

BsrDI

REF: EG25506S

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

同裂酶: Bse3DI, BseMI

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。

[37] [EB] [80] [★]

储运条件

-20℃

产品组成

组分	规格
BsrDI (10 U/μl)	25 μl
10× Cut Buffer B	1 ml

产品简介

BsrDI 来源于 *Bacillus stearothermophilus* D70, 由大小两个亚基组成, 属于异二聚体酶。BsrDI 识别特定序列 GCAATG/CATTGC, 切割顶链时在识别位点下游 2 个核苷酸处, 底链则在识别位点后直接切割, 产生特定的黏性末端, 属于 Type IIS 型限制酶, 可用于 Golden gate 组装。

建议反应条件

1× Cut Buffer B;

37℃温育;

参照“DNA 酶切流程”配制反应体系。

失活条件

80℃温育 20 min。

活性定义

1 活性单位 (U) 是指在 50 μl 反应体系中, 37℃ 1 h 内完全酶切 1 μg λDNA 所需的酶量。

质量控制

功能活性检测

37℃下, 10 U BsrDI 能够在 15 min 内完全消化 1 μg λDNA。

超长时间温育检测

37℃下, 将 10 U BsrDI 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

37℃下, 使用 10 U BsrDI 消化底物, 回收酶切产物。在 22℃下使用适量 T4 DNA Ligase (Fast) 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。

图标注释

[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

[80] 失活条件为 80℃温育 20 min

[★] 3 h 温育未表现星号活性, 延时酶切可能出现星号活性

使用方法

1. DNA 酶切流程

① 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系:

ddH ₂ O	up to 50 μl
10× Cut Buffer B	5 μl
底物 DNA ^a	1 μg
BsrDI (10 U/μl)	1 μl
Total	50 μl

a. DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐, 否则将会影响 BsrDI 酶活性;

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~1 h;

④ 80℃温育 20 min 即可使酶失活, 停止反应, 或者通过吸附柱或苯酚 / 氯仿纯化终止反应。

2. 注意事项

① 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;

② 限制性内切酶存储缓冲液中的添加剂 (例如甘油、盐) 与底物溶液中的污染物 (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。

③ BsrDI 可在 CutOne Buffer 中使用, 但星号活性明显强于在 Cut Buffer B 中反应。若要使用 Cutone Buffer 进行反应, 不建议酶切时间超过 3 h 或者超过 2 U 的 BsrDI/μg DNA 底物。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
44	4	2	2	2	4	3	14

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 50%	100%	50%	100%

注: 活性数据来自百时美限制酶标准反应体系下的检测。