

# LightNing® EcoRI

REF: EG15536S

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

⚡ 37 CpG EB 80 3h

同裂酶：FnuII

注：同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。

## 储存条件

-20℃保存 2 年

## 产品组成

| 组分                       | 规格     |
|--------------------------|--------|
| LightNing® EcoRI         | 600 µl |
| 10× CutOne® Buffer       | 3×1 ml |
| 10× CutOne® Color Buffer | 3×1 ml |

## 产品简介

LightNing® 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 LightNing® 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，百时美去磷酸化、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 LightNing® EcoRI 能够在 15 min 内完全消化 1 µg λDNA。

### 超长时间温育检测

37℃下，在 20 µl 通用 CutOne® 反应体系中，将 1 µl LightNing® EcoRI 与 1 µg λDNA 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 LightNing® EcoRI 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 LightNing® EcoRI 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 LightNing® EcoRI 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 LightNing® 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

37 最适反应温度为 37℃

CpG 对于被 CpG 对甲基化的 DNA，剪切可能受阻

EB 对于被 EcoBI 甲基化的 DNA，剪切可能受阻

80 失活条件为 80℃ 温育 20 min

★ 3 h 温育未表现星号活性，更长时间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 <sub>2</sub> O                            | 15 µl             | 16 µl             | 30 µl        |
| 10× CutOne® Buffer 或 10× CutOne® Color Buffer | 2 µl              | 3 µl <sup>a</sup> | 5 µl         |
| 底物 DNA                                        | 2 µl (up to 1 µg) | 10 µl (~0.2 µg)   | 10 µl (5 µg) |
| LightNing® EcoRI                              | 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°C 温育 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）；
- 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

| DNA                                           | 1 µg  | 2 µg  | 3 µg  | 4 µg  | 5 µg  |
|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LightNing® EcoRI                              | 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 |
|------|-------|--------|-------|----------|------|------------|--------|
| 5    | 0     | 1      | 1     | 1        | 1    | 1          | 5      |

## 甲基化修饰影响

| Dam | Dcm | CpG   | EcoKI | EcoBI |
|-----|-----|-------|-------|-------|
| 无影响 | 无影响 | 剪切受影响 | 无影响   | 剪切受影响 |

## 在不同反应缓冲液中的活性

|    | CutOne® Buffer | Thermo Scientific FastDigest Buffer | NEB rCutSmart™ Buffer | Takara QuickCut™ Buffer |
|----|----------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 活性 | 100%           | 100%                                | 100%                  | 100%                    |

注：活性数据来自百时美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

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| EG15208S Alkaline Phosphatase (Fast) | 100% |
| EG15205S T4 DNA Ligase (Fast)        | 100% |

注：活性数据来自百时美标准反应体系下的检测；T4 DNA Ligase(Fast) 需要 ATP 作为辅助因子。