

SgrAI

REF: EG25513S

5'...C R C C G G Y G...3'
3'...G Y G G C C R C...5'

37 CpG EK EB 800 ★

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
SgrAI (10 U/μl)	50 μl
10× Cut Buffer B	1 ml

产品简介

SgrAI 来源于灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)，经大肠杆菌重组表达后纯化获得，特异性识别并切割 CR/CCGGYG 序列。SgrAI 属于非 LightNing® 系列限制酶，但可兼容 CutOne® 缓冲液，可用于和其他 LightNing® 系列限制酶进行双酶切。基于酶的特殊性，SgrAI 需要两个及以上的酶切位点才能实现高效切割，对单位点的底物切割效率显著下降。

建议反应条件

1× Cut Buffer B；
37°C 温育；
参照“DNA 酶切流程”配制反应体系。

失活条件

80°C 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°C 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°C 下，10 U SgrAI 能够在 15 min 内完全消化 1 μg λDNA。

超长时间温育检测

37°C 下，将 10 U SgrAI 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°C 下，使用 10 U SgrAI 消化底物，回收酶切产物。在 22°C 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°C
- CpG 对于被 CpG 甲基化的 DNA，剪切可能受阻
- EK 对于被 EcoKI 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
- 800 失活条件为 80°C 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
SgrAI (10 U/μl)	1 μl
Total	50 μl

- 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 SgrAI 酶活性；
- 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；
- 37°C 温育 15 min~1 h；
- 80°C 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

- 酶切需要两个或两个以上识别位点。
- 每 μg DNA 底物使用的酶量不建议超过 10 U。
- 因为反应中酶的稳定性，即使温育时间超过 1 h 也不会提高酶切效率，除非增加酶量。
- 延长酶切时间、高浓度酶或 >5% 的甘油浓度可能产生星号活性，尤其不建议过夜酶切。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
6	0	1	0	0	0	0	6

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	剪切受影响	剪切受阻	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%	< 12.5%	50%	< 12.5%

注：活性数据来自百时美限制酶标准反应体系下的检测。