# LightNing® SphI

REF: EG15575S

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

同裂酶： PaeI

注：同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。

## 储存条件

-20℃保存 2 年

## 产品组成

| 组分 | 规格 |
|---|---|
| LightNing® SphI | 50 μl |
| 10× CutOne® Buffer | 1 ml |
| 10× CutOne® Color Buffer | 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

65℃温育 5 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® SphI 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® SphI 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® SphI 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® SphI 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® SphI 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℃
- EB 对于被 EcoBI 甲基化的 DNA，剪切可能受阻
- 失活条件为 65℃温育 5 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

江苏愚公生物科技有限公司 / 江苏百时美生物科技有限公司
Yugong Biotech Co., Ltd. / BestEnzymes Biotech Co., Ltd
Tel: 0518-8558 6628 • E-mail:support@best-enzymes.com • www.best-enzymes.com
最终解释权所有 © 江苏愚公生物科技有限公司，保留一切权利
ISO 13485 高新技术企业
愚公生物微信公众号 愚公生物科研小助手 愚公生物微信视频号

# 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 |
|---|---|---|---|
| $ddH_2O$ | 15 μl | 16 μl | 30 μl |
| 10× CutOne® Buffer 或 10× CutOne® Color Buffer | 2 μl | 3 μl[a] | 5 μl |
| 底物 DNA | 2 μl (up to 1 μg) | 10 μl (~0.2 μg) | 10 μl (5 μg) |
| LightNing® SphI | 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℃温育 15 min（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）；
④ 65℃温育 5 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® SphI | 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 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 | 剪切受阻 |

# 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。

江苏愚公生物科技有限公司 / 江苏百时美生物科技有限公司
Yugong Biotech Co., Ltd. / BestEnzymes Biotech Co., Ltd
Tel: 0518-8558 6628 • E-mail:support@best-enzymes.com • www.best-enzymes.com
最终解释权所有 © 江苏愚公生物科技有限公司，保留一切权利
ISO 13485 高新技术企业
愚公生物微信公众号 愚公生物科研小助手 愚公生物微信视频号