

## 产品组分

| 组分名称               | 组分编号    | 规格      |
|--------------------|---------|---------|
|                    |         | 5,000 U |
| MspI (20,000 U/mL) | RM21601 | 250 µL  |
| 10X Buffer CutS    | RM20103 | 1.25 mL |

## 产品说明

### 识别位点



### 活性定义

1 活性单位 (U) 是指在 50 µL 反应体系中, 37°C 1 hr 内完全酶切 1 µg λDNA 所需的酶量。

### 保存温度

-20°C

### 酶切反应条件

1X Buffer CutS, 37°C 反应

### 1X Buffer CutS

50 mM KAc, 20 mM Tris-HAc, 10 mM MgAc<sub>2</sub>,  
100 µg/mL rHSA, 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

### 热失活

否

### 甲基化敏感性

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

## 操作说明

### 推荐的酶切反应体系 (以 50 µL 体系为例)

| 组分                 | 加入量         |
|--------------------|-------------|
| ddH <sub>2</sub> O | Up to 50 µL |
| 10X Buffer CutS    | 5 µL        |
| DNA*               | 1 µg        |
| MspI               | 1 µL        |

\* 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。

- ◆ 37°C 孵育 5-15 min 可以完全酶切 DNA 底物。
- ◆ 对不能热失活的内切酶, 若用户有后续实验, 推荐酶切后的产物纯化后使用。

## 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活性。
- ◆ 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很多关键因素：合适的 DNA 底物量，合适的内切酶与反应缓冲液可以达到最佳的酶切效果。大多数研究者按下面所示“推荐限制性内切酶酶切反应”进行实验，对于不同来源、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 μL 是充足的，一般使用 1 μL |
| DNA 底物           | 1 μg                  |
| 10X ABclonal 缓冲液 | 5 μL                  |
| 总体积              | 50 μL                 |
| 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/μg DNA、10-20 U 酶/μg 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的酶切反应。

### 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 μL 反应体系下酶切 1 μg 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 μL** | 1 U  | 0.1 μg | 1 μL                |
| 25 μL   | 5 U  | 0.5 μg | 2.5 μL              |
| 50 μL   | 10 U | 1 μg   | 5 μL                |

\* 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 μL 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可减少孵育时间。
- 对于许多限制性内切酶，可以使用更少的酶孵育，但需延长孵育时间到 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 μL 酶切反应体系中加入 10 μL 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 λ DNA 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。