**使用前请仔细阅读说明书版本号：202201**

# LightSpeed 系列 SphI

**目录号：EZ22039S　　规格：50T　　保存：-20℃保存及运输，有效期至少一年。**

## 产品简介：

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

**注： 同裂酶：BbuI，PaeI，SpaHI 同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。。**

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 SphI | 50μL |
| 10× EZ Buffer | 1mL |
| 10× EZ Color Buffer | 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 SphI 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 SphI 与 1μg λDNA 共温育 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 SphI 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 SphI 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 SphI 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 SphI | 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；

③37℃温育 15 分钟（质粒），或 15~30 分钟（PCR 产物），或 30~60 分钟（基因组 DNA）；

④80℃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 SphI | 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 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 | 序列完全重叠<br>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