Eco31I（Bsa I）

产品目录号：RK21129

产品组分

组分名称	组分编号	浓度	1,000 U
Eco31I	RM21630	10,000 U/mL	100 μL
10X Buffer CutS	RM20103	10X	200 μL

产品说明

识别位点

5'...G G T C T C(N)$_1$▼...3'

3'...C C A G A G(N)$_5$▲...5'

活性定义

1 活性单位（U）是指在 20 μL 反应体系中，37℃ 1 hr 内完全酶切 1 μg 底物所需的酶量。

保存温度

-20℃

酶切反应条件

1X Buffer CutS，37℃ 反应

热失活

80℃温育 20 min

操作说明

1. 推荐反应体系（以 20 μL 体系为例）

1.1 在冰上按照下面表格中的建议顺序配制反应体系，最后加入内切酶。

组分	加入量
Nuclease-free wate	Up to 20 μL
10X Buffer CutS	2 μL
质粒/PCR 产物	0.2-1 μg
Eco31I*	0.5-1 μL

*** 注：在 20 μL 反应体系中，1 μL Eco31I 酶可以完全酶切 1 μg DNA 底物。**

1.2 通过移液器上下吹打或者轻弹反应管混匀，然后在微型离心机中短暂离心。切勿旋涡混匀。

1.3 37℃ 孵育 1 小时。

1.4 80℃温育 20 min 进行灭活处理。（可选）

注意事项

1. 酶

1.1 从冰箱拿出后请一直置于冰上，使用完毕后宜立即放置于-20℃保存。

1.2 在反应体系中最后加入酶组分。

1.3 一般推荐 5-10 U 酶/μg DNA、10-20 U 酶/μg 基因组 DNA。

2. DNA

2.1 DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐，影响酶切活性，推荐若底物为 PCR 扩增产物，建议纯化后进行酶切。

2.2 甲基化的 DNA 会抑制某些限制性内切酶酶切反应。

2.3 甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	序列完全重叠，剪切阻断	序列完全重叠，剪切阻断	无影响	序列可能重叠，剪切可能阻断

2.4 不同 DNA 中的酶切位点数量

DNA 种类	pUC57	pUC18/19	pBR322	λDNA
酶切位点数量	1	1	1	2

3. 反应缓冲液

3.1 使用浓度：1X。

3.2 推荐使用 Buffer CutS 缓冲液。

3.3 在不同实验缓冲液中的活性

Buffer 名称	ABclonal CutS	NEB CutSmart Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer
活性	100%	100%	100%

E-mail:cn.market@abclonal.com
TEL:400-999-6126

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.

4. 反应体积

4.1 推荐在 20 µL 反应体系下,酶切 1 µg DNA 底物。

4.2 反应体系中加入的酶体积不应超过总体积的 10%，避免酶中过多的甘油引起星号活性。

4.3 限制性内切酶存储缓冲液中的添加剂(例如甘油、盐)与底物 DNA 溶液中的污染物(例如盐、EDTA 或乙醇等)相同，反应体积越小，酶切反应抑制效应越强。

推荐的反应体积及酶量

反应体积	酶量*	DNA	10X Buffer CutS
10 µL**	1-5 U	0.1 µg	1 µL
25 µL	5-10 U	0.5 µg	2.5 µL
50 µL	10 U	1 µg	5 µL

* 注：对于小体积反应体系，限制性内切酶应稀释后加入反应体系。

** 注：为避免蒸发，10 µL 反应体系的孵育时间不应超过 1 hr。

5. 孵育时间

5.1 孵育时间推荐 1 hr。

5.2 使用过量的酶或者快切酶需要减少孵育时间。

6. 终止反应

6.1 酶切后的 DNA 无后续实验，可以按下述方法终止反应：用终止液终止反应。向 50 µL 酶切反应体系中加入 10 µL 终止液。

[1X 终止液：2.5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl, 0.08% SDS, 0.02% Tartrazine, 0.001% Xylene Cyanol FF, pH 8.0 @ 25°C]

6.2 酶切后的 DNA 有后续实验，可以按下述方法终止反应：

- 热失活。
- 通过吸附柱或苯酚/氯仿纯化。

7. 一步法连接反应推荐

● 构建体系

组分	加入量
Nuclease-free water	to 20 µL
插入片段*	0.1 pmol
载体	0.05 pmol
10x T4 DNA ligase Reaction buffer	2 µL
T4 DNA Ligase (High Conc.) (RK21500)	1 µL
Eco31I	1 µL

* 注：当存在多个插入片段时，每个片段都投入 0.1 pmol。

● 单片段构建程序

温度	时间	循环
37°C	10 min	1
60°C	5 min	1

● 多片段构建程序

温度	时间	循环
37°C	1 min	30
16°C	1 min	
60°C	5 min	1

8. 对照实验

如果酶切 DNA 底物时遇到困难，推荐设置对照实验：

- 对照 DNA 底物：选择含有限制酶识别位点的对照 DNA 底物（一般使用含多个限制酶识别位点的 DNA，例如λ或 PUC19 质粒 DNA)。
- 如果对照 DNA 能够被切开，而实验 DNA 酶切障碍。对于这种情况，可以将这两种 DNA 混合后进行酶切反应。如果实验 DNA 中含有酶切反应抑制物（例如高浓度盐、EDTA 或苯酚等），对照 DNA 也将不会被切开。