

版本号: M16B01V1.0



# AvrII

TEL: 400-999-6126

目录号: RK21119

WEB: www.abclonal.com.cn

规格: 100 U / 500 U

浓度: 5,000 U/mL

产品组成:

|                    |         |
|--------------------|---------|
| AvrII (5,000 U/mL) | RM21620 |
| 10X Buffer CutS    | RM20103 |

## 甲基化敏感性

|         |     |
|---------|-----|
| dam 甲基化 | 不敏感 |
| dcm 甲基化 | 不敏感 |
| CpG 甲基化 | 不敏感 |

## 产品说明

识别位点



## 活性定义

1 活性单位 (U) 是指在 50  $\mu$ L 反应体系中, 37°C 1 hr 内完全酶切 1  $\mu$ g  $\lambda$  DNA 所需的酶量。

## 酶存储液

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 500  $\mu$ g/mL BSA, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C

## 保存温度

-20°C

## 酶切反应条件

1X Buffer CutS, 37°C 反应

## 1X Buffer CutS 组成

50 mM KAc, 20 mM Tris-HAc, 10 mM MgAc<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/mL BSA, pH 7.9 @ 25°C

## 快切

是, 在推荐反应体系下孵育 5-15 min 可完全酶切底物

## 在 ABclonal 反应缓冲液中的活性

| CutA | CutB | CutC | CutS |
|------|------|------|------|
| 100% | 50%  | 50%  | 100% |

## 热失活

否

## 操作说明

推荐的 AvrII 酶切反应体系(以 50  $\mu$ L 体系为例)

| 组分                 | 加入量              |
|--------------------|------------------|
| ddH <sub>2</sub> O | Up to 50 $\mu$ L |
| 10X Buffer CutS    | 5 $\mu$ L        |
| DNA*               | 1 $\mu$ g        |
| AvrII**            | 1 $\mu$ L        |

\*,注: DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐, 否则将会影响限制性内切酶活性。

\*\*,注: 在 50  $\mu$ L 反应体系中, 0.5  $\mu$ L 的 AvrII 酶可以完全酶切 1  $\mu$ g 的 DNA 底物, 但一般推荐使用 1  $\mu$ L。

- ◆ 37°C 孵育 5-15 min 可以完全酶切 DNA 底物。
- ◆ 酶切产生 5'-CTAG 粘性末端, 可以与 NheI、SpeI 或 XbaI 的酶切产物有效连接。
- ◆ 对于不能热失活的限制性内切酶, 推荐对酶切后的产物进行纯化。

## 质量控制

- ◆ SDS-PAGE 检测蛋白纯度大于 95%。
- ◆ 无核酸外切酶和核酸酶污染。
- ◆ PCR 检测无宿主基因组残留。

## 优化的限制性内切酶反应

限制性内切酶反应需要注意许多关键因素:合适的 DNA 底物量、合适的内切酶和反应缓冲液可以达到最佳的酶切反应; 50  $\mu\text{L}$  反应体系中 1 U 的限制性内切酶在推荐条件下孵育 1 hr 可以完全酶切 1  $\mu\text{g}$  DNA 底物; 在酶切反应中, 酶:DNA:反应体系的体积比可以作为指导; 大多数研究者可按下面所示“推荐的限制性内切酶酶切反应体系”进行实验, 对不同来源、质量和纯度的 DNA 样品, 推荐使用 5-10 倍的内切酶进行过度酶切反应。

推荐的限制性内切酶酶切反应体系

| 限制性内切酶           | 0.5 $\mu\text{L}$ 是充足的, 一般使用 1 $\mu\text{L}$ |
|------------------|--|
| DNA 底物           | 1 $\mu\text{g}$                              |
| 10X ABclonal 缓冲液 | 5 $\mu\text{L}$                              |
| 总体积              | 50 $\mu\text{L}$                             |
| 孵育时间             | 1 hr*  |
| 孵育温度             | 根据最适酶切温度而定                                   |

\*, 注: 使用快切限制性内切酶时可以将孵育时间缩短至 5-15 min。

### 1. 酶

- 从冰箱拿出后置于冰上。
- 在反应体系中最后加入酶组分。
- 可以通过移液器上下吹打或者“轻弹”反应管混匀, 然后在微型离心机中短暂离心。尽量不要旋涡混匀。
- 一般推荐 5-10 U 酶/ $\mu\text{g}$  DNA、10-20 U 酶/ $\mu\text{g}$  基因组 DNA, 酶切 1 hr。

### 2. DNA

- DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐。推荐在 DNA 纯化过程中加入清洗步骤。
- 甲基化的 DNA 会抑制某些限制性内切酶酶切反应。

### 3. 反应缓冲液

- 使用 1X 浓度。
- 对于某些限制性内切酶需要在反应缓冲液中按推荐浓度加入 SAM (S-腺苷甲硫氨酸)。

### 4. 反应体积

- 推荐在 50  $\mu\text{L}$  反应体系下酶切 1  $\mu\text{g}$  DNA 底物。
- 反应体系中加入的酶的体积不应超过总体积的 10%, 避免酶中过多的甘油引起星号活性。
- 限制性内切酶存储缓冲液中的添加剂(例如甘油、盐)与底物溶液中的污染物(例如盐、EDTA 或乙醇等)相同, 反应体积越小, 酶切反应抑制效应越强。

推荐的反应体系

| 反应体积                | 酶量*  | DNA               | 10X ABclonal Buffer |
|---------------------|------|-------------------|---------------------|
| 10 $\mu\text{L}$ ** | 1 U  | 0.1 $\mu\text{g}$ | 1 $\mu\text{L}$     |
| 25 $\mu\text{L}$    | 5 U  | 0.5 $\mu\text{g}$ | 2.5 $\mu\text{L}$   |
| 50 $\mu\text{L}$    | 10 U | 1 $\mu\text{g}$   | 5 $\mu\text{L}$     |

\*, 注: 对于小体积反应体系, 限制性内切酶应稀释后加入反应体系。

\*\* , 注: 为避免蒸发, 10  $\mu\text{L}$  反应体系的孵育时间不应超过 1 hr。

### 5. 孵育时间

- 孵育时间推荐 1 hr。
- 使用过量的酶或者快切酶能减少孵育时间。
- 对于许多限制性内切酶, 可以使用更少的酶孵育, 但需延长孵育之间到 16 hr。

### 6. 终止反应

酶切后的 DNA 无后续实验, 可以按下述方法终止反应:

- 用终止液终止反应。向 50  $\mu\text{L}$  酶切反应体系中加入 10  $\mu\text{L}$  终止液。[1X 终止液: 2.5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl, 0.08% SDS, 0.02% Tartrazine, 0.001% Xylene Cyanol FF, pH 8.0 @ 25°C]

酶切后的 DNA 有后续实验, 可以按下述方法终止反应:

- 热失活。
- 通过吸附柱或苯酚/氯仿纯化。

### 7. 对照实验

如果酶切 DNA 底物时遇到困难, 推荐设置对照实验:

- 对照 DNA 底物: 选择含有限制酶识别位点的对照 DNA 底物 (一般使用含多个限制酶识别位点的 DNA, 例如  $\lambda$  或 PUC19 质粒 DNA)。
- 如果对照 DNA 能够被切开, 而实验 DNA 酶切障碍。对于这种情况, 可以将这两种 DNA 混合后进行酶切反应。如果实验 DNA 中含有酶切反应抑制物 (例如高浓度盐、EDTA 或苯酚等), 对照 DNA 也将不会被切开。