高保真内切酶经过基因工程改造降低了星号活性</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                  | 内切酶部分消化                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>在含有盐的缓冲液 (例如 NEBuffer r3.1) 中活性低的酶，可能是对盐敏感，故在酶切前先纯化 DNA。NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒 (NEB #T1030)</li> <li>使用离心柱的 DNA 纯化步骤可能会造成高盐离子水平，从而抑制酶活性。Monarch 试剂盒 (NEB #T1010, #T1020, #T1030) 使用特别设计的离心柱以减少残留在洗脱 DNA 中的盐离子，使用这些产品可减少高盐离子残留的问题。要避免该情况发生，DNA 溶液体积不应超过总反应体积的 25%</li> <li>在进行酶切前先纯化 PCR 片段。NEB 推荐使用 Monarch PCR &amp; DNA 纯化试剂盒 (NEB #T1030)</li> <li>使用随酶提供的推荐缓冲液</li> <li>每 <math>\mu\text{g}</math> 的 DNA 至少使用 5-10 单位的酶</li> <li>消化 DNA 1-2 小时</li> </ul> |
| 未扩增出 PCR 片段      | 使用了错误的引物序列                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>仔细检查引物序列</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                  | 退火温度不正确                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用 NEB 的 Tm calculator 确定正确的退火温度 (<a href="http://www.neb.com/TmCalculator">www.neb.com/TmCalculator</a>)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                  | 延伸温度不正确                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>不同的聚合酶需不同的延伸温度，遵照生产商的推荐温度</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                  | 聚合酶量过少                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>按照反应体系的大小使用推荐单位数的聚合酶</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                  | 引物浓度不正确                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>不同的聚合酶需不同的引物浓度，确保遵照生产商的推荐浓度</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                  | 反应中的 $\text{Mg}^{2+}$ 未达到最理想水平 | <ul style="list-style-type: none"> <li>滴定测量 <math>\text{Mg}^{2+}</math> 水平以优化扩增反应。遵照生产商的建议</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 凝胶中的 PCR 反应产物弥散  | 复杂模板                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>对于复杂模板，尝试不同的聚合酶和/或不同的缓冲液组合</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                  | 如果胶中发现比预期更大的条带，这可能是由于酶与底物相结合   | <ul style="list-style-type: none"> <li>向上样缓冲液中加入 SDS (0.1-0.5%) 以分离与底物结合的酶</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| PCR 反应产物中出现多余的条带 | 退火温度过低                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>使用 NEB 的 Tm calculator 确定引物的退火温度</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                  | 反应中的 $\text{Mg}^{2+}$ 未达到最理想水平 | <ul style="list-style-type: none"> <li>滴定测量 <math>\text{Mg}^{2+}</math> 水平以优化扩增反应。遵照生产商的建议</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                  | 存在其它引物结合位点                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>仔细检查引物序列，确保其在 DNA 模板上没有其它结合位点</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                  | 引物二聚体的形成                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>引物序列可能不够理想。需要在反应中多尝试几组引物</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                  | 聚合酶的选择不正确                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>尝试不同的聚合酶和/或不同的缓冲液组合</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |



## PCR & 突变产品选择表

| 产品                                                             | NEB #        | 规格                           |
|----------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------|
| <b>高保真 DNA 聚合酶</b>                                             |              |                              |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase                                | M0491S/L     | 100/500 units                |
| Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase                      | M0493S/L     | 100/500 units                |
| Q5 High-Fidelity 2X Master Mix                                 | M0492S/L     | 100/500 reactions            |
| Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix                       | M0494S/L/X   | 100/500/500 reactions        |
| Q5 High-Fidelity PCR Kit                                       | E0555S/L     | 50/200 reactions             |
| Q5U Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase                     | M0515S/L     | 100/500 units                |
| Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer            | M0531S/L     | 100/500 reactions            |
| Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer            | M0532S/L     | 100/500 reactions            |
| Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix                           | M0536S/L     | 100/500 reactions            |
| Phusion High-Fidelity PCR Kit                                  | E0553S/L     | 50/200 reactions             |
| Phusion High-Fidelity DNA Polymerase                           | M0530S/L     | 100/500 units                |
| Phusion Hot Start Flex High-Fidelity DNA Polymerase            | M0535S/L     | 100/500 units                |
| <b>DNA 聚合酶</b>                                                 |              |                              |
| OneTaq DNA Polymerase                                          | M0480S/L/X   | 200/1,000/5,000 units        |
| OneTaq Quick-Load DNA Polymerase                               | M0509S/L/X   | 100/500/2,500 units          |
| OneTaq Hot Start DNA Polymerase                                | M0481S/L/X   | 200/1,000/5,000 units        |
| OneTaq 2X Master Mix with Standard Buffer                      | M0482S/L     | 100/500 reactions            |
| OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer           | M0486S/L     | 100/500 reactions            |
| OneTaq Hot Start 2X Master Mix with Standard Buffer            | M0484S/L     | 100/500 reactions            |
| OneTaq Hot Start 2X Master Mix with GC Buffer                  | M0485S/L     | 100/500 reactions            |
| OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer | M0488S/L     | 100/500 reactions            |
| OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with GC Buffer       | M0489S/L     | 100/500 reactions            |
| Taq DNA Polymerase with ThermoPol™ Buffer                      | M0267S/L/X/E | 400/2,000/4,000/20,000 units |
| Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer                    | M0273S/L/X   | 400/2,000/4,000 units        |
| Taq DNA Polymerase with Standard Taq (Mg-free) Buffer          | M0320S/L     | 400/2,000 units              |
| Taq PCR Kit                                                    | E5000S       | 200 reactions                |
| Quick-Load Taq 2X Master Mix                                   | M0271L       | 500 reactions                |
| Taq 2X Master Mix                                              | M0270L       | 500 reactions                |
| Taq 5X Master Mix                                              | M0285L       | 500 reactions                |
| Multiplex PCR 5X Master Mix                                    | M0284S       | 100 reactions                |
| Hot Start Taq DNA Polymerase                                   | M0495S/L     | 200/1,000 units              |
| Hot Start Taq 2X Master Mix                                    | M0496S/L     | 100/500 reactions            |
| Vent DNA Polymerase                                            | M0254S/L     | 200/1,000 units              |
| Vent (exo-) DNA Polymerase                                     | M0257S/L     | 200/1,000 units              |
| Deep Vent DNA Polymerase                                       | M0258S/L     | 200/1,000 units              |
| Deep Vent (exo-) DNA Polymerase                                | M0259S/L     | 200/1,000 units              |
| LongAmp Taq DNA Polymerase                                     | M0323S/L     | 500/2,500 units              |
| LongAmp Hot Start Taq DNA Polymerase                           | M0534S/L     | 500/2,500 units              |
| LongAmp Taq 2X Master Mix                                      | M0287S/L     | 100/500 reactions            |
| LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix                            | M0533S/L     | 100/500 reactions            |
| LongAmp Taq PCR Kit                                            | E5200S       | 100 reactions                |
| <b>PCR 克隆 &amp; 突变</b>                                         |              |                              |
| NEB PCR Cloning Kit                                            | E1202S       | 20 reactions                 |
| NEB PCR Cloning Kit (Without Competent Cells)                  | E1203S       | 20 reactions                 |
| Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit                               | E0554S       | 10 reactions                 |
| Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Without Competent Cells)     | E0552S       | 10 reactions                 |

## cDNA 合成产品

| 产品                                             | NEB #      | 规格                        |
|------------------------------------------------|------------|---------------------------|
| KLD Enzyme Mix                                 | M0554S     | 25 reactions              |
| Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set            | N0446S     | 25 μmol of each           |
| Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix            | N0447S/L   | 8/40 μmol of each         |
| AMV Reverse Transcriptase                      | M0277S/L   | 200/1,000 units           |
| LunaScript RT SuperMix Kit                     | E3010S/L   | 25/100 reactions          |
| LunaScript RT Master Mix Kit (Primer-free)     | E3025S/L   | 25/100 reactions          |
| LunaScript RT SuperMix                         | M3010L/X/E | 100/500/2,500 reactions   |
| M-MuLV Reverse Transcriptase                   | M0253S/L   | 10,000/50,000 units       |
| ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit | E6560S/L   | 30/150 reactions          |
| ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit    | E6300S/L   | 30/150 reactions          |
| Template Switching RT Enzyme Mix               | M0466S/L   | 20/100 reactions          |
| ProtoScript II Reverse Transcriptase           | M0368S/L/X | 4,000/10,000/40,000 units |
| WarmStart® RTx Reverse Transcriptase           | M0380S/L   | 50/250 reactions          |

## 限制性内切酶产品

| 产品                                   | NEB #        | 规格                  |
|--------------------------------------|--------------|---------------------|
| <b>高保真 (HF®) 限制性内切酶</b>              |              |                     |
| AgeI-HF                              | R3552S/L     | 300/1,500 units     |
| ApoI-HF                              | R3566S/L     | 1,000/5,000 units   |
| BamHI-HF                             | R3136S/L/T/M | 10,000/50,000 units |
| BbsI-HF                              | R3539S/L     | 300/1,500 units     |
| BclI-HF                              | R3160S/L     | 3,000/15,000 units  |
| BmtI-HF                              | R3658S/L     | 300/1,500 units     |
| BsaI-HFv2                            | R3733S/L     | 1,000/5,000 units   |
| BsiWI-HF                             | R3553S/L     | 300/1,500 units     |
| BsrGI-HF                             | R3575S/L     | 1,000/5,000 units   |
| BstEII-HF                            | R3162S/L/M   | 2,000/10,000 units  |
| BstZ171-HF                           | R3594S/L     | 1,000/5,000 units   |
| DraIII-HF                            | R3510S/L     | 1,000/5,000 units   |
| EagI-HF                              | R3505S/L/M   | 500/2,500 units     |
| EcoRI-HF                             | R3101S/L/T/M | 10,000/50,000 units |
| EcoRV-HF                             | R3195S/L/T/M | 4,000/20,000 units  |
| HindIII-HF                           | R3104S/L/T/M | 10,000/50,000 units |
| KpnI-HF                              | R3142S/L/M   | 4,000/20,000 units  |
| MfeI-HF                              | R3589S/L     | 500/2,500 units     |
| MluI-HF                              | R3198S/L     | 1,000/5,000 units   |
| NcoI-HF                              | R3193S/L/M   | 1,000/5,000 units   |
| NheI-HF                              | R3131S/L/M   | 1,000/5,000 units   |
| NotI-HF                              | R3189S/L/M   | 500/2,500 units     |
| NruI-HF                              | R3192S/L     | 1,000/5,000 units   |
| NsiI-HF                              | R3127S/L     | 1,000/5,000 units   |
| PstI-HF                              | R3140S/L/T/M | 10,000/50,000 units |
| PvuI-HF                              | R3150S/L     | 500/2,500 units     |
| PvuII-HF                             | R3151S/L/M   | 5,000/25,000 units  |
| SacI-HF                              | R3156S/L/M   | 2,000/10,000 units  |
| Sall-HF                              | R3138S/L/T/M | 2,000/10,000 units  |
| SbfI-HF                              | R3642S/L     | 500/2,500 units     |
| SalI-HF                              | R3122S/L/M   | 1,000/5,000 units   |
| SpeI-HF                              | R3133S/L/M   | 500/2,500 units     |
| SphI-HF                              | R3182S/L/M   | 500/2,500 units     |
| SspI-HF                              | R3132S/L/M   | 1,000/5,000 units   |
| StyI-HF                              | R3500S/L     | 3,000/15,000 units  |
| <b>特色凝胶上样染料</b>                      |              |                     |
| Gel Loading Dye, Purple (6X)         | B7024S       | 4 ml                |
| Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS | B7025S       | 4 ml                |

登陆 [www.neb.cn](http://www.neb.cn)，查找限制性内切酶产品完整列表。



## 末端修饰产品

| 产品                                          | NEB #      | 规格                    |
|---------------------------------------------|------------|-----------------------|
| Quick CIP                                   | M0525S/L   | 1,000/5,000 units     |
| Shrimp Alkaline Phosphatase (Recombinant)   | M0371S/L   | 500/2,500 units       |
| Antarctic Phosphatase                       | M0289S/L   | 1,000/5,000 units     |
| T4 DNA Polymerase                           | M0203S/L   | 150/750 units         |
| DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment   | M0210S/L/M | 200/1,000/1,000 units |
| Quick Blunting Kit                          | E1201S/L   | 20/100 reactions      |
| Mung Bean Nuclease                          | M0250S/L   | 1,000/5,000 units     |
| T4 Polynucleotide Kinase                    | M0201S/L   | 500/2,500 units       |
| Klenow Fragment (3' → 5' exo <sup>-</sup> ) | M0212S/L/M | 200/1,000/1,000 units |
| β-Agarase I                                 | M0392S/L   | 100/500 units         |

## 连接产品

| 产品                                   | NEB #        | 规格                    |
|--------------------------------------|--------------|-----------------------|
| Blunt/TA Ligase Master Mix           | M0367S/L     | 50/250 reactions      |
| Instant Sticky-End Ligase Master Mix | M0370S/L     | 50/250 reactions      |
| NEBridge Ligase Master Mix           | M1100S       | 50 reactions          |
| ElectroLigase                        | M0369S       | 50 reactions          |
| T4 DNA Ligase                        | M0202S/L/T/M | 20,000/100,000 units  |
| Salt-T4 DNA Ligase                   | M0467S/L     | 20,000/100,000 units  |
| Hi-T4 DNA Ligase                     | M2622S/L     | 20,000/100,000 units  |
| Quick Ligation Kit                   | M2200S/L     | 30/150 reactions      |
| T3 DNA Ligase                        | M0317S/L     | 100,000/750,000 units |
| T7 DNA Ligase                        | M0318S/L     | 100,000/750,000 units |
| Taq DNA Ligase                       | M0208S/L     | 2,000/10,000 units    |

## 转化产品

| PRODUCT                                                               | NEB #          | SIZE                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>dam-/dcm-</i> Competent <i>E. coli</i>                             | C2925H/I       | 20 x 0.05 ml/tube/<br>6 x 0.2 ml ml/tube                                                                  |
| NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)                | C2987H/I/P/R/U | 20 x 0.05 ml/tube/<br>6 x 0.2 ml/tube/<br>1 x 96 well plate/<br>1 x 384 well plate/<br>12 x 8 tube strips |
| NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (Subcloning Efficiency)          | C2988J         | 6 x 0.4 ml/tube                                                                                           |
| NEB 5-alpha F <sup>-</sup> Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) | C2992H/I       | 20 x 0.05/6 x 0.2 ml                                                                                      |
| NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)                | C3019H/I/P     | 20 x 0.05 ml/tube/<br>6 x 0.2 ml ml/tube<br>1 x 96 well plate                                             |
| NEB 10-beta Electrocompetent <i>E. coli</i>                           | C3020K         | 6 x 0.1 ml/tube                                                                                           |
| NEB Turbo Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)                  | C2984H/I       | 20 x 0.05 ml/tube/<br>6 x 0.2 ml/tube                                                                     |
| NEB Stable Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)                 | C3040H/I       | 20 x 0.05 ml/tube/<br>6 x 0.2 ml/tube                                                                     |
| NEB Cloning Competent <i>E. coli</i> Sampler                          | C1010S         | 8 tubes                                                                                                   |

登陆 [www.neb.cn](http://www.neb.cn)，查找感受态细胞完整列表。

## 核酸纯化产品

| PRODUCT                              | NEB #    | SIZE         |
|--------------------------------------|----------|--------------|
| Monarch Plasmid Miniprep Kit         | T1010S/L | 50/250 preps |
| Monarch DNA Gel Extraction Kit       | T1020S/L | 50/250 preps |
| Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) | T1030S/L | 50/250 preps |
| Monarch Genomic DNA Purification Kit | T3010S/L | 50/150 preps |
| Monarch Total RNA Miniprep Kit       | T2010S   | 50 preps     |
| Monarch RNA Cleanup Kit (10 µg)      | T2030S/L | 10/100 preps |
| Monarch RNA Cleanup Kit (50 µg)      | T2040S/L | 10/100 preps |
| Monarch RNA Cleanup Kit (500 µg)     | T2050S/L | 10/100 preps |

纯化柱和缓冲液可单独购买

## DNA 分析产品

| 产品                                                | NEB #    | 规格                  |
|---------------------------------------------------|----------|---------------------|
| 1 kb DNA Ladder                                   | N3232S/L | 200/1,000 gel lanes |
| TriDye 1 kb DNA Ladder                            | N3272S   | 125 gel lanes       |
| Quick-Load 1 kb DNA Ladder                        | N0468S/L | 125/375 gel lanes   |
| 100 bp DNA Ladder                                 | N3231S/L | 100/500 gel lanes   |
| TriDye 100 bp DNA Ladder                          | N3271S   | 125 gel lanes       |
| Quick-Load 100 bp DNA Ladder                      | N0467S/L | 125/375 gel lanes   |
| 1 kb Plus DNA Ladder                              | N3200S/L | 200/1,000 gel lanes |
| 1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains              | N0559S   | 50 µg/ml            |
| TriDye 1 kb Plus DNA Ladder                       | N3270S   | 250 gel lanes       |
| Quick-Load 1 kb Plus DNA Ladder                   | N0469S   | 250 gel lanes       |
| Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder            | N0550S/L | 250/750 gel lanes   |
| TriDye Ultra Low Range DNA Ladder                 | N0558S   | 100 µg/ml           |
| 50 bp DNA Ladder                                  | N3236S/L | 200/1,000 gel lanes |
| Quick-Load Purple 50 bp DNA Ladder                | N0556S   | 250 gel lanes       |
| Quick-Load 1 kb Extend DNA Ladder                 | N3239S   | 125 gel lanes       |
| Quick-Load Purple 1 kb DNA Ladder                 | N0552S/L | 125/375 gel lanes   |
| Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder               | N0551S/L | 125/375 gel lanes   |
| Low Molecular Weight DNA Ladder                   | N3233S/L | 100/500 gel lanes   |
| Quick-Load Purple Low Molecular Weight DNA Ladder | N0557S   | 125 gel lanes       |
| Fast DNA Ladder                                   | N3238S   | 200 gel lanes       |
| PCR Marker                                        | N3234S/L | 100/500 gel lanes   |

也可提供传统的和 PFG Marker，登陆 [www.neb.cn/DNAMarkersandLadders](http://www.neb.cn/DNAMarkersandLadders) 了解详情

## 无缝克隆产品

| 产品                                                     | NEB #        | 规格                   |
|--------------------------------------------------------|--------------|----------------------|
| NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit                | E5520S       | 10 reactions         |
| NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix                 | E2621S/L     | 10/50 reactions      |
| NEBuilder HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments | E2623S       | 20 reactions         |
| Gibson Assembly Cloning Kit                            | E5510S       | 10 reactions         |
| Gibson Assembly Master Mix                             | E2611S/L     | 10/50 reactions      |
| NEBridge Golden Gate Assembly Kit (BsaI-HFv2)          | E1601S/L     | 20/100 reactions     |
| NEBridge Golden Gate Assembly Kit (BsmBI-v2)           | E1602S/L     | 20/100 reactions     |
| NEBridge Ligase Master Mix                             | M1100S       | 50 reactions         |
| BbsI                                                   | R0539S/L     | 300/1,500 units      |
| BbsI-HF                                                | R3539S/L     | 300/1,500 units      |
| BsaI-HFv2                                              | R3733S/L     | 1,000/5,000 units    |
| BsmBI-v2                                               | R0739S/L     | 200/1,000 units      |
| Esp3I                                                  | R0734S/L     | 300/1,500 units      |
| PaqCI                                                  | R0745S/L     | 200/1,000 units      |
| SapI                                                   | R0569S/L     | 250/1,250 units      |
| BtgZI                                                  | R0703S/L     | 100/500 units        |
| BspQI                                                  | R0712S/L     | 500/2,500 units      |
| T4 DNA Polymerase                                      | M0203S/L     | 150/750 units        |
| Taq DNA Ligase                                         | M0208S/L     | 2,000/10,000 units   |
| T4 DNA Ligase                                          | M0202S/L/T/M | 20,000/100,000 units |
| T5 Exonuclease                                         | M0363S/L     | 1,000/5,000 units    |
| Exonuclease V (RecBCD)                                 | M0345S/L     | 1,000/5,000 units    |
| USER Enzyme                                            | M5505S/L     | 50/250 units         |
| Thermolabile USER Enzyme II                            | M5508S/L     | 50/250 units         |

## 重组克隆产品

| 产品              | NEB #      | 规格           |
|-----------------|------------|--------------|
| Cre Recombinase | M0298S/L/M | 50/250 units |

#### 华北地区代理商

(北京、天津、山东、陕西)

北京百灵克生物科技有限责任公司

电话: 010-58895880 58896088

Email: bjbiolink@vip.sina.com

基因有限公司 (北京办事处)

电话: 010-51665161

Email: info\_bj@genecompany.com

北京友谊中联生物科技有限公司

电话: 010-64892983 64892984

Email: mailer@biofriendship.com.cn

北京康润诚业生物科技有限公司

电话: 010-80725976

Email: info@gene-star.com

北京拓山众成生物科技有限公司

电话: 010-87163646

Email: business@tuoshan.bio

北京罗比生物科技有限公司

电话: 010-52360052

Email: wangliying@bjklbio.com.cn

天津润泰科技发展有限公司

电话: 022-27466043

Email: runtaitj@163.com

基因有限公司 (天津办事处)

电话: 022-88293156 88293136

Email: info\_tj@genecompany.com

基因有限公司 (济南办事处)

电话: 0531-86560825 86569323

Email: info\_jn@genecompany.com

青岛秀佰锐生物器材有限公司

电话: 0532-80930357

Email: lxm-01@163.com

基因有限公司 (西安办事处)

电话: 029-82501196 82501187

Email: info\_xa@genecompany.com

成都高保真生物技术有限公司

(西北办事处)

电话: 029-85368655/17392570711

Email: hifibio@163.com

#### 东北地区代理商

(辽宁、吉林、黑龙江)

基因有限公司 (沈阳办事处)

电话: 024-23341315 23342115

Email: info\_sy@genecompany.com

哈尔滨赛信生物科技开发有限公司

电话: 0451-81320140/15561834722

Email: settlebio\_zn@126.com

百灵克生物科技有限责任公司

(长春办事处)

电话: 0431-89356676

Email: cc@bjbiolink.com

#### 华东地区代理商

(上海、江苏、浙江、安徽)

基因有限公司 (上海办事处)

电话: 021-64951899

Email: info\_sh@genecompany.com

上海由谊联生物科技有限公司

电话: 021-54590100 54591286

Email: shanghai@biofriendship.com

南京伟沃生物科技有限公司

电话: 025-58649515

Email: wobio\_ord@126.com

基因有限公司 (南京办事处)

电话: 025-83248692 83248693

Email: info\_nj@genecompany.com

杭州柏迈行科技有限公司

电话: 0571-87253825

Email: zhanglili@hzbiogroup.com

基因有限公司 (杭州办事处)

电话: 0571-87229824 87229847

Email: info\_hz@genecompany.com

合肥睿捷生物科技有限公司

电话: 0551-63468002

Email: viking2000@126.com

曼晟 (上海) 生物科技有限公司

电话: 15317092906

Email: linsuchao@manshengbio.com

#### 华南地区代理商

(广东、福建、海南)

基因有限公司 (广州办事处)

电话: 020-85524840 85524841

Email: info\_gz@genecompany.com

广州拓山生物科技有限公司

电话: 020-34397703 4008631632

Email: tuoshancorp@tuoshan.bio

广州汇典生物技术有限公司

电话: 020-84508019

Email: guangzhou@bio-hd.com

北京康润诚业生物科技有限公司

(广州办事处)

电话: 020-38839100

Email: info@gene-star.com

深圳市百胜科创生物科技有限公司

电话: 0755-26737815

Email: order@rootbio.com

深圳市百胜科创生物科技有限公司

(海南办事处)

电话: 0898-66196376

Email: hnsnw@rootbio.com

哈尔滨赛信生物科技开发有限公司

(三亚办事处)

电话: 18686858518

Email: settlebio\_zn@126.com

厦门鹭隆科技发展有限公司

电话: 0592-2057667

Email: LLbio@LLbio.com

#### 华中地区代理商

(湖北、湖南、河南)

武汉鼎中公司

电话: 027-87166462/3/5

Email: info\_wh@genecompany.com

武汉普兰德生物技术有限公司

电话: 027-87287193

Email: plantbio@163.com

武汉柏迈行科技有限公司

电话: 15272897717

Email: zhangqingqing@hzbiogroup.com

基因有限公司 (长沙办事处)

电话: 0731-84476562

Email: info\_cs@genecompany.com

基因有限公司 (郑州办事处)

电话: 0371-63288331 18103810733

Email: info\_zz@genecompany.com

郑州伯美科技有限公司

电话: 0371-86128001

Email: bio360@163.com

#### 西南地区代理商

(四川、云南、重庆)

基因有限公司 (成都办事处)

电话: 028-85067065 85067030

Email: info\_cd@genecompany.com

成都高保真生物技术有限公司

电话: 028-85222103

Email: cdeastcreative@163.com

基因有限公司 (重庆办事处)

电话: 023-68614842-808

Email: info\_cq@genecompany.com

重庆卡迪威丫科技有限公司

电话: 18223200047

Email: 3476816720@qq.com

基因有限公司 (昆明办事处)

电话: 0871-65349992

Email: info\_km@genecompany.com

云南精赛顿生物科技有限公司

电话: 13987691917 18887198810

Email: genestone@126.com

## 特色工具



为您克隆实验的每一步选择合适的产品和实验方案, 登录 **NEBcloner.neb.com** 使用克隆设计软件 **NEBcloner®**。



登录 **NEBuilder.neb.com** 使用 **NEBuilder®** 克隆组装设计软件 (**NEBuilder® DNA Assembly Tool**) , 为您的 **DNA** 组装反应设计引物。



下载适用于 **iPhone®** 或 **iPad®** 的 **NEB AR** 应用。扫描位于每个页面一角的蝴蝶图标查找视频、教程及模拟体验。

#### NEB 中国

客服电话: 400-811-2220/400-690-3366

电话: 010-82378266

客户服务: info@neb-china.com

技术支持: support@neb-china.com

网址: www.neb.cn



NEB 视频学习站



NEB 微信公众号



NEB 技术资料站