

LightNing® FokI

REF: EG24523S

5'...G G A T G (N)₉...3'
3'...C C T A C (N)₁₃...5'



同裂酶: BstF5I, BtsCI, BseGI

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® FokI	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® FokI 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® FokI 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® FokI 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。

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 Dcm 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
-  对于被 CpG 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, 更长时间酶切可能出现星号活性

注意事项

1. 通过在切割序列中构建一对互补的寡核苷酸, FokI 可以在任意两个核苷酸之间进行切割;
2. 酶切需要两个或两个以上识别位点;
3. 甘油浓度 >5% 条件下可能出现星号活性。

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 [®] FokI	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，应首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 [®] FokI	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，应当适当增加温育时间，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
150	8	12	5	5	11	4	78

甲基化修饰影响

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

在不同反应缓冲液中的活性

	CutOne [®] Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB rCutSmart [™] Buffer	Takara QuickCut [™] Buffer
活性	100%	50%	100%	50%

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。