

ABC™ EagI

REF: ABC15553S

5'...C G G C C G...3'
3'...G C C G G C...5'



同裂酶: BseX3I, BstZI, EclXI, Eco52I

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℃

产品组成

组分	规格
ABC™ EagI	25 μl
10× CutOne™ Buffer	1 ml
10× CutOne™ Color Buffer	1 ml

产品简介

ABC™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ABC™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，有爱必胜去磷酸化、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。

建议的反应条件

1× CutOne™缓冲液；

37℃温育；

参照“DNA快速酶切流程”配制反应体系。

失活条件

80℃温育20 min。

质量控制

功能活性检测

37℃下，在20 μl通用CutOne™反应体系中，1 μl ABC™ EagI能够在15 min内完全消化1 μg pEPE DNA。

超长时间温育检测

37℃下，在20 μl通用CutOne™反应体系中，将1 μl ABC™ EagI与1 μg pEPE DNA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℃下，使用10倍酶量的ABC™ EagI消化DNA底物，回收酶切产物，在22℃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。






非特异性内切酶活性检测

37℃下，在20 μl通用CutOne™反应体系中将1 μl ABC™ EagI与1 μg超螺旋质粒DNA共同温育4 h后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于10%的质粒DNA转变成缺刻或线性状态。

蓝白斑检测

使用1 μl ABC™ EagI消化含有*lacZα*基因且仅在该基因上具有1个酶切位点的特定载体。将酶切产物重新连接后转化到大肠杆菌感受态细胞中，涂布在含有X-gal、IPTG和相应抗生素的LB平板培养基上生长。成功连接的β-半乳糖苷酶基因可以正确表达，并生长出蓝色菌落；而因酶切末端降解等原因未能重新连接的产物将得到白色菌落。对于ABC™系列限制酶而言，白色菌落的比例应当小于1%。

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℃
-  对于被CpG甲基化的DNA，剪切可能受阻
-  失活条件为80℃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	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)
ABC™ EagI	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℃ 温育 15 min（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）；
- ④ 80℃ 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
ABC™ EagI	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

λ DNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
2	0	1	0	0	0	0	19

甲基化修饰影响

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

在不同反应缓冲液中的活性

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

注：活性数据来自有爱必胜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

ABC15226S Alkaline Phosphatase (Fast)	100%
ABC15223S T4 DNA Ligase (Fast)	100%

注：活性数据来自有爱必胜标准反应体系下的检测；T4 DNA Ligase (Fast) 需要 ATP 作为辅助因子。