**快速内切酶Esp3I (BsmBI)**

REF: MD101

5'...C G T C T C (N)1...3'

3'...G C A G A G (N)5...5'

同裂酶：BsmBI, BstGZ53I, Esp16I, Esp23I

注：同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。

**建议反应条件**

1× Reaction 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

**产品组成**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分 / 规格** | **MD101-30Rxns** | **Storage** |
| 快速内切酶Esp3I | 30 μl | -20℃ |
| 10× Reaction Buffer | 1 ml | -20℃ |
| 10× Reaction Color Buffer | 1 ml | -20℃ |

**产品说明**

快速内切酶是一系列经过基因工程重组、能够在 5~15 分钟内精确完成 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。快速内切酶 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，伊势久去磷酸化、连接试剂在 Reaction 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。

**使用方法**

**1. DNA 快速酶切流程**

①冰上按照下表配制反应体系：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | 质粒 DNA | PCR 产物 | 基因组 DNA |
| ddH2O | 15μl | 16μl | 30μl |
| 10× Reaction Buffer 或 10× Reaction Color Buffer | 2μl | 3 μla | 5μl |
| 底物 DNA | 2 μl (up to 1 μg) | 10 μl (~0.2 μg) | 10 μl (5 μg) |
| 快速内切酶 Esp3I | 1μl | 1μl | 5μl |
| Total | 20μl | 30μl | 50μl |

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× Reaction 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 min（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）；

④ 80℃温育 20 min 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 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 |
| 快速内切酶 Esp3I | 1μl | 2μl | 3μl | 4μl | 5μl |
| 10× Reaction Buffer 或 10× Reaction Color Buffer | 2μl | 2μl | 3μl | 4μl | 5μl |
| Total | 20μl | 20μl | 30μl | 40μl | 50μl |

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。

**质量控制**

|  |  |
| --- | --- |
| **质控项目** | **质控标准** |
| 功能活性检测 | 最适反应温度下，在 20 μl 反应体系中，1 μl 快速内切酶 Esp3I 能够在 15 min内完全消化 1 μg λDNA 。 |
| 星号活性测试 | 最适反应温度下，将1 μl 快速内切酶 Esp3I 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，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 1 μl 快速内切酶 Esp3I 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。 |
| DNase 残留检测 | 将1 μl LightNing™ Esp3I 与双链DNA 底物在 37℃温育 16 h， 通过DNA 电泳检测双链DNA 底物无变化。 |

**不同 DNA 中的酶切位点数量**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| λDNA | ΦX174 | pBR322 | pUC57 | pUC18/19 | SV40 | M13mp18/19 | Adeno2 |
| 14 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 21 |

**甲基化修饰影响**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Dam | Dcm | CpG | EcoKI | EcoBI |
| 无影响 | 无影响 | 序列完全重叠 | 无影响 | 序列可能重叠  剪切可能受影响 |
| 剪切阻断 |

**在不同反应缓冲液中的活性**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | BIOISCO | Thermo Scientific | NEB | Takara |
|  | Reaction Buffer | FastDigest Buffer | CutSmart® Buffer | QuickCut™ Buffer |
| 活性 | 100% | 75% | 100% | 100% |

注：活性数据来自 BIOISCO 限制酶标准反应体系下的检测。

