

## GensCut SphI

5' ...GCATG↓C...3'

3' ...C↑GTACG...5'

### 目录号

GS00390

### 产品组成

组分	规格
GensCut SphI	50 μL
10×GensCut Buffer	1 mL
10×GensCut Color Buffer	1 mL

### 保存条件

-20°C保存 2 年。

### 产品简介

GensCut 快速内切酶是经过基因工程重组的限制性内切酶，可在 5~15 分钟内精确完成 DNA 切割，适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。GensCut 系列快速内切酶提供一种通用酶切 Buffer，简化酶切反应体系；同时具有良好的酶活冗余度，轻松应对底物过量或困难模板酶切。

### 产品特点

- 5~15min 内完成酶切反应；
- 一种通用的酶切 Buffer；
- 良好的酶活冗余度。

### 适用范围

适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。

## 注意事项

1. 酶切前建议对 PCR 产物进行纯化；
2. 3 h 温育未表现星号活性，延时酶切可能出现星号活性；
3. EcoBI 甲基化影响，序列可能重叠，剪切阻断；
4. 所有内切酶的使用体积总和不得超过总反应体系的 1/10；
5. 失活条件为 80°C 温育 20min。

## 质量控制

1. 功能活性检测：最适反应温度下，在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中，1  $\mu\text{L}$  酶能够在 15 min 内完全消化 1  $\mu\text{g}$   $\lambda\text{DNA}$ 。
2. 超长时间温育检测：最适反应温度下，将 1  $\mu\text{L}$  酶与 1  $\mu\text{g}$   $\lambda\text{DNA}$  共孵育 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，但延长孵育时间可能出现星号活性。
3. 酶切-连接-再酶切检测：最适反应温度下，使用 1  $\mu\text{L}$  酶消化底物，回收酶切产物，在 22°C 下使用适量 T4 DNA 连接酶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。
4. 非特异性内切酶活性检测：最适反应温度下，将 1  $\mu\text{L}$  酶与 1  $\mu\text{g}$  超螺旋质粒 DNA 共同孵育 4h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，质粒 DNA 仍然处于超螺旋状态。
5. 蓝白斑检测：将含有单一 lacZ $\alpha$  基因的载体以 1  $\mu\text{L}$  酶消化，重新连接后转化入大肠杆菌感受态细胞，涂布在含有对应抗生素、IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基平板上。连接正确的产物会生长出蓝色菌落，而连接错误（即 DNA 末端切口不完整）的产物将得到白色菌落。对于 GensCut 系列限制酶而言，白色菌落比例应小于 1%。

## 使用方法

### 1. DNA 的快速酶切

- 1) 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系；

组分	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH <sub>2</sub> O	15 $\mu\text{L}$	16 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
10 × GensCut Buffer / 10 × GensCut Color Buffer	2 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$ *	5 $\mu\text{L}$
底物 DNA	2 $\mu\text{L}$ ( ~1 $\mu\text{g}$ )	10 $\mu\text{L}$ ( ~0.2 $\mu\text{g}$ )	10 $\mu\text{L}$ ( 5 $\mu\text{g}$ )
GensCut SphI	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
Total	20 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

\* :本体系指已纯化后的 PCR 产物。未纯化的 PCR 产物具备一定的离子强度，10 × GensCut Buffer 加入量可适当减少至 2  $\mu\text{L}$ 。若下一步进行克隆等实验，酶切前需纯化 PCR 产物。

- 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 孵育 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
GensCut SphI	1 μL	2 μL	3 μL	4 μL	5 μL
10×GensCut Buffer					
/10×GensCut 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，应适当增加温育时间，尽量使用水浴、金属浴或沙浴。

## 不同 DNA 种的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
6	0	1	1	1	2	1	8

## 甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	无影响	无影响	序列可能重叠 剪切阻断

## 在不同反应缓冲液中的活性

缓冲液	GensCut Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart® Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

注意：活性数据来自金沙生物限制酶标准反应体系下的检测。

## 同裂酶

BbuI, PaeI, SpaHI；同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。