

Eco31I (Bsa I)

目录: RK21129

规格: 1000 U

浓度: 10,000 U/mL

产品组成:

Eco31I (10,000 U/mL)	RM21630	100 µL
10X Buffer CutS	RM20103	200 µL

产品说明

识别位点



活性定义

1 活性单位 (U) 是指在 20 µL 反应体系中, 37°C 1 hr 内完全酶切 1 µg 底物 DNA 所需的酶量。

酶存储液

10 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol, pH 7.5 @ 25°C

反应温度

37°C

保存温度

-20°C

反应条件

1X Buffer CutS, 37°C 温育;

热失活

80°C 恒温加热 20 min

操作说明

1. 推荐反应体系 (以 20 µL 体系为例)

1.1 在冰上按照下面表格中的建议顺序配置反应体系, 最后加入内切酶。

组分	加入量
Nuclease-free water	X µL
10X Buffer CutS	2 µL
质粒/PCR 产物	0.2-1 µg
Eco31I	0.5-1 µL*

*, 注: 在 20 µL 反应体系中, 1 µL Eco31I 酶可以完全酶切 1 µg DNA 底物。

1.2 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。

1.3 37°C 孵育 1 小时。

1.4 80°C 20 min 进行灭活处理。(可选)

注意事项

1. 酶

1.1 从冰箱拿出后请一直置于冰上, 使用完毕后宜立即放置于 -20°C 保存。

1.2 在反应体系中最后加入酶组分。

1.3 一般推荐 5-10 U 酶/µg DNA、10-20 U 酶/µg 基因组 DNA。

2. DNA

2.1 DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐, 影响酶切活性, 推荐若底物为 PCR 扩增产物, 建议纯化后进行酶切;

2.2 甲基化的 DNA 会抑制某些限制性内切酶酶切反应。

2.3 甲基化修饰影响

种类	Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
影响程度	无影响	序列完全重叠, 剪切阻断	序列完全重叠, 剪切阻断	无影响	序列完全重叠, 剪切可能阻断

2.4 不同 DNA 中的酶切位点数量

DNA 种类	pUC57	pUC18/19	pBR322	Lambda
酶切位点数量	1	1	1	2

3. 反应缓冲液

- 3.1 使用浓度：1X。
- 3.2 推荐使用 Buffer CutS 缓冲液。
- 3.3 在不同实验缓冲液中的活性

Buffer 名称	ABclonal CutS	NEB CutSmart Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer
活性	100%	100%	100%

4. 反应体积

- 4.1 推荐在 20 μ L 反应体系下, 酶切 1 μ gDNA 底物。
- 4.2 反应体系中加入的酶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。
- 4.3 限制性内切酶存储缓冲液中的添加剂(例如甘油、盐)与底物 DNA 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。

推荐的反应体积及酶量

反应体积	酶量*	DNA	10X Buffer CutS
10 μ L**	1-5 U	0.1 μ g	1 μ L
25 μ L	5-10 U	0.5 μ g	2.5 μ L
50 μ L	10 U	1 μ g	5 μ L

*, 注: 对于小体积反应体系, 限制性内切酶需要稀释后加入反应体系。

**, 注: 为避免蒸发, 10 μ 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需要减少孵育时间。

6. 终止反应

- 6.1 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 μ L 酶切反应体系中加入 10 μ 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]
- 6.2 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. 一步法连接反应推荐

● 构建体系

组分	加入量
Nuclease-free water	to 20 μ L
插入片段*	0.1 pmol
载体	0.05 pmol
10x T4 DNA ligase Reaction buffer	2 μ L
T4 DNA Ligase (High Conc.) (RK21500)	1 μ L
Eco31I	1 μ L

*, 注: 当存在多个插入片段时, 每个片段都投入 0.1 pmol。

● 单片段构建程序

温度	时间	循环
37°C	10 min	1
60°C	5 min	1

● 多片段构建程序

温度	时间	循环
37°C	1 min	30
16°C	1 min	
60°C	5 min	1

8. 对照实验

如果酶切 DNA 底物时遇到困难, 我们推荐如下对照实验:

- 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。