

LightNing™ BstEII

REF: EG15528S

5'...G↓GTNACC...3'
3'...CCANTG▲G...5'

同裂酶: BstPI, Eco91I, EcoO65I, PspEI

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。

储运条件

-20°C

产品组成

| 组分 | 规格 |
|--------------------------|--------|
| LightNing™ BstEII | 100 µl |
| 10× CutOne™ Buffer | 1 ml |
| 10× CutOne™ Color Buffer | 1 ml |

产品简介

LightNing™ 快速内切酶是一系列经过基因工程重组的快速限制性内切酶, 适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。所有 LightNing™ 快速内切酶在通用的 CutOne™ 或 CutOne™ Color Buffer 中都具有优良的活性, 能够在 5~15 分钟内完成酶切。此外, 百时美去磷酸化、连接试剂在 CutOne™ Buffer 中均具有 100% 活性, 支持一管化反应, 提升“酶切 - 修饰 - 连接”的体验。

CutOne™ Color Buffer 包括红色和黄色示踪染料, 可将产物直接用于凝胶电泳。CutOne™ Color Buffer 的红色染料与 2500 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近; 黄色染料与 10 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近。

建议的反应条件

1× CutOne™ 缓冲液;

37°C 温育;

参照“DNA 快速酶切流程”配制反应体系。

失活条件

80°C 温育 20 min。

质量控制

功能活性检测

37°C 下, 在 20 µl 通用 CutOne™ 反应体系中, 1 µl LightNing™ BstEII 能够在 15 min 内完全消化 1 µg λDNA。

超长时间温育检测

37°C 下, 在 20 µl 通用 CutOne™ 反应体系中, 将 1 µl LightNing™ BstEII 与 1 µg λDNA 共同温育 3 h, 未检测到其他核酸酶污染或星号活性引起的底物非特异性降解。更长时间酶切可能出现星号活性。

酶切 - 连接 - 再酶切检测

37°C 下, 使用 10 倍酶量的 LightNing™ BstEII 消化 DNA 底物, 回收酶切产物, 在 22°C 下使用 T4 DNA Ligase (Fast) 可以将超过 95% 的酶切产物重新连接。将连接产物再次回收后, 使用相同的内切酶可以重新切开 95% 以上的连接产物。

非特异性内切酶活性检测

37°C 下, 在 20 µl 通用 CutOne™ 反应体系中将 1 µl LightNing™ BstEII 与 1 µg 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

图标注释

- 快速内切酶, 可在 5~15 min 内完成反应
- 最适反应温度为 37°C
- 对于被 EcoKI 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
- 对于被 EcoBI 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
- 失活条件为 80°C 温育 20 min
- 3 h 温育未表现星号活性, 延时酶切可能出现星号活性

使用方法

1. DNA 快速酶切流程

① 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

| | 质粒 DNA | PCR 产物 | 基因组 DNA |
|---|-------------------|-------------------|--------------|
| ddH ₂ O | 15 µl | 16 µl | 30 µl |
| 10× CutOne™ Buffer 或 10× CutOne™ Color Buffer | 2 µl | 3 µl ^a | 5 µl |
| 底物 DNA | 2 µl (up to 1 µg) | 10 µl (~0.2 µg) | 10 µl (5 µg) |
| LightNing™ BstEII | 1 µl | 1 µl | 5 µl |
| Total | 20 µl | 30 µl | 50 µl |

a. 本体系适用于经过纯化的 PCR 产物酶切。未纯化的 PCR 产物具备一定的离子强度，10× CutOne™ Buffer 加入量可适当减少至 2 µl。但由于 DNA 聚合酶同时具有外切酶活性，会影响酶切产物，因此如下一步需进行克隆等操作，建议酶切前对 PCR 产物进行纯化。

- ② 轻柔吸打或轻弹管壁以混匀（切勿涡旋），然后瞬时离心以收集挂壁液滴；
- ③ 37°C 温育 15 min（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）；
- ④ 80°C 温育 20 min 即可使酶失活，停止反应（可选）；
- ⑤ 如果使用 CutOne™ Color Buffer 进行酶切反应，得到的产物可以直接进行上样电泳。

2. 双酶切或多酶切

- ① 每种快速内切酶的用量为 1 µl，并根据需要适当扩大反应体系；
- ② 所有快速内切酶的体积总和不得超过总反应体系的 1/10；
- ③ 如果所用的几种快速内切酶的最适反应温度不同，应先以最适温度低的酶开始酶切，再添加最适温度较高的酶，在其最适反应温度下进行酶切反应；

3. 适用于质粒的扩大反应体系

| | 1 µg | 2 µg | 3 µg | 4 µg | 5 µg |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| DNA | 1 µg | 2 µg | 3 µg | 4 µg | 5 µg |
| LightNing™ BstEII | 1 µl | 2 µl | 3 µl | 4 µl | 5 µl |
| 10× CutOne™ Buffer 或 10× CutOne™ Color Buffer | 2 µl | 2 µl | 3 µl | 4 µl | 5 µl |
| Total | 20 µl | 20 µl | 30 µl | 40 µl | 50 µl |

注：如果总反应体系大于 20 µl，应适当增加温育时间，尽量使用水浴、金属浴或沙浴。

不同 DNA 中的酶切位点数量

| λDNA | ΦX174 | pBR322 | pUC57 | pUC18/19 | SV40 | M13mp18/19 | Adeno2 |
|------|-------|--------|-------|----------|------|------------|--------|
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |

甲基化修饰影响

| Dam | Dcm | CpG | EcoKI | EcoBI |
|-----|-----|-----|-------|-------|
| 无影响 | 无影响 | 无影响 | 剪切受影响 | 剪切受影响 |

在不同反应缓冲液中的活性

| | CutOne™ Buffer | Thermo Scientific FastDigest Buffer | NEB CutSmart® Buffer | Takara QuickCut™ Buffer |
|----|----------------|--|-------------------------|----------------------------|
| 活性 | 100% | 75% | 100% | 75% |

注：活性数据来自百时美限制酶标准反应体系下的检测。

DNA 修饰酶在 CutOne™ Buffer 和 CutOne™ Color Buffer 中的活性

| | |
|--------------------------------------|------|
| EG15208S Alkaline Phosphatase (Fast) | 100% |
| EG15205S T4 DNA Ligase (Fast) | 100% |

注：活性数据来自百时美标准反应体系下的检测；T4 DNA Ligase(Fast) 需要 ATP 作为辅助因子。