

β -Agarase

Code No. 7345

制品内容

β -Agarase (1 U/ μ l)	100 Units
10 \times β -Agarase Buffer	1 ml

保存: -20 $^{\circ}$ C

制品说明

β -Agarase可以切断琼脂糖【 α -L (1, 4)-3, 6-半乳糖酏- β -D (1, 3) 半乳糖多聚体】生成琼脂寡糖。本制品是一种耐高温的琼脂糖酶，反应最适温度为60 $^{\circ}$ C，适合于高温(60 $^{\circ}$ C)下的琼脂糖降解反应。本制品适用于DNA片段的切胶回收，将含有DNA片段的琼脂糖凝胶切下后，再在溶解温度下再熔化琼脂糖胶，然后使用本制品降解琼脂糖，再经乙醇沉淀回收目的DNA片段。本制品特别适合于数十kb以上的长片段DNA的切胶回收，且对DNA片段不产生损伤。

酶贮存溶液

Tris-HCl (pH7.2)	20 mM
NaCl	10 mM
EDTA	1 mM
Glycerol	50%

10 \times β -Agarase Buffer组成

Tris-HCl (pH7.2)	200 mM
NaCl	100 mM

起源

Escherichia coli JM109 carrying plasmid encoding β -Agarase gene from a marine microorganism.

活性定义

1个活性单位的定义为:在60 $^{\circ}$ C反应1小时的条件下,降解1%(W/V)浓度的200 μ l 溶解后的低熔点琼脂糖生成可溶性琼脂寡糖所需的酶量。

纯度

- 8 U的本酶和1 μ g的 λ -Hind III片段在60 $^{\circ}$ C下反应16小时, DNA的电泳谱带不发生变化。
- 8 U的本酶和1 μ g的Supercoiled pBR322 DNA在60 $^{\circ}$ C下反应16小时, DNA的电泳谱带不发生变化。
- 2 U的本酶和1 μ g的16S, 23S rRNA在37 $^{\circ}$ C下反应3小时, RNA的电泳谱带不发生变化。
- 1 U、5 U的本酶分别与1 μ g的 λ -Hind III 片段和1 μ g的 λ -Pst I 片段在37 $^{\circ}$ C或60 $^{\circ}$ C下反应1小时后, 再进行连接再切断实验, 确认100%DNA片段能够连接, 100%能被再切断, 未检测出有3'、5' 核酸外切酶活性及磷酸酶活性。

用途

β -Agarase 可以应用于 DNA 片段的琼脂糖凝胶回收实验。本制品降解琼脂糖后形成不能再成胶的碳水化合物分子, 同时释放 DNA 片段。这些降解后产生的碳水化合物分子或 β -Agarase 通常不会影响限制酶酶切反应, DNA 的连接转化等。 β -Agarase 特别适用于从凝胶中纯化大片段 (>50 kb) DNA 片段, 同时也可以用于小片段 DNA 的纯化。

使用注意

- β -Agarase对1%以下浓度的琼脂糖凝胶的降解效率较高。
- β -Agarase对用TAE缓冲液制备的琼脂糖凝胶的降解效果好于用TBE制备的凝胶, 对使用TBE制备的凝胶进行降解时, 建议酶量加倍。

- 降解琼脂糖时, β -Agarase的添加量可以根据反应体系、胶浓度、反应时间等相应调整。
- 回收长片段DNA时, 应小心避免物理性损伤。
- 降解反应后应立即进行离心以除去未被降解的琼脂糖胶块。
- 进行乙醇沉淀时, 建议使用CH₃COONH₄调整盐浓度, 以避免低聚糖与DNA结合。如果DNA片段需要进一步进行5'末端磷酸化或连接反应时, 应避免使用CH₃COONH₄, 因为T4 PNK酶和T4 DNA连接酶活性会被铵离子所抑制。
- 用1倍异丙醇或2~3倍体积的乙醇进行DNA沉淀。当回收的凝胶体积较大时建议使用异丙醇进行沉淀。
- 普通琼脂糖凝胶浓度过高, 凝胶再熔会比较困难, 建议采用低浓度凝胶。
- 高温再熔容易损伤DNA, 建议使用低熔点琼脂糖进行DNA电泳。

Takara公司低熔点琼脂糖的再熔化温度

Agarose LM SIEVE:	65 $^{\circ}$ C (4%)
Agarose LM GQT:	65.5 $^{\circ}$ C (1.5%)
Agarose MS-6:	75 $^{\circ}$ C (3%)

使用例

从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段。

- 进行琼脂糖凝胶电泳 (使用低熔点琼脂糖效果更佳)。
- 将含有目的 DNA 片段的凝胶切出, 切成小块后移入已称重的 Microtube 中确认凝胶重量。
- 加入1/10凝胶体积的10 \times β -Agarase Buffer平衡体系。
* 按凝胶重量 1 mg=1 μ l 进行计算。
- 琼脂糖再熔化 (具体再熔胶条件请参考各琼脂糖制品说明书, 例如: LM-SIEVE Agarose 的再熔胶条件为 65 $^{\circ}$ C, 10 分钟), 冷却至 60 $^{\circ}$ C后静置平衡 5 分钟。
- 加入 β -琼脂糖酶消化反应 1 小时, 每 200 mg (约 200 μ l) 的 1%凝胶中加入 2 U 的 β -Agarase。
- 冰中放置 15 分钟后, 12,000 g 离心 15 分钟。
- 取出上清液 (含 DNA), 加入盐溶液 (盐终浓度: 2.0 M CH₃COONH₄; 0.15 M NaCl; 0.3 M CH₃COONa 或 0.8 M LiCl)。
- 加入1倍体积的异丙醇, 充分混匀后-20 $^{\circ}$ C冷却60分钟 (或-80 $^{\circ}$ C 20分钟)。
- 12,000 g 离心 15 分钟。
- 除去上清, 用 70%的冷异丙醇清洗沉淀两次, 真空干燥。
- 用 TE 或其他合适的缓冲液溶解 DNA 沉淀。

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品, 或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联系我们, 或访问我们网站 www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

v201702Da

宝日医生物技术(北京)有限公司

网址: <http://www.takara.com.cn>

技术咨询电话

4006518761 4006518769