使用前请仔细阅读说明书　版本号：202201

LightSpeed 系列 EcoRV

目录号：EZ22016S　　规格：200T　　保存：-20℃保存及运输，有效期至少一年。

产品简介：

5'...G▼A A T T C...3'
3'...C T T A A▲G...5'

注：同裂酶：FunII，同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。

LightSpeed 系列 超快速内切酶是一系列经过基因工程重组、快速、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。LightSpeed 系列 超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，去磷酸化、连接试剂在 EZ 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。

试剂内容：

组分	规格
LightSpeed 系列 EcoRV	200μL
10×EZ Buffer	2*1mL
10×EZ Color Buffer	2*1mL

质量控制：

功能活性检测

最适反应温度下，在 20μl 反应体系中，1μl LightSpeed 系列EcoRV 能够在 15min 内完全消化 1μg λDNA。

超长时间温育检测

最适反应温度下，将 1μl LightSpeed 系列 EcoRV 与 1μg λDNA 共同温育 3h，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 1μl LightSpeed 系列 EcoRV 消化底物，回收酶切产物。在 22℃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，将 1μl LightSpeed 系列 EcoRV 与 1μg 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，质粒 DNA 仍然处于超螺旋状态。

蓝白斑检测

将含有单一*lacZα*基因的载体以 1μl LightSpeed 系列 EcoRV 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 LightSpeed 系列 限制酶而言，白色菌落比例应小于 1%。

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_2O	15μL	16μL	30μL
10×EZ Buffer 或 10×EZ Color Buffer	2μL	3μL	5μL
底物 DNA	2μL (up to 1μg)	10μL (~0.2μg)	10μL (5μg)
LightSpeed 系列 EcoRV	1μL	1μL	5μL
Total	20μL	30μL	50μL

注：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× EZ 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℃温育 15 分钟（质粒），或 15~30 分钟（PCR 产物），或 30~60 分钟（基因组 DNA）；

④ 80℃温育 20 分钟即可使酶失活，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 1μL，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	1μg	2μg	3μg	4μg	5μg
LightSpeed 系列 EcoRV	1μL	2μL	3μL	4μL	5μL
10×EZ Buffer 或 10×EZ Color Buffer	2μL	2μL	3μL	4μL	5μL
Total	20μL	20μL	30μL	40μL	50μL

注：如果总反应体系大于 20μL，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
21	0	1	1	0	1	0	9

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	无影响	无影响	序列完全重叠剪切阻断

在不同反应缓冲液中的活性

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

注：活性数据来自三狮生物限制酶标准反应体系下的检测。

最终解释权所有©河北三狮生物科技有限公司，保留一切权利