

# NEB NEWS

A scientific update  
from  
New England Biolabs  
Beijing

Issue II, 2016

纽英伦快讯



基因编辑促销季

争议与进步

EnGen™ 基因编辑突变检测试剂盒

NEB Cas9 核酸酶



15 YEARS IN CHINA





# 基因编辑 促销季

1 Cas9 核酸酶产品 7.5 折

2 模板制备相关产品 7.5 折

3 RNA 合成系列产品 7 折特惠

4 基因编辑突变检测产品 7 折惊喜优惠

5 Monarch™ 新品上市 6.5 折起，  
全自动晴雨伞免费送

6 购买 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit  
for Illumina®，接头引物试剂盒免费送

活动时间：

即日起至 2016 年 8 月 31 日截止

更多优惠详情, 请见 P7 – P10

## 目录

Issue II, 2016

2 卷首语  
**争议与进步**

3 关于 NEB  
**思维的碰撞与革新**

5 新品介绍  
**EnGen™ 基因编辑突变检测试剂盒**

NEB EnGen™ 基因编辑突变检测试剂盒提供一整套的试剂, 可简单快速的检测出 TALEN 或 CRISPR/Cas9 等基因编辑的效率。

6 新品介绍  
**HiScribe® T7 ARCA mRNA 试剂盒**

HiScribe® T7 ARCA mRNA 合成试剂盒被设计用来为多种应用快速合成带帽和尾的 mRNA。试剂盒同时提供 DNase I 和 LiCl, DNase I 用于将 DNA 模板去除, LiCl 用于快速纯化 mRNA。

7 优惠促销  
**基因编辑促销季**

1. Cas9 核酸酶产品 7.5 折
2. 模板制备相关产品 7.5 折
3. RNA 合成系列产品 7 折特惠
4. 基因编辑突变检测产品 7 折惊喜优惠
5. Monarch™ 新品上市 6.5 折起, 全自动晴雨伞免费送
6. 购买 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®, 接头引物试剂盒免费送

活动时间：即日起至 2016 年 8 月 31 日

11 经典回顾

## 最值得信赖的 NEB 克隆与合成生物学产品

分子生物学作为研究和发展的基础学科, 已经延伸到基因编辑和合成生物学领域。NEB 以值得信赖的产品和服务, 为科研团队提供多种领先的 DNA 组装和克隆工具。

13 特别推荐  
**NEB Cas9 核酸酶**

NEB 提供性价比极高的重组 Cas9 核酸酶, 由于不需要转录和翻译, 其与向导 RNA (gRNA) 形成的核糖核蛋白 (RNP) 复合物在进入细胞后可以立即发挥作用, 最大程度地降低了脱靶剪切的几率。此外, Cas9 核酸酶还可用于基因编辑实验中位点修饰效率的评估。

## 卷首语

# 争议与进步

“魏则西事件”、“百度竞价排名”、“莆田系医院”，最近的朋友圈和新闻被这些词汇充斥着，每天牵动着大众的神经。关于这些热点事件，每一个人从各自的角度产生不同的看法，有认同、有否定，于是就产生了“争议”。不得不说，媒体的发展让现今的我们能更快速地接近一些焦点，于是信息的识别和判断就变得尤为重要了。直到有一天真相浮出水面，你往往会觉得当初的想法是多么的简单和幼稚；而当你参与了几次所谓的“争议”后，你也许就能学会深度思考，或者看到殊途同归，甚至体会大彻大悟。

新生的事物必然会引起“争议”，因为大多数人缺乏了解，这很正常。就比如说在分子生物学领域如火如荼的基因编辑技术。随着 CRISPR/Cas9 的出现，一时间就仿佛生物圈子里的苹果和特斯拉一样，话题不断。当争议最终达成一致认同时，一个能有效、快捷地“编辑”基因的利器便腾空出世了。这就是进步，科学的进步，也是争议带来的进步。

本期的 NEB NEWS 是首次推出的“基因编辑”专刊。其中，有 NEB 为基因编辑技术提供的片段组装试剂盒，定点突变试剂盒，Cas9 蛋白，T7 核酸内切酶 I 等相关产品介绍，还有 NGS 建库试剂盒、转录逆转录以及 Monarch 核酸纯化系列产品的促销优惠活动。

科学探索本身就是一种争议，没有绝对的对错，但始终在进步，与大家共勉。

NEB (北京) 市场部

2016 年夏

Cas9 NGS T7  
Monarch CRISPR



## 关于 NEB

# 思维的碰撞与革新

2016 年 4 月 28 日，“二代测序技术应用的发展与未来”交流研讨会暨首届 NEB 高通量测序技术先锋论坛在北京香格里拉大酒店拉开帷幕，近 200 名国内外的专家学者们聚集一堂，围绕 NGS 技术应用的发展与未来这一主题展开交流与讨论。

在“New Developments in NGS Technologies”环节中，华大科技（香港）研发中心 Sunny Cheung 博士从宏观的角度，以大数据为依据讲述了“精准医疗中存在的机遇及挑战”，深入分析了全基因组测序及外显子组测序在精准医学领域所承担的重要作用。随后，清华大学李海涛教授就组蛋白识别及癌症发生机制这一话题，从结构层面分享了对组蛋白翻译后修饰蕴含了关键表观遗传信息控制着染色质层面遗传信息的解读。同样作为表观遗传学领域的专家，北京大学伊成器研究员从开发新的表观测序方法的角度，讲述了以化学及高通量测序相结合开发出的表观核酸修饰的测序新方法。

在“Meeting with Noble Laureate”环节中，NEB 全球发展部副总监 Salvatore 博士介绍了 NEB 公司最新推出的 NEBNext Direct 靶向富集产品。该产品与二代测序技术完美结合，使得目标基因的高通量深度测序成为可能。由此技术研发的 NEBNext Direct HotSpot Cancer Panel 能够覆盖 50 个基因中的 190 个常见癌症基因突变，即使 ctDNA 和 FFPE 样本也能得到均一的结果。

随着诺贝尔奖获得者 NEB 首席科学家 Sir Richard Roberts 的到来，使整个会场的气氛达到顶峰。在为时 60 分钟的“探索细菌甲基化组”的精彩演讲后，Richard 带领本次论坛的所有 Speaker 们就 NGS 技术的发展趋势及其在精准医疗中的应用进行了精彩的现场讨论，场内气氛热烈，提问互动此起彼伏，与会者们共同享受着与大师们的思维碰撞。

思维的碰撞产生智慧的火花，技术的革新带来最新的生产动力。秉承“Scientists for Scientists”的理念始终走在科学最前沿的 NEB 公司，将不断致力于为高通量测序工作者们提供优质的产品、服务以及分享最新的科学进展。



# 环保的行动派 – NEB 植树造林基金启动

作为 40 多年来一直秉承“环保、自然”理念的生物企业，环境保护被 NEB 视为最重要的责任之一，我们不断寻求新的方法以改进我们的商业流程，从而尽可能降低对环境的影响。在中国，旨在帮助科研工作者对实验室废弃空管进行无害化回收的“NEB 世界环保日特别活动”已经连续成功举办了 5 年，在全国数十所高校、科研机构回收处理了数以万计的废弃空管。

2015 年，我们首次成立了“NEB 植树造林基金”，环保周特别活动中每收集一个空管，NEB（北京）便会向该基金投入 1 元，最终将基金款项用于植树造林等公益环保行动。2016 年初春，NEB（北京）全体员工践行诺言，将“NEB 植树造林基金”首次应用到植树造林活动中，建立起 NEB 环保林。环保林建成后，将由 NEB 植树造林基金进行定期维护，每一年的初春之际，我们都会来到 NEB 环保林，亲手种下新的树苗，为世界增添一抹绿意。



主题为“科学环保的行动派”的 2016 年“NEB 环保周特别活动”将于 5 月 24 日- 6 月 14 日期间于全国 23 所高校和科研院所展开，邀上小伙伴们一起参与吧，举手之劳，守护环境，做环保的行动派！



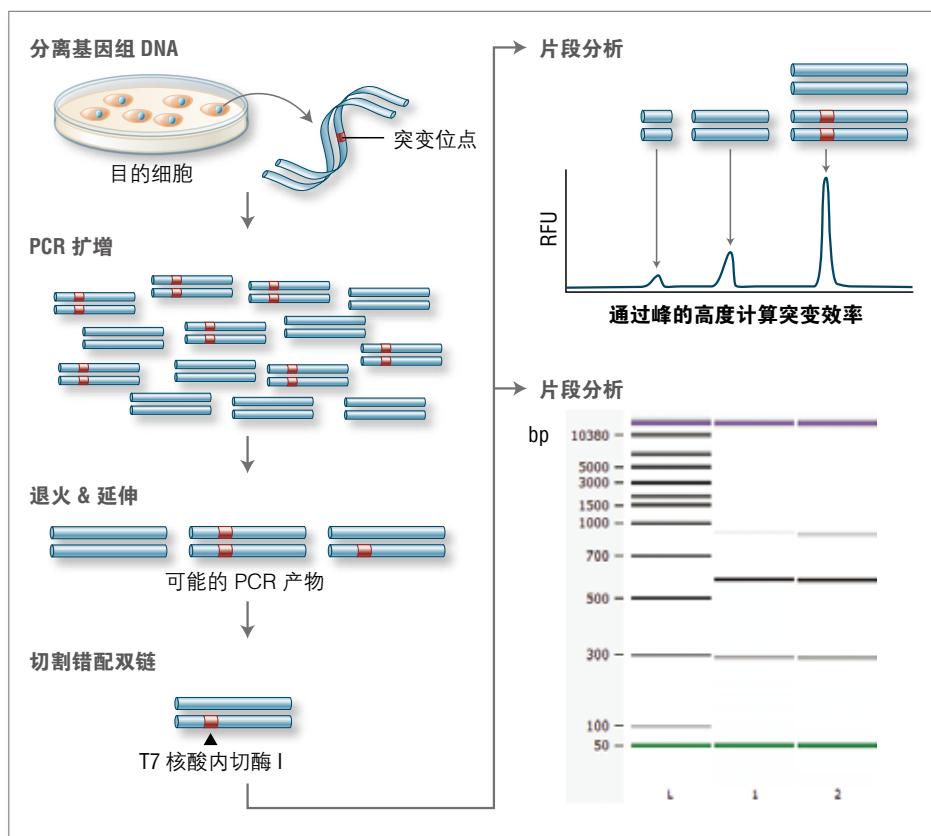
## 新品介绍

### EnGen™ 基因编辑突变检测试剂盒

EnGen 基因编辑检测试剂盒为检测基因编辑效率提供一整套的试剂。试剂盒操作的第一步，使用 Q5 热启动超保真聚合酶 2× 预混液从待测细胞中扩增出目的基因组的靶标区域（即通过 CRISPR/Cas9、TALENs 或 ZFN 等方法进行了基因编辑的区域），经退火、延伸步骤后，形成异源双链 DNA。经过多轮循环后，基因插入和缺失（Indels）等造成的突变就将在扩增子池中得到富集。第二步，退火后的 PCR 产物用 EnGen T7 核酸内切酶 I 进行切割。EnGen T7 核酸内切酶 I 是一种结构特异性酶，可有效识别大于 1 个碱基的基因错配。当出现错配时，DNA 分子的两条链被切割从而形成较小的片段。分析片段图谱可以对基因编辑实验的效率进行评估。

试剂盒的实验流程已经过优化，通过 Q5 热启动超保真聚合酶 2× 预混液扩增得到的 PCR 产物可以不经纯化而直接用 T7 核酸内切酶 I 进行消化。异源双链 DNA 分子只需 15 分钟就可以被完全切割，随后用蛋白酶 K 进行有效的反应终止。此外，Q5 热启动超保真聚合酶 2× 预混液还可以用于在酶切之前优化靶点扩增实验。

#### 基因编辑突变检测试剂盒实验流程综述



将引物设计在已完成基因编辑位点的两侧，PCR 产物变性、退火后会生成三种结构。其中一种结构能够被 T7 核酸内切酶 I 切割（多于 1 个碱基错配的双链 DNA），经电泳分离和片段分析后，估算出基因编辑效率。

#### 订购信息

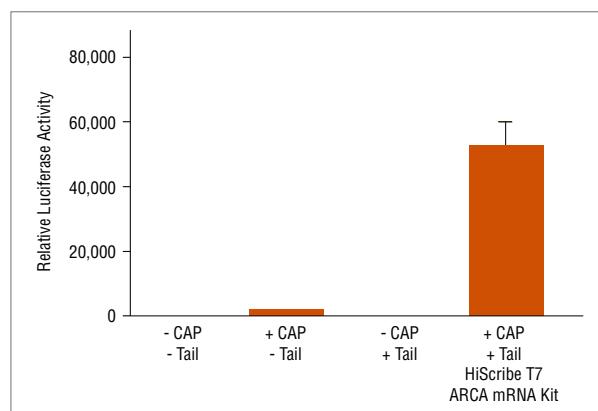
产品名称	货号	规格
EnGen™ 基因编辑突变检测试剂盒	E3321S	25 rxns

## HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒

大多数真核 mRNA 的高效翻译需要在 5' 末端有一个 7- 甲基鸟苷帽结构, 3' 末端有一个 Poly(A) 尾。HiScribe T7 ARCA mRNA 合成试剂盒 (NEB #E2060S) 被设计用来为多种应用快速合成带帽和尾的 mRNA。使用 T7 RNA 聚合酶通过共转录, 将抗 - 反向帽类似物 (ARCA, NEB #S1411) 加到 mRNA 上, 然后使用 *E. coli* Poly(A) 聚合酶为加帽的 mRNA 再加 Poly(A) 尾。该试剂盒另一个版本 (NEB #E2065S) 不提供 *E. coli* Poly(A) 聚合酶, 适用于模板已经编码有 Poly(A) 尾或者不需要 Poly(A) 尾的实验。两种试剂盒都同时提供 DNase I 和 LiCl, DNase I 用于将 DNA 模板去除, LiCl 用于快速纯化 mRNA。

备注: 有带尾 (NEB #E2060) 和不带尾 (NEB #E2065) 两种形式提供

加帽和加尾在培养的细胞 mRNA 功能中是必不可少的



*U2OS* 细胞中荧光素酶的表达。依照上文介绍合成的 *Cypridina* 荧光素酶 RNA 经过纯化后和纯化的 *Gaussia* 荧光素酶 mRNA 共转染到 *U2OS* 细胞中。使用 HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒 (带尾) 合成的 mRNA 在 5' 末端加帽, 3' 末端加上了 Poly(A) 尾。在 37 °C 孵育 16 小时后, 测量每个孔中细胞培养上清的 *Cluc* 和 *Gluc* 活性。发光值被记录并用于计算荧光素酶的相对活性。

### 优势

- 更快的实验方案可以让您在两小时内完成从加帽到纯化的实验过程
- 灵活的实验流程可以引入经过修饰的碱基
- 高质量的各种组分确保 mRNA 的完整性
- 正确导向的 ARCA 帽可以确保最佳的翻译效率
- 试剂盒包含所有需要的试剂
- 每个试剂盒提供的试剂反应数是竞争对手的两倍

NEB 为 RNA 合成工作流程的每一步骤都提供了相关产品



详情请登录:  
www.neb-china.com

### 订购信息

产品名称	货号	规格
HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit ( with Tailing )	E2060S	20 rxns
HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit	E2065S	20 rxns

优惠促销

## 基因编辑促销季

基因编辑，即通过对特定 DNA 片段的敲除、加入或置换等对目标基因进行“编辑”，是时下最热门的分子生物学技术之一。40年来，NEB 作为分子生物学试剂的行业领军者，同样在基因编辑领域提供种类齐全的产品：高品质 Cas9 核酸酶产品，用于模板制备的 NEBuilder 片段组装产品，高性价比的转录产品和用于检测基因编辑效率的 T7EI 产品，以及最新推出的 Monarch 核酸纯化产品等等。火热的基因编辑技术伴随着火热的夏季，NEB (北京) 特别推出“NEB (北京) 成立 15 周年系列特别活动”之基因编辑促销季。

活动时间：即日起至 2016 年 8 月 31 日

### 1 Cas9 核酸酶产品 7.5 折

NEB 现提供高品质 Cas9 核酸酶，包括含有核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 的产品。它们可以和体外转录合成的 sgRNA 作用，形成 Cas9/sgRNA 复合体并切割 DNA 靶序列。

产品名称	货号	规格	目录价 (元)	促销价 (元)
Cas9 Nuclease NLS, <i>S. pyogenes</i>	M0641L	350 pmol	¥9,319	¥6,989
	M0641M (高浓度 20X)	600 pmol	¥12,099	¥9,074
	M0641S	70 pmol	¥2,139	¥1,604
	M0641T (高浓度 20X)	300 pmol	¥8,149	¥6,112
Cas9 Nuclease, <i>S. pyogenes</i>	M0386L	350 pmol	¥8,099	¥6,074
	M0386M (高浓度 20X)	600 pmol	¥10,529	¥7,897
	M0386S	70 pmol	¥1,799	¥1,349
	M0386T (高浓度 20X)	300 pmol	¥6,919	¥5,189

### 2 模板制备相关产品 7.5 折

在基因编辑实验中，常需要构建含 sgRNA 编码序列的载体。无论是选择内切酶，或是点突变，亦或是片段组装的载体构建技术，NEB 提供一应俱全的产品，真正让您的模板制备实验高效又方便。

产品名称	货号	规格	目录价 (元)	促销价 (元)
BbsI	R0539L	1,500 units	¥3,079	¥2,309
	R0539S	300 units	¥679	¥509
	R0539V	150 units	¥359	¥269
BsaI	R0535L	5,000 units	¥3,079	¥2,309
	R0535S	1,000 units	¥679	¥509
	R0535V	500 units	¥359	¥269
BsaI-HF	R3535L	5,000 units	¥3,079	¥2,309
	R3535S	1,000 units	¥679	¥509
	R3535V	500 units	¥359	¥269
BsmBI	R0580L	1,000 units	¥3,339	¥2,504
	R0580S	200 units	¥739	¥554
BspQI	R0712L	2,500 units	¥3,339	¥2,504
	R0712S	500 units	¥739	¥554



产品名称	货号	规格	目录价(元)	促销价(元)
NEB® Golden Gate Assembly Mix	E1600S	15 rxns	¥2,699	¥2,024
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	E0554S	10 rxns	¥2,159	¥1,619
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	E2621X	250 rxns	¥27,979	¥20,984
	E2621L	50 rxns	¥6,999	¥5,249
	E2621S	10 rxns	¥1,769	¥1,327
Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	M0494L	500 rxns	¥5,599	¥4,199
	M0494S	100 rxns	¥1,419	¥1,064
Q5® High-Fidelity PCR Kit	E0555L	200 rxns	¥2,119	¥1,589
Q5® High-Fidelity PCR Kit	E0555S	50 rxns	¥629	¥472
LongAmp® Taq DNA Polymerase	M0323L	2,500 units	¥3,609	¥2,707
	M0323S	500 units	¥899	¥674
	M0323V	250 units	¥469	¥352
OneTaq® DNA Polymerase	M0480X	5,000 units	¥5,799	¥4,349
	M0480L	1,000 units	¥1,479	¥1,109
	M0480S	200 units	¥369	¥277

### 3 RNA 合成系列产品 7 折特惠

利用质粒或 PCR 产物为模板, 可以进行合成 sgRNA 以及 Cas9 mRNA 的体外转录实验。NEB 提供高品质 RNA 合成试剂, 加帽、加尾试剂, RNA 酶抑制剂和 RNA marker 等产品, 性价比高且种类齐全, 一站式满足您的实验需求。

产品名称	促销货号	规格	目录价(元)	促销价(元)
HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit	E2040S	50 rxns	¥2,349	¥1,644
HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit	E2050S	50 rxns	¥2,999	¥2,099
HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit (with Tailing)	E2060S	20 rxns	¥4,199	¥2,939
HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit	E2065S	20 rxns	¥3,599	¥2,519
T7 RNA Polymerase	M0251L	25,000 units	¥2,789	¥1,952
	M0251S	5,000 units	¥699	¥489
SP6 RNA Polymerase	M0207L	10,000 units	¥2,789	¥1,952
	M0207S	2,000 units	¥699	¥489
T3 RNA Polymerase	M0378S	5,000 units	¥799	¥559
Ribonucleotide Solution Mix	N0466L	50 μ mol of each	¥3,029	¥2,120
	N0466S	10 μ mol of each	¥759	¥531
Ribonucleotide Solution Set	N0450L	50 μ mol of each	¥2,889	¥2,022
	N0450S	10 μ mol of each	¥729	¥510
RNase Inhibitor, Murine	M0314L	15,000 units	¥3,029	¥2,120
	M0314S	3,000 units	¥759	¥531

体外转录与 mRNA 合成产品

优惠促销

## 基因编辑促销季

产品名称	货号	规格	目录价 (元)	促销价 (元)
加帽与加尾产品	Vaccinia Capping System	M2080S	400 units	¥1,449
	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	M0366S	2,000 units	¥629
	3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (ARCA)	S1411L	5 μ mol	¥7,589
		S1411S	1 μ mol	¥1,899
	m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog	S1404L	5 μ mol	¥7,589
		S1404S	1 μ mol	¥1,899
	m7G(5')ppp(5')A RNA Cap Structure Analog	S1405L	5 μ mol	¥7,589
		S1405S	1 μ mol	¥1,899
	G(5')ppp(5')A RNA Cap Structure Analog	S1406L	5 μ mol	¥5,159
		S1406S	1 μ mol	¥1,289
	G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog	S1407L	5 μ mol	¥4,809
		S1407S	1 μ mol	¥1,209
	E. coli Poly(A) Polymerase	M0276L	500 units	¥2,889
		M0276S	100 units	¥729
	Adenosine-5' Triphosphate (ATP)	P0756L	5.0 ml	¥1,269
		P0756S	1 ml	¥319
其它相关产品	DNase I (RNase-Free)	M0303L	5,000 units	¥3,029
		M0303S	1,000 units	¥759
	ssRNA Ladder	N0362S	25 gel lanes	¥699
	Low Range ssRNA Ladder	N0364S	25 gel lanes	¥699
	RNA Loading Dye (2X)	B0363S	4.0 ml	¥539
	ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit	E6560L	150 rxns	¥4,799
		E6560S	30 rxns	¥1,199
	ProtoScript® II Reverse Transcriptase	M0368X	40,0000 units	¥4,609
		M0368L	10,000 units	¥1,279
		M0368S	4,000 units	¥639

## 4 基因编辑突变检测产品 7 折惊喜优惠

NEB 最新推出的 EnGen™ 突变检测试剂盒, 为检测基因编辑效率提供一整套的试剂( 详情请见 5 页 )。此外, 使用推荐的 DNA ladder 和凝胶上样染料, 不会在凝胶成像时出现紫外阴影, 条带更亮更清晰, 是您实验的不二之选。

产品名称	货号	规格	目录价 (元)	促销价 (元)
EnGen™ Mutation Detection Kit	E3321S	25 rxns	¥2,399	¥1,679
T7 Endonuclease I	M0302L	1,250 units	¥3,099	¥2,169
	M0302S	250 units	¥779	¥545
Quick-Load® Purple 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	N0550S	250 gel lanes	¥829	¥580
Gel Loading Dye, Purple (6X),No SDS	B7025S	4.0 ml	¥479	¥335



## 5 Monarch™ 新品上市 6.5 折起，全自动晴雨伞免费送

NEB 全新质粒小提、PCR&DNA 纯化和胶回收试剂盒，超高性价比，优秀的实验表现，独特的环保设计，诚意满满，不妨一试。买 S 包装试剂盒还有全自动 Monarch 晴雨伞相赠。

产品名称	货号	规格	目录价 (元)	促销价 (元)
Monarch™ Plasmid Miniprep Kit	T1010S	50 preps	¥959	¥719 送 Monarch 晴雨伞
	T1010L	250 preps	¥4,099	¥2,664
Monarch™ DNA Gel Extraction Kit	T1020S	50 preps	¥1,039	¥779 送 Monarch 晴雨伞
	T1020L	250 preps	¥4,859	¥3,158
Monarch™ PCR & DNA Cleanup Kit	T1030S	50 preps	¥1,099	¥824 送 Monarch 晴雨伞
	T1030L	250 preps	¥5,149	¥3,347

## 6 购买 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®, 接头引物试剂盒免费送

全新升级的 NEBNext Ultra II DNA 文库制备试剂盒，更低的起始量，更少的循环数，更高的文库产量带来前所未有的优秀表现。

产品名称	货号	规格	目录价 (元)	促销活动
NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®	Z1621L*	96 reactions	¥25,959	赠送接头引物
NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)			¥4,629	
NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®	Z1621S*	24 reactions	¥6,789	赠送接头引物
NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1)			¥1,269	

\* 请按促销货号下单参与活动



## 经典回顾

# 最值得信赖的 NEB 克隆与合成生物学产品

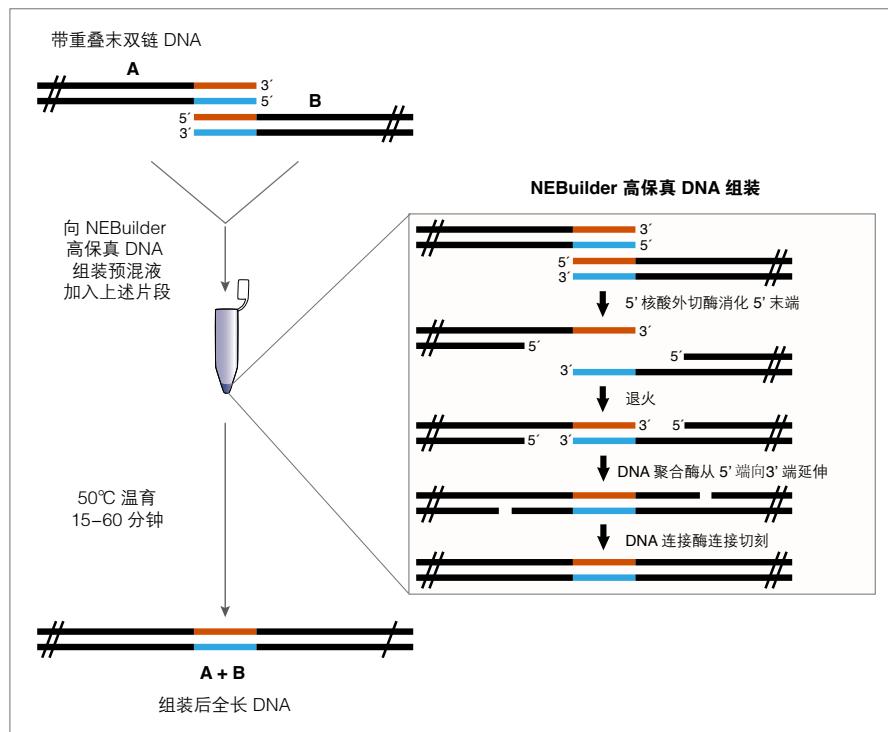
分子生物学作为研究和发展的基础学科，已经延伸到基因编辑和合成生物学领域。创新性克隆技术的应用是这些发展的核心部分。

超过 40 年历史的 NEB 以值得信赖的产品和服务，为科研团队提供多种领先的 DNA 组装和克隆工具。

## NEBuilder® 高保真 DNA 组装预混液

NEBuilder 高保真 DNA 组装预混液可以高效、准确的组装 DNA 片段。不管片段的长度和末端配性如何，该方法均可实现多片段无缝组装。还可以组装单链寡核苷酸或含 15-80 bp 重叠区的不同片段长度的 DNA 片段。主要用于合成生物学和多片段的一步克隆，该产品操作简单、灵活，以预混液形式提供。

### NEBuilder 高保真 DNA 克隆组装方法流程



注：NEB 同时亦提供 Gibson 组装® 预混液。

## 四大理由选择 NEBuilder HiFi

### 1 省时

15 分钟内完成简单快速的无缝克隆

### 2 灵活

可用于“标准长度”片段和大片段的组装，片段最多可达 12 个

### 3 兼容

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

### 4 适用性强

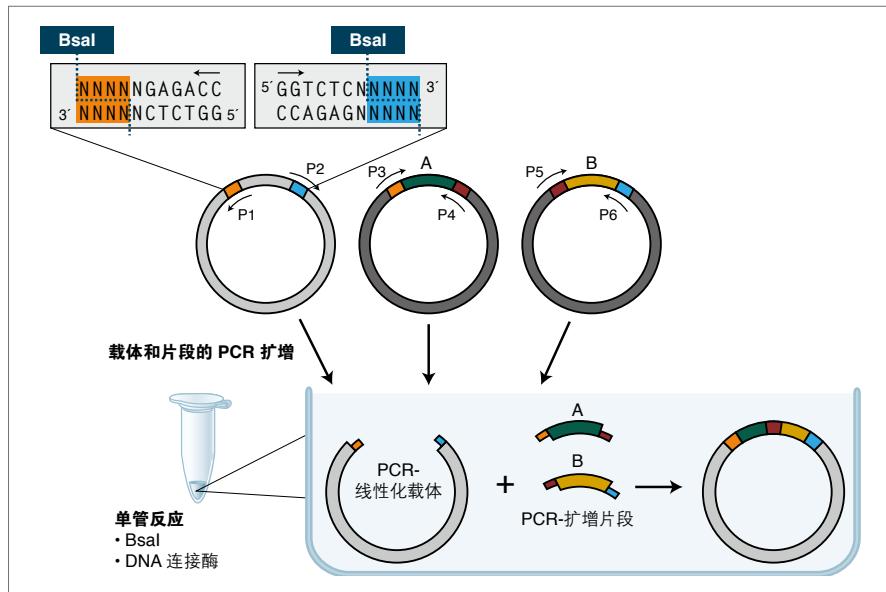
适用于各种 DNA 改造，包括定点突变

### 比 Gibson Assembly 性能更优越：

- 克隆后保真度高、正确率高，无需反复筛选、测序
- DNA 片段连接效率高，无论更低起始量还是更长片段
- 可连续克隆，无需考虑片段末端内切酶位点是否匹配
- 快速构建 DNA 片段，用合成的单链 DNA 寡聚核苷酸桥式连接两个双链 DNA 片段（如接头插入或 gRNA 文库）
- 不同克隆系统转换方便，NEBuilder HiFi 与 Gibson 及其它系统兼容
- 无使用许可费

## NEB Golden Gate 组装混合液

Golden Gate 可高效、无痕的克隆组装 DNA 片段，使用 IIS 型限制性内切酶和 T4 连接酶顺序或同时将多个目的基因插入到同一个载体骨架上。这类核酸内切酶产生用户确定的、唯一的末端序列，在识别位点之外进行切割。产生可连接的 DNA 突出末端，临近的互补 DNA 末端退火。一旦组装上，结构中内切酶的识别位点已经不存在。因为每一个互补可连接的 4 碱基突出端都是钝端（内切酶识别位点已经不存在），目的组装产物随时间逐渐积累。特别适用于多重组装实验 TALENs、Golden Gate 方法。也适用于单一目的基因的克隆实验。



## NEB PCR 克隆试剂盒

试剂盒提供优化的 2X 克隆预混液（其中配有独特的连接增强剂）和线性载体。该线性载体利用最新技术抑制背景菌落生长，使背景值降为最低。本试剂盒能简单、快速克隆各种 PCR 产物。具有校读功能的聚合酶产生平末端扩增子，无校对功能的聚合酶产生单碱基突出末端的扩增子。2X 克隆预混液中包含有末端修复成份，可在连接反应步骤前进行末端平齐化。因此，无论扩增子是何种末端都能完成有效连接。此外，使用本试剂盒，PCR 产物无需纯化，PCR 引物也无需经过 5' 磷酸基修饰。

### 优势：

- 无痕克隆 - 组装后无额外碱基存在
- 可用于组装重复区
- 兼容片段长度范围广（< 100 bp 至 > 15 kb）
- 有效组装高 GC 区

Golden Gate 组装需要需要 IIS 型内切酶识别位点，图例中为 BsaI (GGTCTC) 加在双链 DNA 片段末端。然后在识别序列外酶切，每个片段产生 4 碱基突出末端，直接用于组装。

## NEB Golden Gate Assembly Tool

为加快您的实验进程，请登陆 [GoldenGate.neb.com](http://GoldenGate.neb.com) 使用设计软件。

### 优势：

- 单克隆所有类型的 PCR 产物更为简单，包括平末端和 TA 末端
- 克隆速度快，连接仅需 5 分钟
- 筛选简单，几乎没有克隆背景，不需要蓝白斑筛选
- 无需纯化步骤，节约时间
- 两侧的限制性内切酶酶切位点方便亚克隆，包含两种单酶切选择

## 订购信息

产品名称	货号	规格
NEBuilder® 高保真 DNA 组装预混液	E2621S/L/X	10/50/250 rxns
Gibson 组装® 预混液	E2611S/L	10/50 rxns
NEB Golden Gate 组装混合液	E1600S	15 rxns
NEB PCR 克隆试剂盒（无感受态细胞）	E1202S	20 rxns



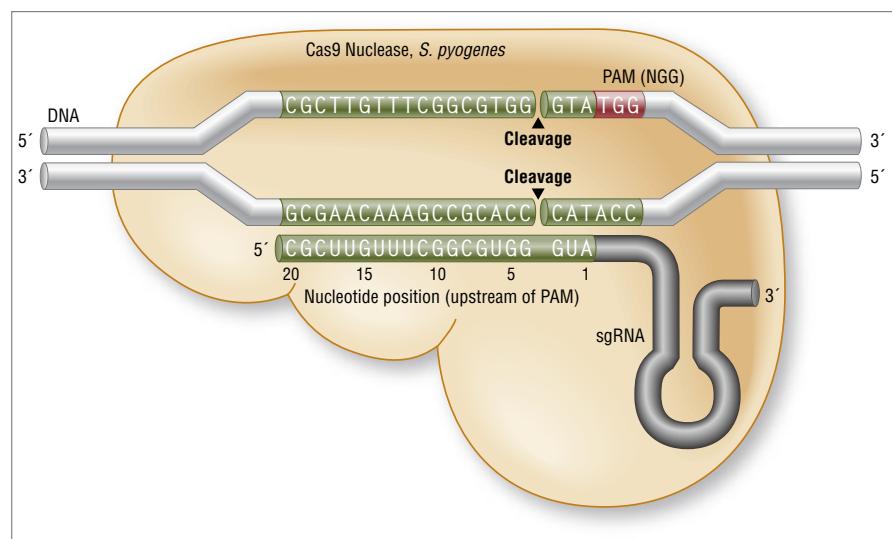
## 特别推荐

## NEB Cas9 核酸酶

Cas9 核酸酶是一种双链 DNA 核酸酶，是 CRISPR 免疫反应中的关键组分。在细菌和古细菌中，CRISPR/Cas9 系统是抵御外源 DNA 侵入的保护性免疫系统。基因组中的 CRISPR 位点转录形成 CRISPR RNA (crRNA)，与反式作用 CRISPR RNA (tracrRNA) 融合形成向导 RNA (gRNA)。在向导 RNA 的引导下，Cas9核酸酶可在 crRNA 引导序列靶定位点切断双链 DNA。

Cas9 核酸酶可作为一种有力的基因组编辑工具，其中一个最重要的优势是 Cas9 蛋白几乎可以在不同的 gRNA 引导下靶向任意的基因组位点。研究人员可灵活的、特异性的通过体外实验在 ~20 bp 识别序列的位置切断 DNA 双链。在细胞和动物实验中，基因编辑的核心原件—Cas9 核酸酶和向导 RNA (通常为single-guided RNA, sgRNA) 可通过以下三种途径获得：DNA 质粒/病毒编码有 Cas9 核酸酶和 sgRNA；RNA 编码有 Cas9 核酸酶和 sgRNA；直接使用 RNA 介导的 Cas9 核酸酶。目标双链 DNA 断裂后，修复机制启动，细胞的非同源末端连接修复机制 (NHEJ) 重新连接断裂处的基因组 DNA，并引入插入或缺失突变。另外一种修复机制是同源重组修复 (HDR)，需要有 HDR 模板参与，在断裂处插入或替换基因片段。

### Cas9 核酸酶, *S. pyogenes* 序列识别和 DNA 剪切机制



## 订购信息

产品名称	货号	规格
Cas9 核酸酶, <i>S. pyogenes</i>	M0386S/T/L/M	70 pmol/ 300 pmol/ 350 pmol/ 600 pmol
Cas9 核酸酶 NLS, <i>S. pyogenes</i>	M0641S/T/L/M	70 pmol/ 300 pmol/ 350 pmol/ 600 pmol

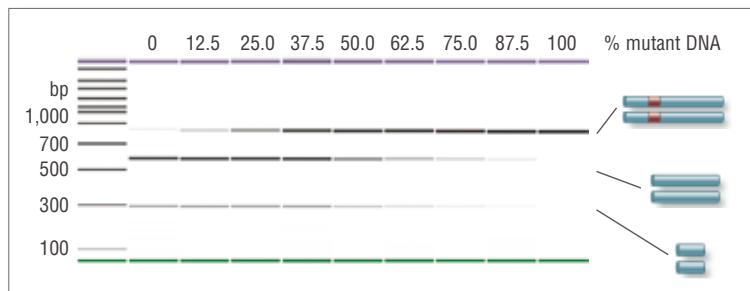
技术贴士：

## 使用重组 Cas9 核酸酶进行基因编辑实验中位点修饰效率的评估

### 简介：

使用 Cas9 核酸酶切割 PCR 扩增子，可以非常灵敏的检测特定位点的 InDels(插入缺失)突变。与常规的错配酶法检测不同，Cas9 的一个额外优势是能检测靶向效率高于 50% 的情况。特别适用于以下情况：高效率的基因编辑、在细胞菌落或组织中检测等位基因编辑效率。而在此方法前，编辑效率的检测只能依靠特定的 PCR 或者扩增子测序才能实现。

### 通过 Cas9 酶切产物分析估算基因位点靶向修饰的效率



将野生型和突变体 PCR 扩增子混合后，用 Cas9 核酸酶进行酶切。突变体与野生型相比有 10bp 的插入突变。设计 sgRNA 引导 Cas9 核酸酶切割 wt 区域。反应产物在 Agilent 2100 分析仪上使用 DNA 12000 试剂进行分析。

### PCR 操作步骤

- 以 100 ng 基因组 DNA (gDNA) 为模板，建立 50  $\mu$ L PCR 反应体系。每一个扩增子用以下模板建立 3 个对照体系：
  - 来源于靶细胞的 gDNA (如，转染 Cas9 或 TALEN 的细胞)
  - 来源于阴性对照细胞的 gDNA (如，转染非异性 DNA 的细胞)
  - 水 (如，无模板对照)

组分	50 $\mu$ L 反应体系	终浓度
Q5 热启动超保真 2X Master Mix (NEB #M0494)	25 $\mu$ L	1X
10 $\mu$ M 正向引物	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
10 $\mu$ M 反向引物	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
DNA 模板	变量	~100 ng
无核酸酶水	补充至 50 $\mu$ L	-

- 混匀反应体系，必要时短暂离心。开始 PCR 循环。

步骤	温度 (°C)	时间
预变性	98	30 秒
	98	5 秒
35 循环	*50-72	10 秒
	72	20 秒
最终延伸	72	2 分钟
保持	4	-

\* 强烈推荐使用 NEB 的 Tm 计算器 (TmCalculator.neb.com) 进行退火温度计算

- 取少量 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测片段是否正确。

- 通过 Qubit® 荧光定量试验或其他相关系统测得 PCR 产物的浓度。产量需大于 25 ng DNA/ $\mu$ L。

### sgRNA 介导的 Cas9 酶切反应

- 预混 sgRNA / Cas9 核酸酶：

组分	20 $\mu$ L 反应体系
10X Cas9 核酸酶反应缓冲液	2 $\mu$ L
sgRNA (1 $\mu$ M)	2 $\mu$ L (100 nM 终浓度)
Cas9 核酸酶, <i>S.pyogenes</i> (1 $\mu$ M)	2 $\mu$ L (100 nM 终浓度)
无核酸酶水	14-x $\mu$ L
孵育时间 & 温度	室温, 5-10 分钟

- 酶切 PCR 产物：

组分	20 $\mu$ L 反应体系
第 1 步反应终产物	20-X $\mu$ L
PCR 产物	X $\mu$ L (50-200 ng DNA) *
孵育时间 & 温度	37°C 30 分钟

\* 20  $\mu$ L 反应体系中，建议加入的 PCR 产物量 < 2  $\mu$ L

如产生了高背景或是非特异性产物，建议对酶切产物进行纯化。可选择使用 1  $\mu$ L 蛋白酶 K (NEB#P8107S, 分子生物学级) 37°C 消化 15-30 分钟，或者过柱纯化。

### 实验开始前：

- 强烈建议佩戴手套、使用无核酸酶的 EP 管和试剂，以避免 RNase 污染。更多信息，敬请参考 [www.neb.com/RibonucleaseContamination](http://www.neb.com/RibonucleaseContamination)
- 推荐反应体系是 20  $\mu$ L，可根据需要放大比例。建议使用无核酸酶微量离心管或者 PCR 排管。
- 请务必使 Cas9 酶和 sgRNA 与每个目标位点的摩尔比为或接近 10:10:1，以获得最佳切割效率。建议使用 NEBioCalculator ([nebiocalculator.neb.com](http://nebiocalculator.neb.com)) 计算最佳组分配比。
- 在冰上用无核酸酶水将 sgRNA 稀释至 1  $\mu$ M。

### 注意：

- 引物 - 设计合适的 PCR 引物，使 Cas9 酶的切割位点偏离扩增子的片段中心，以便产生大小不同的 DNA 片段。推荐使用 NEB Tm Calculator ([TmCalculator.neb.com](http://TmCalculator.neb.com)) 进行引物设计。
- sgRNA - sgRNA 的合成，建议使用 HiScribe T7 Quick High-Yield RNA Synthesis Kit (NEB#E2050S) 通过体外转录生成，或通过 RNA 真核苷酸合成。sgRNA 5' 端须含有一段 20 nt 的导向序列，与目标基因组位点中靠近靶位点的 PAM 序列共同决定靶向特异性。(1,2)

### 分析：

- 通过凝胶电泳或者其他分析方法分析被酶切的 PCR 产物
- 通过下列公式估算基因编辑效率：% 突变 =  $100 \times ( [ \text{未切割 DNA} ] / [ \text{未切割 DNA} ] + [ \text{片段 1} ] + [ \text{片段 2} ] )$

### References:

- Jinek et al. (2012) Science 337 (6096) 816-821.
- Larson et al. (2013) Nature Protocol (8) 2180-2196.



#### 美国

New England Biolabs, Inc.  
240 County Road  
Ipswich, MA 01938-2723  
Telephone (978) 927-5054  
Toll Free (USA Orders) 1-800-632-5227  
Toll Free (USA Tech) 1-800-632-7799  
Fax (978) 921-1350  
e-mail: info@neb.com www.neb.com

#### 加拿大

New England Biolabs, Ltd.  
Telephone (905) 665-4632  
Toll Free 1-800-387-1095  
Fax (905) 665-4635  
Fax Toll Free 1-800-563-3789  
e-mail: info.ca@neb.com  
www.neb.ca

#### 法国

New England Biolabs France  
Free Call 0800 100 632  
Free Fax 0800 100 610  
e-mail: info.fr@neb.com www.neb-online.fr

#### 德国 / 奥地利

New England Biolabs GmbH  
Telephone +49/(0)69/305 23140  
Free Call 0800/246 5227 (Germany)  
Free Call 00800/246 5227 (Austria)  
Fax +49/(0)69/305 23149  
Free Fax 0800/246 5229 (Germany)  
e-mail: info.de@neb.com  
www.neb-online.de

#### 日本

New England Biolabs Japan, Inc.  
Telephone +81 (0)3 5669 6191  
Fax +81 (0)3 5669 6192  
e-mail: info@neb-japan.com  
www.neb-jp.jp

#### 新加坡

New England Biolabs, Pte. Ltd.  
Telephone +65 6776 0903  
Fax +65 6778 9228  
e-mail: sales.sg@neb.com  
www.neb.sg

#### 英国

New England Biolabs (UK) Ltd.  
Telephone (01462) 420616  
Call Free 0800 318486  
Fax (01462) 421057  
Fax Free 0800 435682  
e-mail: info.uk@neb.com  
www.neb.uk.com



**Monarch™**  
新品上市 6.5 折起  
全自动晴雨伞免费送

NEB 近期将参加如下会议，期待届时与您交流：

#### 会议信息

#### 会议时间

#### 举办地

第十七届全国植物基因组学大会

8月19日-8月22日

福建福州

#### NEB 完美品质 成就科学梦想

NEB (北京) 100083 北京海淀区王庄路1号清华同方科技广场B座0612

客服热线: 400-811-2220 电话: 010-82378265/6 传真: 010-82378262

网站: www.neb-china.com 邮箱: info@neb-china.com

NEB 官方微信: NEBiolabs