

# NEBuilder<sup>®</sup> HiFi DNA Assembly

制限酵素で悩まない！  
簡単で高効率なシームレスクローニングを始めよう！



制限酵素  
不要

簡単

混ぜるだけ

時短

従来法の  
1/2以下

高効率

同等品の  
数倍以上

汎用性

8つのアプリ  
ケーション

NEBuilder サンプル配布中！

初めての方もお気軽にご相談・  
ご依頼ください。

[www.neb.com/NEBuilder-hifi](http://www.neb.com/NEBuilder-hifi)



 NEW ENGLAND  
**Biolabs**<sup>®</sup>

# NEBuilder HiFi DNA Assembly

## NEBuilder とは

NEBuilder HiFi DNA アッセムブリーは制限酵素を使わずに簡単・迅速に、しかも好きな位置にシームレスクローニングができる方法です。Gibson アッセムブリーのアップグレード版です。

方法はとても簡単で、ポジティブクローン取得率も高いため、クローニング時間を大幅に短縮できます。

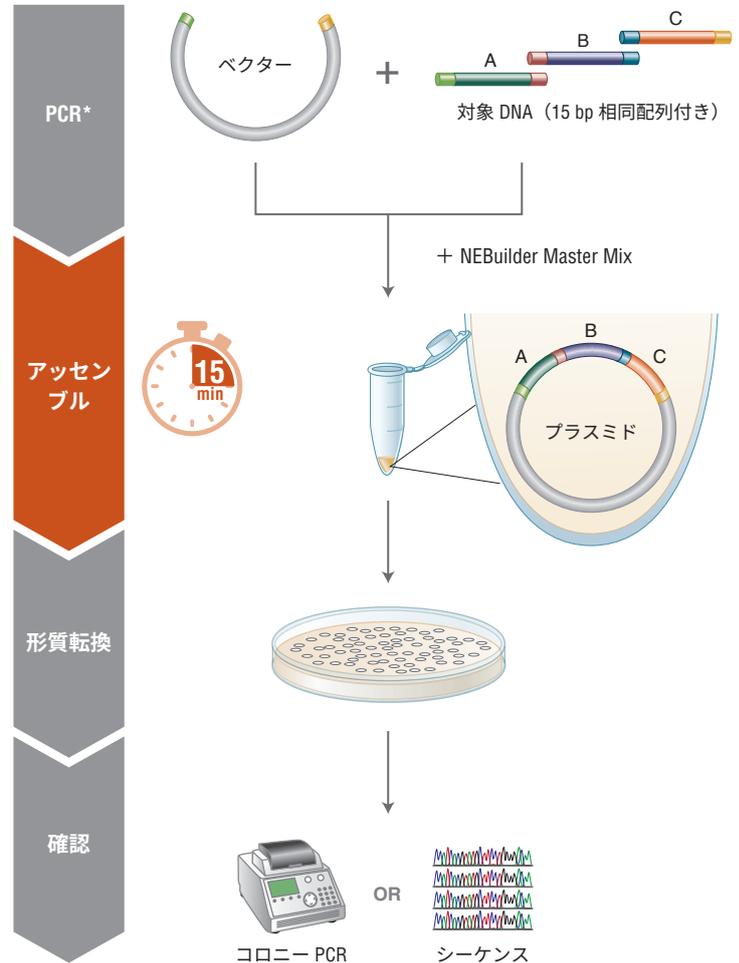
- 1) ベクターをインバース PCR で増幅\* (直鎖状化)
- 2) ベクターとの相同配列 (15 bp) を付加したプライマーを使って目的 DNA を PCR
- 3) これらと NEBuilder マスターミックスを混ぜて 15 分間反応
- 4) 形質転換

PCR の後にクリーンアップは不要、アッセムブ後はそのまま形質転換ができます。

もちろん制限酵素を使っても大丈夫、その際も不要な配列を削るのでシームレスクローニングが可能です。

さらに 1 本鎖 DNA とベクターのアッセムブや、複数断片のアッセムブ、変異導入、直鎖アッセムブも NEBuilder 1 つで対応可能！アプリケーション毎に製品を変える必要はありません。

\*ベクターはインバース PCR の他、制限酵素で直鎖状にしても可



## Point

シームレスクローニングとは・・・

### Traditional Cloning (制限酵素とリガーゼ)

目的 DNA

AATTC G CTGCA G

ベクター G CTTAA ACATC G

EcoRI 部位 PstI 部位

↓

GAATTC CTGCA G CTTAAG GACGTC

EcoRI 部位 PstI 部位

**制限酵素部位が残る！**

### Seamless Cloning (NEBuilder アッセムブリー)

相同配列 (15 bp) 目的 DNA 相同配列 (15 bp)

ベクター G CTTAA ACATC G

EcoRI 部位 PstI 部位

↓

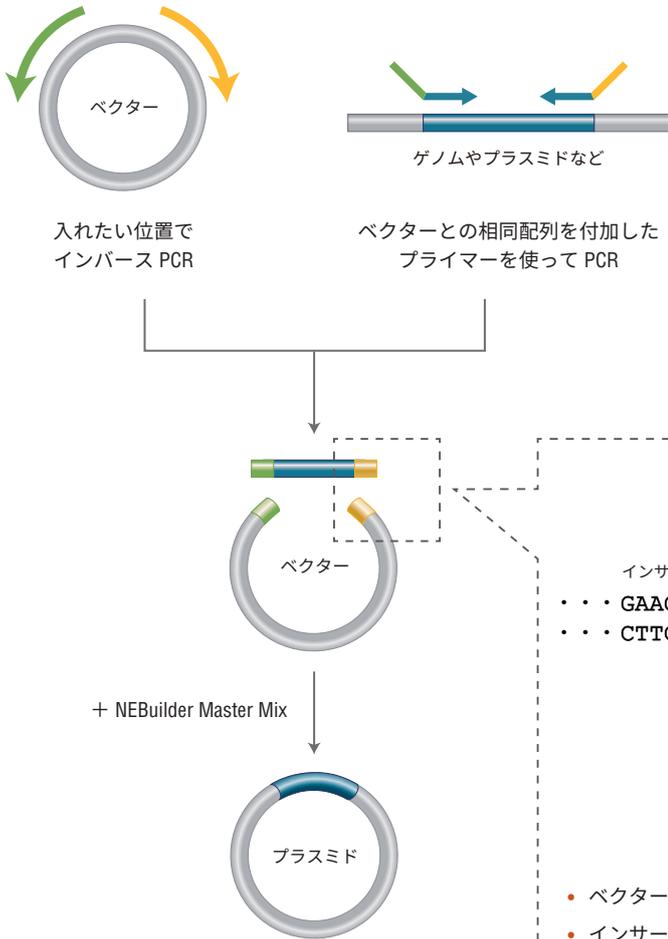
制限酵素部位は残らない！ = シームレス



# 制限酵素で悩まない！ 簡単で高効率なシームレスクローニングを始めよう！

## 特長 1

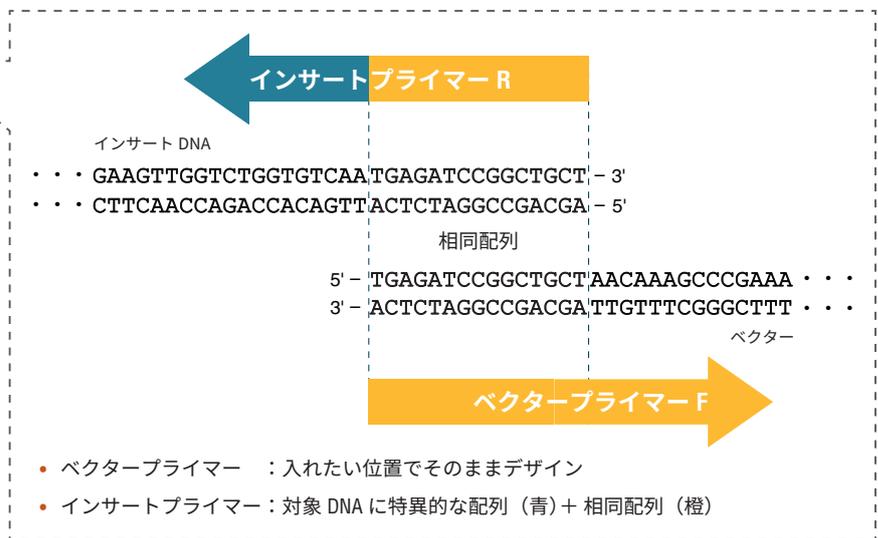
制限酵素を使わなくても、好きな位置にクローニングできる！



NEBuilder アッセムブリでは基本的にベクターをインバース PCR で直鎖状にするため、制限酵素サイトによらず、制限酵素を使わず、好きな位置に目的 DNA をクローニングできます。  
もちろん、制限酵素を使用しても大丈夫です（下記ポイント参照）。  
目的 DNA も PCR で増幅しますが、この際にベクターとの相同配列（15～30 bp）を付加したプライマーを使います。



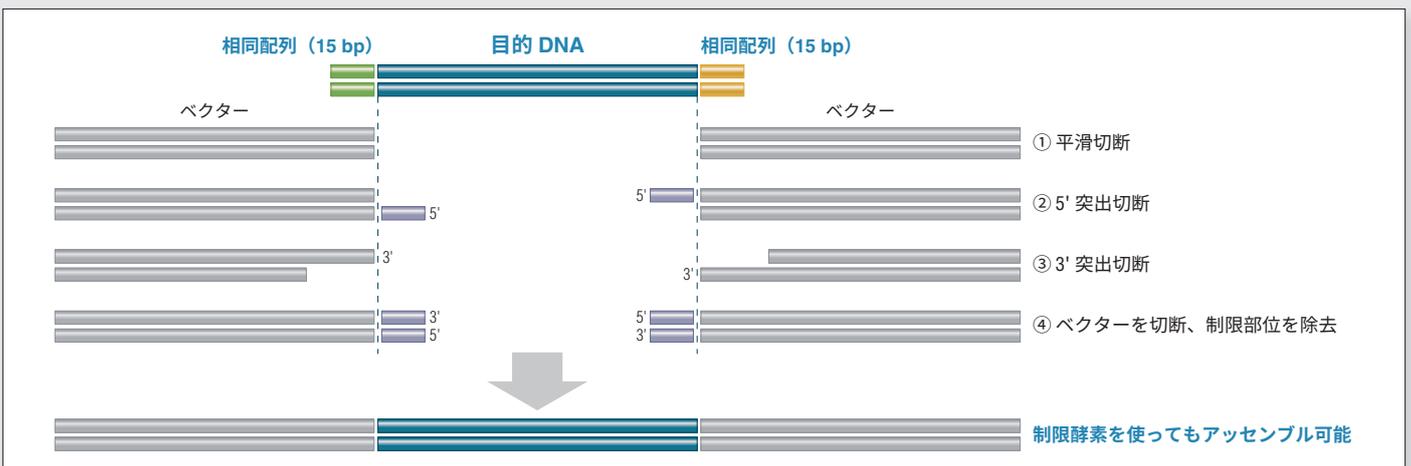
オンラインツールで楽々プライマー設計！  
[NEBuilder.neb.com](http://NEBuilder.neb.com)



## Point

### ベクターを制限酵素で切断しても OK！末端合わせに悩むことなくクローニング可能！

ベクターをインバース PCR ではなく、制限酵素で切断して直鎖状にしても大丈夫です。この場合、以下のように相同配列面（アッセムブル面）をベクターの 3' 面に合わせます（①、②、③）。さらに NEBuilder には余分なベクター末端配列を除去できる能力があるため、制限酵素サイトが消えるように相同配列を設計すれば、シームレスクローニングが可能で（④）。



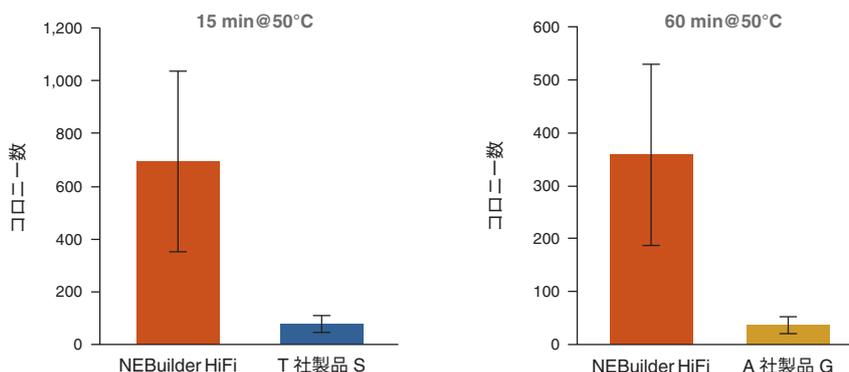
# NEBuilder HiFi DNA Assembly

## 特長 2

## Gibson や他社同等品よりも高効率

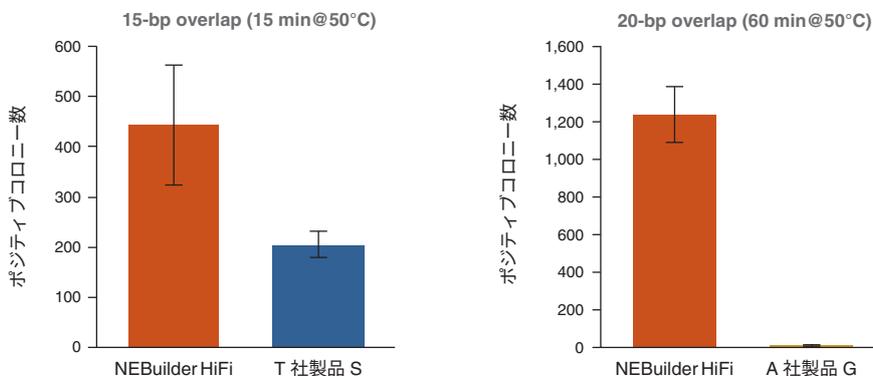
### 2断片のアッセムブル（ベクター + 1インサート）

最もシンプルなアッセムブルです。アッセムブル効率が高く、ニックがないコンストラクトを作成して形質転換できるため、より多くのコロニーが得られます。



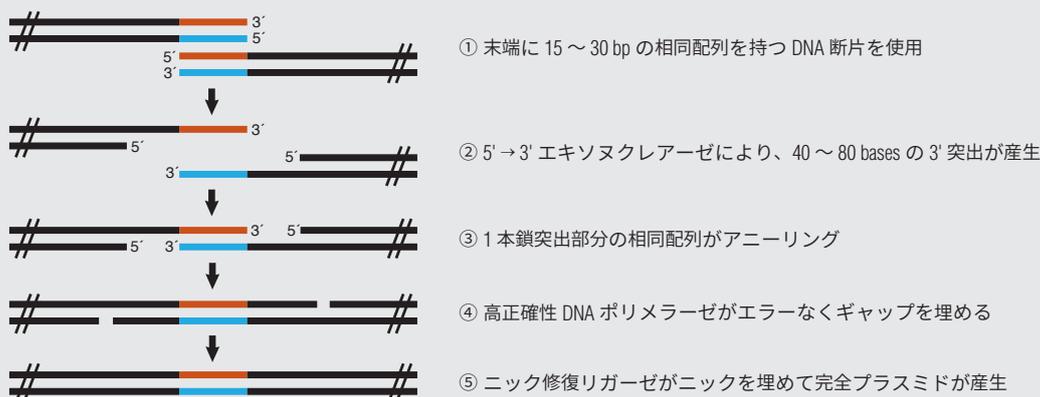
### 4断片アッセムブル（ベクター + 3インサート）

ベクターに3本のインサート DNA をアッセムブルした場合も高い効率でコンストラクトが作成できます。またポジティブクローンだけをカウントした下記図のように、ポジティブ取得率も高いことが特長です。



## NEBuilder アッセムブルの原理

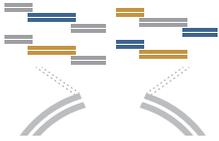
NEBuilder マスターミックスには3種類の酵素が含まれています。これらが同一溶液内で連続して反応することで、相同配列を介して2つの DNA 末端が完全に連結（アッセムブル）され、ニックがない完全な2本鎖 DNA が得られます。





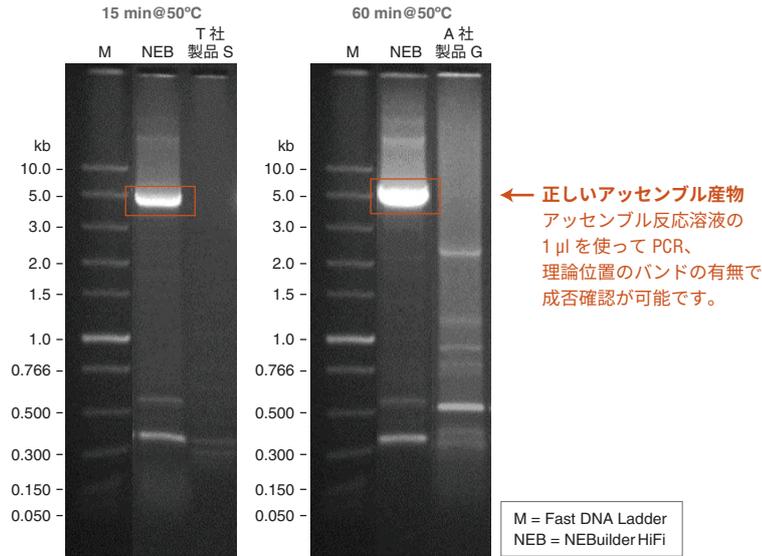
# 制限酵素で悩まない！ 簡単で高効率なシームレスクローニングを始めよう！

## 特長 3 複数断片もアッセンブル (> 12 断片)、ポジティブクローン取得率も高い！

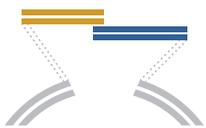


### 12断片アッセンブル (ベクター + 11 インサート)

NEBuilder はさらに多くの断片 (> 12 断片) をアッセンブルすることが可能です。さらに、形質転換の前にアッセンブル反応溶液の一部を使って PCR も可能、容易にアッセンブルの確認ができると共に、複数断片のポジティブ率が低いことも示されました。

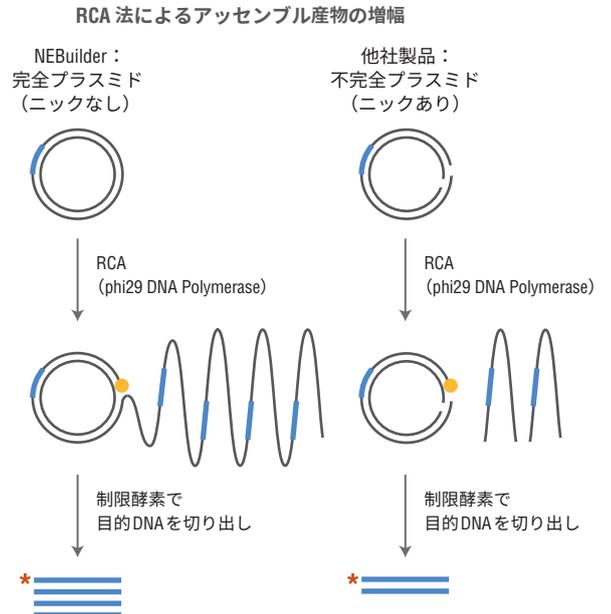
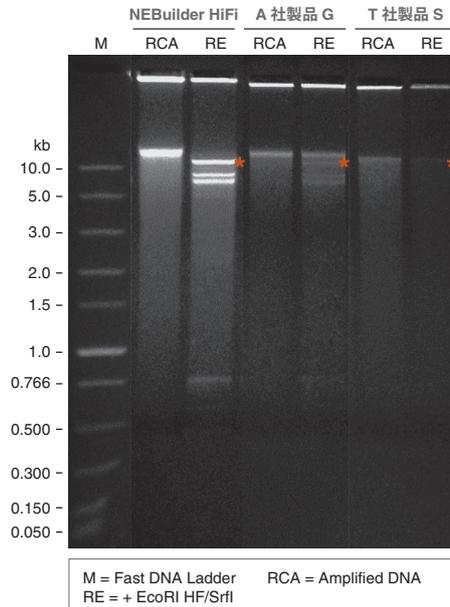


## 特長 4 大きなサイズ (20 kb) も、ニックがない完全プラスミドで作成可能！



### 3断片アッセンブル (ベクター + 2 インサート)、20 kb

NEBuilder は大きなプラスミドの作成も可能です。この場合、形質転換には NEB 10-beta Competent *E. coli* (NEB #C3019) をお勧めします。さらに、ニックがない完全プラスミドであるため、アッセンブル溶液をテンプレートとして PCR や RCA (Rolling Circle Amplification) が可能です。



# NEBuilder HiFi DNA Assembly

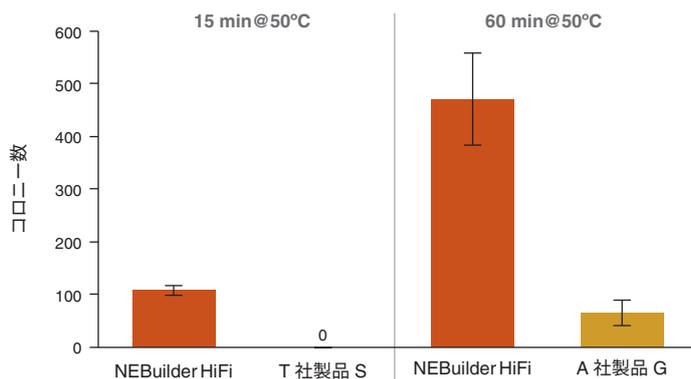
## 特長 5

## 1本鎖 DNA とベクターをアッセンブル

### ssDNA アッセンブル (1本鎖オリゴ + 2本鎖 DNA)

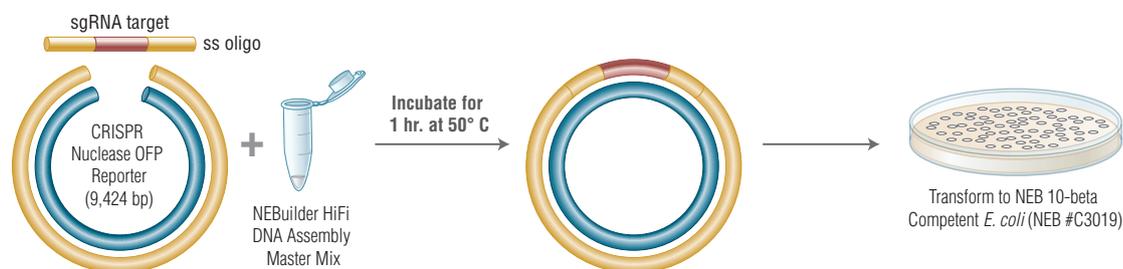


NEBuilder は 1 本鎖 DNA とベクターもアッセンブルできます。下記事例は 70 bases の 1 本鎖オリゴ DNA (5' 相同配列: 25 bases + インサート: 20 bases + 3' 相同配列: 25 bases) をアッセンブルした結果ですが、95%以上がポジティブクローンでした。1 本鎖 DNA アッセンブルの場合、相同配列を少し長く (> 25 bases) 付加しておくことがポイントです。



### 応用例: ゲノム編集用 sgRNA コンストラクトの作成

NEBuilder を使用すれば、CRISPR-Cas9 ゲノム編集用のガイド RNA (sgRNA) のコンストラクト作成が簡単にできます。実際に多くの方がこの方法を採用しています。



## NEB の推奨セット (標準的な形質転換用)

### DNA アッセムブリ試薬

- NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix

### コンピテントセル (形質転換用)

- NEB 5-alpha Competent *E. coli* (< 10 kb コンストラクト)  
または
- NEB 10-beta Competent *E. coli* (> 10 kb コンストラクト)  
または
- NEB Stable Competent *E. coli*  
(ウイルスベクターなど大型・不安定なコンストラクト)

※ NEBuilder Master Mix は NEB コンピテントセルに最適化

※ NEBuilder とコンピテントセルはセット品あり (E5520S, E2623S)

### PCR 用 DNA ポリメラーゼ (挿入配列増幅)

- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase  
※ 正確性と増幅性が高く、長い DNA も増幅可能

### 核酸精製 (形質転換後のプラスミド精製)

- Monarch Spin Plasmid Miniprep Kit  
※ 液残りを防ぐカラムを使用した製品

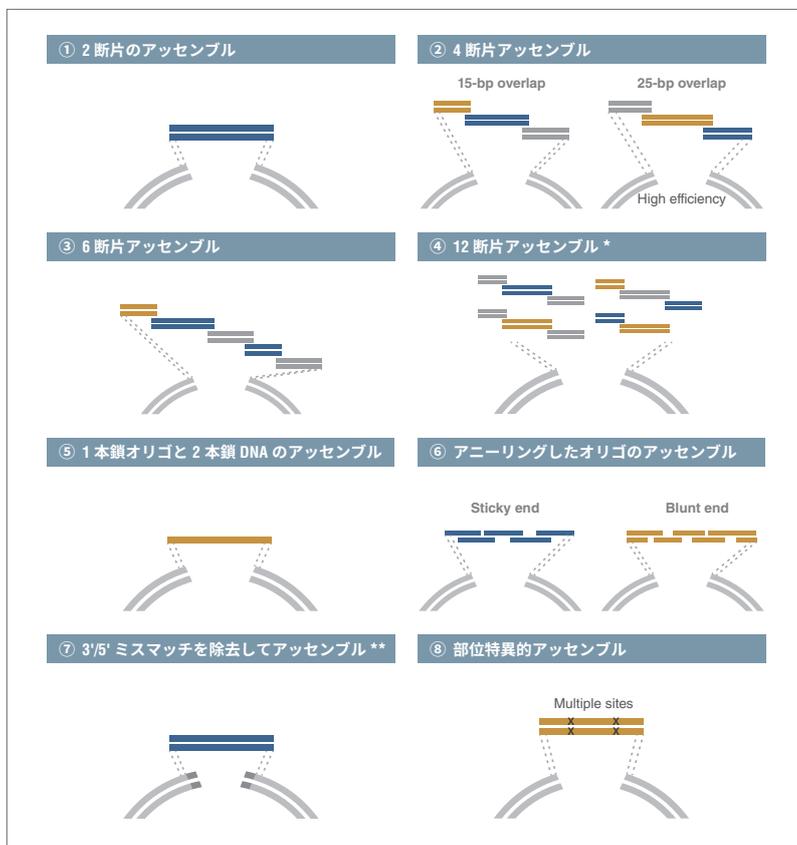
製品の選択に迷われたときは弊社テクニカルサポートまでご相談ください: [www.neb.com/techsupport](http://www.neb.com/techsupport)



# 制限酵素で悩まない！ 簡単で高効率なシームレスクローニングを始めよう！

## 特長 6

## 1 製品だけで様々なアプリケーションに対応！



\* ベクター + 11 インサート

\*\* ベクター末端に不要な配列がある場合、これを除去したアセンブルが可能 (< 10 bp)

- ① **2断片のアセンブル**：最もシンプルなアセンブルである。インサート DNA の両末端に 15 bp のベクターとの相同配列を入れておく。120 bp 以上のインサート長が必要である。
- ② **4断片アセンブル**：複数断片 (4断片) をアセンブルできる。それぞれの相同配列を付加しておく。
- ③ **6断片アセンブル**：複数断片 (6断片) をアセンブルできる。それぞれの相同配列を付加しておく。
- ④ **12断片アセンブル**：複数断片 (12断片) をアセンブルできる。それぞれの相同配列を付加しておく。
- ⑤ **1本鎖オリゴと2本鎖 DNA のアセンブル**：ベクターに1本鎖 DNA をアセンブルできる。この際、相同配列は 30 bp 以上と長くする。
- ⑥ **アニーリングしたオリゴのアセンブル**：複数の合成オリゴと2本鎖ベクターをアセンブルできる。オリゴはそれぞれがオーバーラップするように設計する。
- ⑦ **3'/5' ミスマッチを除去してアセンブル**：ベクター末端に余分な倍列があった場合、これを除去してアセンブルできる (< 10 bp)。インサート DNA に付加する相同配列を設計するときに、余分な配列をスキップしておく。
- ⑧ **部位特異的アセンブル**：インサート DNA を PCR 増幅する際、プライマーの特異的配列部分に変異を入れておけば、それを反映した組換え DNA が作出できる。

## FAQ

- 1 **NEBuilder と他社同等品キットは何が違うのですか？**  
アセンブル効率が高いこと、1本鎖 DNA とベクターの連結や 5'/3' ミスマッチ除去など様々なことができる点が異なります。またアセンブル面にはニックが入らないため、完全プラスミドができることも NEBuilder の特長です。
- 2 **NEBuilder と Gibson は何が違うのですか？**  
一言で言えば NEBuilder は Gibson のアップデート版です。アセンブル効率、5'/3' ミスマッチ除去効率、1本鎖 DNA アセンブル効率が向上しました。また NEBuilder はライセンスフリーです。
- 3 **インサート DNA の長さに制限はありますか？**  
ほとんど制限はありませんが、インサートサイズ (相同配列含む) の長さに応じて調製方法を変えます。  
  - > 120 bp : PCR で調製
  - < 120 bp : 1本鎖オリゴ DNA を合成
  - 大きなインサート : > 2領域に分けて PCR で調製
- 4 **アセンブル面にエラーが入りやすいと聞いたのですが・・・？**  
大丈夫です！ Gibson (NEB #E2611) ではエラーが入ることがありましたが、NEBuilder では高正確性 DNA ポリメラーゼの採用により正確性が大きく向上、エラーが入る心配がなくなりました。

## NEBuilder サンプル配布中！

初めての方もお気軽にご相談・  
ご依頼ください。

[www.neb.com/NEBuilder-hifi](http://www.neb.com/NEBuilder-hifi)



## 価格情報

これさえあれば大丈夫！基本フォーマット

**NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix**

#E2621S... 10回

#E2621L... 50回

#E2621X...250回

コンピテントセル付き、< 10 kb のコンストラクトにお薦め

**NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit**

#E5520S... 10回

コンピテントセル付き、> 10 kb のコンストラクトにお薦め

**NEBuilder HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments**

#E2623S... 20回

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



One or more of these products are covered by patents, trademarks and/or copyrights owned or controlled by New England Biolabs, Inc. For more information, please email us at [busdev@neb.com](mailto:busdev@neb.com). The use of these products may require you to obtain additional third party intellectual property rights for certain applications.

Your purchase, acceptance, and/or payment of and for NEB's products is pursuant to NEB's Terms of Sale at [www.neb.com/support/terms-of-sale](http://www.neb.com/support/terms-of-sale). NEB does not agree to and is not bound by any other terms or conditions, unless those terms and conditions have been expressly agreed to in writing by a duly authorized officer of NEB.

NEB<sup>®</sup>、NEBuilder<sup>®</sup> は、New England Biolabs, Inc. の商標または登録商標です。

© Copyright 2025, New England Biolabs, Inc.; all rights reserved.



ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社

〒130-0022 東京都墨田区江東橋 2-2-3

カスタマーサービス TEL : 03-4545-1421 FAX : 03-5669-6194

テクニカルサポート TEL : 03-4545-1420 Email : [tech.jp@neb.com](mailto:tech.jp@neb.com)

ウェブサイト : [www.neb.com](http://www.neb.com)