

快速内切酶 AvrII

REF: MD031



同裂酶: AspA2I, BlnI, XmaJI

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。



储运条件

-20°C

产品组成

组分 / 规格	MD031-25Rxns
快速内切酶 AvrII	25 µl
10× Reaction Buffer	1ml
10× Reaction Color Buffer	1ml

产品简介

快速内切酶是一系列经过基因工程重组、能够在 5~15 分钟内精确完成 DNA 切割的限制性内切酶, 适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。快速内切酶 快速内切酶具有如下特点: 5~15 分钟内即可完成酶切; 共用一种酶切 Buffer, 大大简化酶切反应体系; 良好的酶活冗余度, 轻松应对底物过量或困难模板酶切。此外, 伊势久去磷酸化、连接试剂在 Reaction 酶切 Buffer 中具有 100% 活性, 支持一管化反应, 提升“酶切 - 修饰 - 连接”的体验。

建议反应条件

1× Reaction 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

最适反应温度下, 在 20 µl 反应体系中, 1 µl 快速内切酶 AvrII 能够在 15 min 内完全消化 1 µg λDNA (HindIII digest)。

超长时间温育检测

最适反应温度下, 将 1 µl 快速内切酶 AvrII 与 1 µg λDNA (HindIII digest) 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, 延时酶切可能出现星号活性。

酶切—连接—再酶切检测

最适反应温度下, 使用 1 µl 快速内切酶 AvrII 消化底物, 回收酶切产物。在 22 °C 下使用适量 Fast T4 DNA Ligase 可以将酶切产物重新连接。将连接产物再次回收后, 使用相同的内切酶可以重新切开连接产物。

非特异性内切酶活性检测

最适反应温度下, 使用 1 µl 快速内切酶 AvrII 与 1 µg 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 质粒 DNA 仍然处于超螺旋状态。

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



受 CpG 甲基化影响, 序列可能重叠, 剪切阻断



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	15μl	16μl	30μl
10× Reaction Buffer 或 10× Reaction Color Buffer	2μl	3 μl ^a	5μl
底物 DNA	2 μl (up to 1 μg)	10 μl (~0.2 μg)	10 μl (5 μg)
快速内切酶 AvrII	1μl	1μl	5μl
Total	20μl	30μl	50μl

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× Reaction Buffer 加入量可适当减少至 2μl。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）。

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

DNA	1 μg	2 μg	3 μg	4 μg	5 μg
快速内切酶 AvrII	1μl	2μl	3μl	4μl	5μl
10× Reaction Buffer 或 10× Reaction Color Buffer	2μl	μl	3μl	4μl	5μl
Total	20μl	20μl	30μl	40μl	50μl

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
2	0	0	0	0	2	0	2

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	无影响	无影响	无影响

在不同反应缓冲液中的活性

	BIOISCO Reaction Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart® Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

注：活性数据来自 BIOISCO 限制酶标准反应体系下的检测。

