

Yakara 公司为了方便用户的使用, 采用了通用缓冲液 (Universal Buffer) 测定限制酶活性的体系 (5 种通用缓冲液在表中, 用 **标注**的), 以此体系为基准, 100% 把其它各种通用缓冲液中的相对活性归一化至表中, 有 **1** 的 **标注**是受特定 S₁₆ 活性影响的缓冲液, 为了避免特定 S₁₆ 活性的影响, 希望尽量使用 **或** **标注**的缓冲液。有酶限制酶都来自其自身的标准缓冲液 (Basal Buffer), 其中 *Acc*, *Hinc*, *Bal*, *I*, *Bon*, *I*, *Bgl*, *I*, *Bpu*1102, *Cfr*10, *Eam*1105, *Eco*52 *I*, *Nru* *I*, *Pst*H1, *Sna*B *I*, *Ssp* *I*, *Taq* *I*, *Vpa*K11B *I* (共 14 种) 由于没有十分合适的通用缓冲液, 只使用其自身标准缓冲液 (Basal Buffer)。各种限制酶的基本缓冲液组成不同, 相互之间不能通用。各种限制酶在基本缓冲液中的相对活性被列于下表, 供参考。

Yakara 公司为了方便用户的使用, 采用了通用缓冲液 (Universal Buffer) 测定限制酶活性的体系 (5 种通用缓冲液在表中, 用 **标注**的), 以此体系为基准, 100% 把其它各种通用缓冲液中的相对活性归一化至表中, 有 **1** 的 **标注**是受特定 S₁₆ 活性影响的缓冲液, 为了避免特定 S₁₆ 活性的影响, 希望尽量使用 **或** **标注**的缓冲液。有酶限制酶都来自其自身的标准缓冲液 (Basal Buffer), 其中 *Acc*, *Hinc*, *Bal*, *I*, *Bon*, *I*, *Bgl*, *I*, *Bpu*1102, *Cfr*10, *Eam*1105, *Eco*52 *I*, *Nru* *I*, *Pst*H1, *Sna*B *I*, *Ssp* *I*, *Taq* *I*, *Vpa*K11B *I* (共 14 种) 由于没有十分合适的通用缓冲液, 只使用其自身标准缓冲液 (Basal Buffer)。各种限制酶的基本缓冲液组成不同, 相互之间不能通用。各种限制酶在基本缓冲液中的相对活性被列于下表, 供参考。

	相对误差: (%)
--	-----------

限制酶	相对活性 (%)					
	L	M	H	K	T+BSA	Basal ¹
Aar II	<20	<20	<20	<20	100	120
Acc I	20	100	<20	<20	160	80
Acc II	(260)	100	<20	20	200	160
Acc III	<20	<20	20	(80)	<20	100
Abs I	60	60	40	60	100	100
Alf II	100	40 ²	<20	<20	140	120
Alv I	100	100	<20	40	200	120
Aor13H I	<20	20	<20	80 ³	80	100
Aor51H I	80	100	<20	20	120	120
Apa I	100	<20	<20	<20	<20	120
Apal. I	100	20	<20	<20	120	120
Bal I	<10	<10	<10	<10	<10	100
BamH I	(40)	(60)	80	100	60	160
Ban II	(120)	(120)	100	80	(100)	100
BclT130 I	<20	(20)	80	100	120	100
Bcl. I	<20	<20	40	60	60	100
Bgl I	<20	<20	20	40	<20	100
Bgl II	<20	<20	100	(100)	(60)	100
Bln I	<20	20	40	100	40	120
BmeT110 I	<20	<20	20	100	<20	140
BmgT120 I	<20	<20	100	40	<20	240
Bpu1102 I	<20	<20	<20	40	60	100
BspT104 I	100	60	<20	<20	100	120
BspT107 I	<20	20	80	100	20	100
BspT285 I	100	20	<20	<20	100	100
BspT407 I	20	60	20	20	100	100
BstH. I	100	100	60	20	140	100
BstP. I	<20	(60)	100	(100)	(100)	100
BstX. I	<20	40	100	<20	<20	120
Bst1107 I	<20	60	100	100	40	100
Clr10 I	<20	<20	<20	40	(20)	100
Cla I	40	100	60	100	60	100
Cpo I	<20	<20	80	100	<20	100
Dde I	40	60	60	100	80	80
Dpn I	80	20	120	140	180	100
Era I	100	100	60	100	60	80
Eae I	60	100	<20	<20	120	160
Eam1105 I	<20	(40)	20	40	(40)	100
EcoO65 I	(20)	(60)	60 ²	40	100	100
EcoO109 I	100	60	<20	<20	100	160
EcoR I	(20)	(100)	100	(120)	(80)	100
EcoR. V	<20	(40)	100	(120)	(40)	120
EcoT114 I	<20	40	100	120	(60)	100
EcoT22 I	<20	20	100	(140)	(20)	120
EcoS2 I	<20	<20	<20	<20	<20	180
EcoB1 I	<20	100	<20	<20	100	160
Fba I	<20	<20	(80)	100	(20)	100
Fok I	(20)	(60) ³	<20	<20	(200)	100
Hae II	80	100	<20	30	(200)	120
Hae III	60	100	100	60	100	100
Hap II	100	100	<20	<20	100	80
Hha I	80	100	150	>300	150	80
Hinc II	20	100	20	40	>240	100
Hind III	(60)	100	<10	40	(100)	80
HinI I	80	100	160	160	60	100
HinI I	40	80 ²	<20	20	60	160
Hpa I	<20	(40)	20	100	(60)	100
Kpn I	(100)	40	<20	<20	60	140
Mbo I	20	40	60	100	40	100
Mbo II	100	60	<20	<20	60	100
Mit I	100	80	<20	<20	80	100
Mtu I	60	60	100	(100)	60	100
Msp I	20	40	<20	40	100	60
Mun I	(200)	100 ³	<20	<20	160	100
Nae I	100	<20	<20	<20	100	120
Nco I	(40)	(60)	20	20 ²	(60)	160
Nde I	<20	40	100	(100)	20	100
Nhe I	(120)	100	<20	<20	(160)	100
Not I	<20	20	100 ³	60	<20	60
Nru I	0	<20	20	20	<20	100
Nsb I	40	20	<20	60	100	100
PmaC I	100	80	<20	<20	100	100
PshA. I	20	40	<20	100	60	160
PshB. I	(20)	(40)	20	40	40	100
PspI+096 I	80	80	<20	<20	100	100
Pst I	<20	(60)	100	80	(20)	80
Pvu I	<20	(20)	(40)	80 ³	(40)	100
Pvu II	(80)	100	40	<20	(40)	100
RspRS II	80	100	100	100	100	100
Sac I	100	60	<20	<20	80	80
Sac II	40	20	<20	<20	100	40
Sal I	<20	<20	100	<20	<20	200
Sau3A I	(60)	80	100	<20	(80)	100
Sca I	<20	<20	100	(60)	<20	100
Sfr I	(40)	(180)	<20	<20	100	100
Sma I	<20	<20	<20	<20	100	100
Sma II	<10	<20	100	40	<10	100
SnaB I	(20)	(40)	<20	<20	(40)	100
Spe I	(80)	100	80	100	(80)	100
Sph I	(20)	(40)	100	120	(20)	100
SseB387 I	(120)	60 ²	<20	<20	(60)	100
Ssp I	<20	(60)	40	(100)	(80)	100
Stu I	60	100	60	80	140	100
Taq I	80	80	20	60	80	100
Ten111 I	20	40	40	60	(80)	100
Van91 I	<20	(20)	60	100	(60)	100
VpaK11B I	<20	<20	60	(40)	<20	100
Xba I	<10	50 ²	<10	<10	120	120
Xho I	<20	40	100	100	30	100
Xsp I	<20	60	<20	100	160	100

- 每种限制性内切酶的基礎缓冲液的組成不同
- +0.01% BSA → 100%
- *Afl* I, *Aor*13H I, *Eco*O65 I, *Fok* I, *Hin* I, *Mun* I, *Nco* I, *Pvu* I, *Sse*8387 I, *Xba* I
- 虽然单独使用 H Buffer 可以获得 100% 的相对活性, 但添加 0.01% BSA 和 0.01% Triton X-100 进一步提高了酶在反应溶液中的稳定性

制品说明

限制酶酶切反应在各种克隆相关实验中是一个比较费时的环节。通常，酶切需要一小时甚至过夜才能完成。Takara QuickCut Enzyme 为 DNA 的快速酶切提供了可能。所有的 Takara QuickCut Enzyme 都能够随酶提供的两种 Buffer 即 10×QuickCut Buffer 和 10×QuickCut 稀释 Buffer 中 5~30 min 内有效切断线性 DNA、质粒 DNA 等。因此，多种限制酶可以在一个 tube 中同时完成 DNA 切断反应，既节省了反应时间，又避免了更换 Buffer 体系的繁琐操作。

Takara QuickCut Enzyme 是经过严格质量控制的高品质限制酶，是酶切实验的理想选择。

下面图 1 和图 2 分别是使用 Takara QuickCut Enzyme 的单酶切和双酶切反应的实验例。

- **反应快速**
只需 5 ~ 30 min 就可以完成酶切实验。
- **操作便捷**
Buffer 通用, 并且可以直接电泳。
- **质量保证**
经过 Labeled Oligonucleotide Assay (LOA) 检测, 保证纯度。

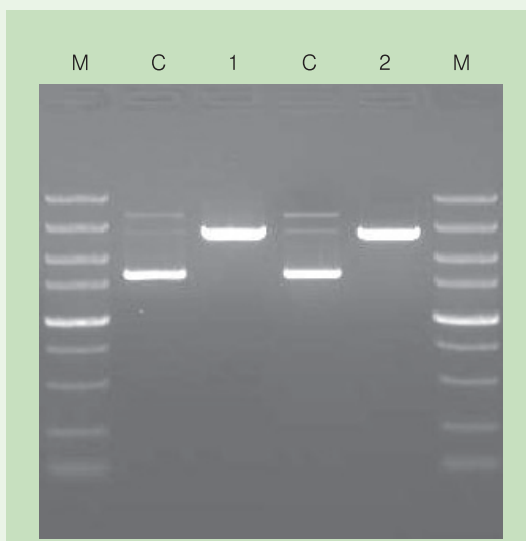
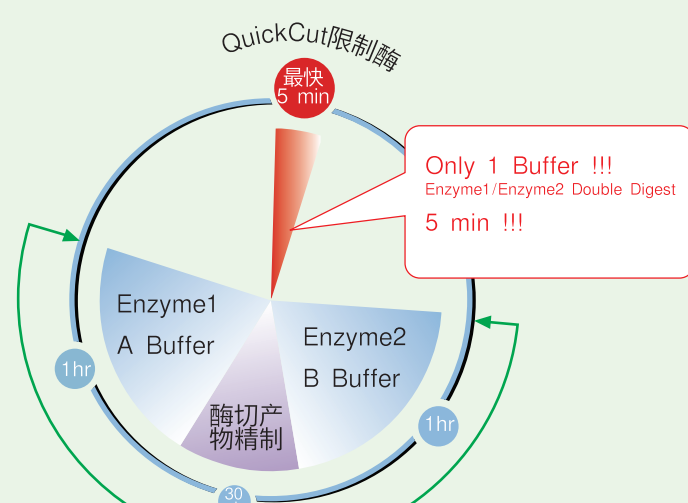
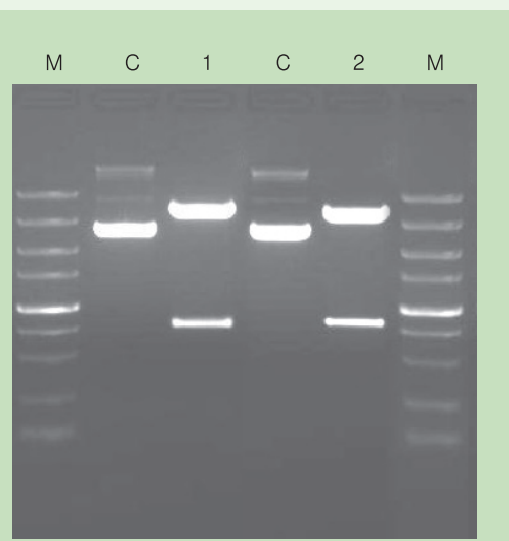


图 1: QuickCut Enzyme 单酶切实验例



使用二种酶同时进行 DNA 切断反应的双酶切反应是节省实验操作时间的常用手段之一。Takara 采用 Universal Buffer 表示系统，并对每种酶表示了在各 Universal Buffer 中的相对活性。尽管如此，在进行 Double Digestion 时，有时还会难以找到合适的 Universal Buffer。本表以在 *PUC* 系列载体的多克隆位点处的双酶切为例，显示了 Double Digestion 可使用的最佳 Universal Buffer 条件。Takara 销售产品中添附的 Universal Buffer 全为 10 倍浓度的缓冲液。在表中，各 Universal Buffer 的缓冲液稀释倍数为 10 倍，2 × 稀释至 5 倍后进行使用。

使用二种酶同时进行 DNA 切断反应的双酶切反应是节省实验操作时间的常用手段之一。Takara 采用 Universal Buffer 表示系统，并对每种酶表示了在各 Universal Buffer 中的相对活性。尽管如此，在进行 Double Digestion 时，有时还会难以找到合适的 Universal Buffer。本表以在 *PUC* 系列载体的多克隆位点处的双酶切为例，显示了 Double Digestion 可使用的最佳 Universal Buffer 条件。Takara 销售产品中添附的 Universal Buffer 全为 10 倍浓度的缓冲液。在表中，各 Universal Buffer 的缓冲液稀释倍数为 10 倍，2 × 稀释至 5 倍后进行使用。

主要限制酶进行 Double Digestion（双酶切反应）时推荐的 Universal Buffer 一览表

	<i>Acc I</i>	<i>BamH I</i>	<i>Bgl II</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>Hinc II</i>	<i>Hind III</i>	<i>Kpn I</i>	<i>Nco I</i>	<i>Nde I</i>	<i>Nat I</i>	<i>Pst I</i>	<i>Pvu I</i>	<i>Sac I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Sma I</i>	<i>Spe I</i>	<i>Sph I</i>	<i>Xba I</i>	<i>Xho I</i>
<i>Acc I</i>	—	0.5 × K	1 × T	1 × M	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M	1 × M	1 × M+BSA	1 × T	0.5 × K+BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1.5 × T	1 × T+BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M
<i>BamH I</i>	0.5 × K	—	1 × K	1 × K	1 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K+BSA	1 × K	0.5 × K+BSA	1 × K	1 × K	0.5 × K	1.5 × T	0.5 × T+BSA	1 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K
<i>Bgl II</i>	1 × T	1 × K	—	1 × H	1 × H	1 × H	2 × K	1 × K	1 × T	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × K	0.5 × K	1 × H	1 × T+BSA	1 × H	1 × H	2 × T	1 × H
<i>Cla I</i>	1 × M	1 × K	1 × H	—	1 × H	1 × H	1 × M	1 × M	1 × T	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × T+BSA	1 × M	1 × H	1 × T+BSA	1 × H	1 × H	1 × M	1 × H
<i>EcoRI</i>	1 × M	1 × K	1 × H	1 × H	—	1 × H	1 × M	1 × M	1 × M	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × K	1 × M	1 × H	1 × T+BSA	1 × H	1 × H	1 × M	1 × H
<i>EcoRV</i>	0.5 × K	1 × K	1 × H	1 × H	1 × H	—	2 × T	1 × K	0.5 × K	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × K	0.5 × K	1 × H	0.5 × K+BSA	1 × H	1 × H	2 × T	1 × H
<i>Hinc II</i>	1 × M	0.5 × K	2 × K	1 × M	1 × M	2 × T	—	1 × M	1 × M	1 × M+BSA	1 × T	0.5 × K+BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1.5 × K	1 × T+BSA	1 × M	2 × T	1 × M	1 × M
<i>Hind III</i>	1 × M	1 × K	1 × K	1 × M	1 × M	1 × K	1 × M	—	1 × M	1 × K+BSA	1 × K	0.5 × K+BSA	1 × M	1 × K	1 × M	1.5 × K	1 × T+BSA	1 × M	1 × K	1 × M	1 × M
<i>Kpn I</i>	1 × M	0.5 × K	1 × T	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M	—	0.5 × K+BSA	1 × T	0.5 × K+BSA	1 × M	0.5 × K	1 × L	1.5 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M	1 × M
<i>Nco I</i>	1 × M+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	0.5 × K+BSA	—	1 × K+BSA	0.5 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	0.5 × K+BSA	1.5 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × M+BSA	1 × K+BSA
<i>Nde I</i>	1 × T	1 × K	1 × H	1 × H	1 × H	1 × H	1 × T	1 × K	1 × T	1 × K+BSA	—	1 × H+BSA	1 × H	1 × K	1 × T	1 × H	1 × T+BSA	1 × H	1 × H	1 × T	1 × H
<i>Nat I</i>	0.5 × K+BSA	0.5 × K+BSA	1 × H+BSA	1 × H+BSA	1 × H+BSA	1 × H+BSA	0.5 × K+BSA	0.5 × K+BSA	0.5 × K+BSA	1 × H+BSA	—	1 × H+BSA	—	1 × H+BSA	2 × K+BSA	0.5 × K+BSA	1 × H+BSA	0.5 × T+BSA	1 × H+BSA	1 × H+BSA	0.5 × K+BSA
<i>Pst I</i>	1 × M	1 × K	1 × H	1 × H	1 × H	1 × H	1 × M	1 × M	1 × M	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	—	1 × K	1 × M	1 × H	0.5 × T+BSA	1 × H	1 × H	1 × M	1 × H
<i>Pvu I</i>	0.5 × K	1 × K	1 × K	1 × K	1 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K+BSA	1 × K	2 × K+BSA	1 × K	—	0.5 × K	1.5 × K+BSA	1 × K+BSA	1 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K
<i>Sac I</i>	1 × M	0.5 × K	0.5 × K	1 × M	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M	1 × L	0.5 × K+BSA	1 × T	0.5 × K+BSA	1 × M	0.5 × K	—	1.5 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M
<i>Sal I</i>	1.5 × T	1.5 × T	1 × H	1 × H	1 × H	1 × H	1.5 × K	1.5 × K	1.5 × T+BSA	1.5 × T+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1.5 × K+BSA	1.5 × T+BSA	—	1.5 × T+BSA	1 × H	1.5 × T	1 × H
<i>Sma I</i>	1 × T+BSA	0.5 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × T+BSA	0.5 × K+BSA	1 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × T+BSA	0.5 × T+BSA	0.5 × T+BSA	1 × K+BSA	1 × T+BSA	1.5 × T+BSA	—	1 × T+BSA	0.5 × T+BSA	1 × T+BSA	1 × T+BSA
<i>Spe I</i>	1 × M	1 × K	1 × H	1 × M	1 × H	1 × H	1 × M	1 × M	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × K	1 × M	1 × H	1 × T+BSA	—	1 × H	1 × M	1 × H	1 × H
<i>Sph I</i>	0.5 × K	1 × K	1 × H	1 × H	1 × H	2 × T	1 × K	0.5 × K	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × K	1 × H	0.5 × T+BSA	1 × H	—	—	2 × T	1 × H	1 × H
<i>Xba I</i>	1 × M	0.5 × K	2 × T	1 × M	1 × M	2 × T	1 × M	1 × M	1 × M+BSA	1 × T	0.5 × K+BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1.5 × T	1 × T+BSA	1 × M	2 × T	—	1 × M	1 × M
<i>Xho I</i>	1 × M	1 × K	1 × H	1 × H	1 × H	0.5 × K	1 × M	1 × M	1 × K+BSA	1 × H	1 × H+BSA	1 × H	1 × K	1 × M	1 × H	1 × T+BSA	1 × H	1 × H	1 × M	—	—

- 1 μg DNA 中添加 10 U 的各限制酶，在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的反应体系中，37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 小时可以完全分解 DNA。
- 为抑制 Star 活性，请将反应体系中的甘油含量尽量控制在 10% 以下。
- 根据 DNA 的种类、各 DNA 的高级结构的差别，或当限制酶识别位点邻接时，有时会发生 Double Digestion 不能顺利进行。



QuickCut Restriction Enzyme	Specificity 5' → 3'	反应温度 (°C)	1 μl QuickCut 限制酶的酶切反应								QC data	
			Linear Substrate			Plasmid DNA			PCR Product		Star- Activator	Labeled Organotinols Assay (L/O)
			Linear Substrate	切断时间 (min)	切断效率	Plasmid DNA	切断时间 (min)	切断效率	切断时间 (min)	切断效率		
QuickCut® <i>Afa</i> I	GT ↓ AC	37	λ DNA	5	100%	pUC19	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut® <i>Afl</i> II	C ↓ CTTAAG	37	λ - <i>dgj</i> III	5	100%	φX174	5	100%	5	>90%	16 hr	<10%
QuickCut® <i>Afu</i> I	AG ↓ GT	37	λ DNA	5	100%	pKF3	5	100%	15	>80%	16 hr	<10%
QuickCut® <i>Ape</i> I	GGGGC ↓ G	37	λ - <i>Bam</i> II	5	100%	pAdeno-X	5	100%	5	>80%	16 hr	<10%
QuickCut® <i>Bam</i> II	G ↓ GATCC	30	λ DNA	5	100%	λC19	5	100%	5	>90%	6 hr	<10%

QuickCut Restriction Enzyme		Specificity 5' → 3'	反应温度 (°C)	1 μl QuickCut 限制酶的酶切反应						QC data			
				Linear Substrate		Plasmid DNA		PCR Product		不产生 Star Activity 的时间	Labelled Orophosphate Assay (LOA)		
				Linear Substrate	切断时间 (min)	切断效率	Plasmid DNA	切断时间 (min)	切断效率	切断时间 (min)	切断效率		
QuickCut™ <i>Afa</i> I	GT ↓ AC	37	λ DNA	5	100%		pUC19	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Afl</i> II	C ↓ TTAAG	37	λ - <i>Bgl</i> II	5	100%		φX174	5	100%	5	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Alu</i> I	AGC ↓ CT	37	λ DNA	5	100%		pKF3	5	100%	15	>80%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Apa</i> I	GGGGC ↓ C	37	λ - <i>Bam</i> I	5	100%		pAdeno-X	5	100%	5	>80%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Bam</i> HI	G ↓ GATCC	30	λ DNA	5	100%		pUC19	5	100%	5	>90%	6 hr	<10%
QuickCut™ <i>Bgl</i> II	A ↓ GATCT	37	λ DNA	5	100%		pKF3	5	100%	5	>70%	1 hr	<10%
QuickCut™ <i>Bln</i> I	C ↓ ATGAT	37	λ - <i>Eco</i> RI	5	100%		pAdeno-X	5	100%	10	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Cla</i> I	CT ↓ CGAG	30	λ DNA	5	100%		M13mp18	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Dpn</i> I	Gm6A ↓ TC	37	pBR322 - <i>Pvu</i> II	5	90%		pBR322	5	100%	n.a.	n.a.	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Dra</i> I	TTT ↓ AAA	37	λ DNA	5	100%		pBR322	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Eco</i> RI	G ↓ AATTC	37	λ DNA	5	100%		pUC19	15	100%	5	100%	1 hr	<10%
QuickCut™ <i>Eco</i> RV	GAT ↓ ATC	37	λ DNA	10	100%		pBR322	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Hae</i> III	GGG ↓ C	37	λ DNA	5	100%		pUC19	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Hha</i> I	GGC ↓ C	37	λ DNA	5	100%		pBR322	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Hind</i> III	G ↓ AGCTT	37	λ DNA	5	100%		pUC19	5	100%	5	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Hinf</i> I	G ↓ ANTC	37	λ DNA	5	100%		pUC19	5	100%	5	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Hpa</i> I	GTG ↓ AAC	37	λ DNA	5	100%		pKF3	5	100%	5	100%	0.5 hr	<10%
QuickCut™ <i>Kpn</i> I	GTTAC ↓ C	37	λ - <i>Bam</i> I	5	100%		pUC19	5	100%	5	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Mlu</i> I	A ↓ CGCGAT	37	λ DNA	5	100%		pKF3	5	100%	10	>80%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Nco</i> I	C ↓ CATGG	37	λ DNA	5	100%		pKF3	5	100%	10	>90%	N/A	<10%
QuickCut™ <i>Nde</i> I	GA ↓ TATG	37	λ DNA	5	100%		pBR322	5	100%	15	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Nhe</i> I	C ↓ CTAGG	37	G ↓ <i>Hind</i> III	5	100%		pBR322-Mu	10	100%	5	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Not</i> I	GC ↓ GGGCGC	37	pASf2-Xho I	10	100%		pASf2	5	100%	10	>70%	N/A	<10%
QuickCut™ <i>Pst</i> I	CTGCA ↓ G	37	λ DNA	5	100%		pUC19	5	100%	5	>90%	N/A	<10%
QuickCut™ <i>Pvu</i> II	CGATC ↓ CG	37	λ - <i>Bam</i> I	5	100%		pBR322	15	100%	5	>70%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Pvu</i> III	GACG ↓ CTG	37	λ DNA	5	100%		pBR322	5	100%	30	>90%	1 hr	<10%
QuickCut™ <i>Sac</i> I	CAGCT ↓ G	37	λ - <i>Eco</i> RI	5	100%		pUC19	15	100%	30	>80%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Sac</i> II	CCGCG ↓ ASF	37	pASf2-Xba I	20	90%		pASf2	15	100%	10	>80%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Sai</i> I	G ↓ TCGAG	37	G ↓ <i>Hind</i> III	30	100%		pUC19	20	100%	10	100%	4 hr	<10%
QuickCut™ <i>Sfi</i> I	GGGNNNN ↓ NNGCC	50	pADSL2- <i>Eco</i> RI	5	100%		pADSL2	5	100%	20	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Sma</i> I	CCG ↓ GGG	37	G ↓ <i>Hind</i> III	5	100%		pUC19	5	100%	5	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Sna</i> BI	TAC ↓ TGA	37	λ - <i>Bam</i> I	5	100%		M13mp18	5	100%	30	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Spe</i> I	A ↓ CTAGT	37	pASf2-Xba I	5	100%		pASf2	5	100%	30	>90%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Sph</i> I	GCATG ↓ J	37	λ DNA	5	100%		pUC19	10	100%	5	100%	N/A	<10%
QuickCut™ <i>Stu</i> I	AGG ↓ CCT	37	λ DNA	5	100%		pKF3	5	100%	5	>70%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Xba</i> I	T ↓ CTAGA	37	Dam' λ - <i>Eco</i> RI	5	100%		pUC19	10	100%	10	100%	16 hr	<10%
QuickCut™ <i>Xho</i> I	C ↓ TCGAG	37	G ↓ <i>Hind</i> III	5	100%		pKF3	5	100%	5	>90%	16 hr	<10%

操作方法

- | 反应液组成 | 线性 DNA | 质粒 DNA | PCR 产物 |
|---|----------------|----------------|----------------|
| 10×QuickCut Buffer* 或 10×QuickCut Green Buffer* | 1 ~ 5 μl | 1 ~ 5 μl | 1 ~ 3 μl |
| DNA | ≤ 1 μg | ≤ 1 μg | ≤ 0.2 μg |
| QuickCut Enzyme | 1 μl | 1 μl | 1 μl |
| 灭菌水 | Up to 10–50 μl | Up to 10–50 μl | Up to 10–30 μl |

- 操作步骤**

```
graph TD; A[Step 1 按上表组分配制酶切反应液] --> B[Step 2 轻轻混匀后，瞬时离心] --> C[Step 3 37℃孵育 5 ~ 30 min*] --> D[琼脂糖凝胶电泳] --> E[使用 QuickCut Green Buffer，直接进行电泳] --> F[使用 QuickCut Buffer 添加 Loading buffer 后电泳]
```

* 不同 QuickCut Enzyme 的最适反应时间，不同底物的反应时间也有差异。QuickCut Enzyme Data 一览表。

在基因工程实验中, 经常需要对 DNA 片段进行 2 限制酶切割的酶切。但经过实验验证, 在对 DNA 片段上设计并合成相应的两个酶切位点用于双酶切时, 往往达不到预期的效果。例如, 对 pUC18 载体质粒定位点的 *Kpn*I 和 *Sma*I 进行双酶切时, 酶切反应良好, 而对于有些定位点用于双酶切时, 酶切效果与酶切反应所用酶的种类和酶切体系等因素有关。例如, 对 Sac I 进行酶切时, 酶切效果与酶切体系中的甘油浓度有关, 甘油浓度越高, 酶切效果越好。

因此, 是先进行 *Kpn*I 进行酶切, 然后再用 *Sma*I 进行酶切, 酶切效果反应良好。造成这些酶切效果不同的原因是由于 2 限制酶的酶切位点, 由于受到酶切位点周围碱基序列的影响, 从而影响了酶切效果。

本文针对 pUC18 1918/1919 载体质粒定位点的酶切影响酶切双酶切时的效果进行了实验验证。结果见表 1 和表 2。表 1 是用于验证酶切位点的酶切, 表 2 是用于验证酶切位点的酶切。为了验证酶切位点的酶切, 对载体质粒定位点的酶切进行双酶切时, 应该综合考虑酶切位点的位置关系, 建议按照酶切效率高的酶的顺序进行酶切。

■表 1 分步酶切效果

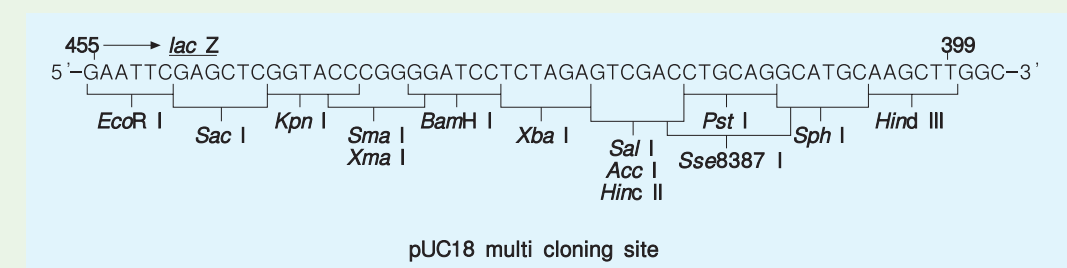
[illegible]

■表 2 同步酶切效果

[illegible]

注:

1. 对相邻酶切位点的限制酶进行双酶切反应时, 同时加入限制酶进行双酶切反应的切断效果都不太理想, 建议按先后顺序加入相应的限制酶进行酶切反应。
2. 使用 EcoR I 进行酶切反应时, 酶切体系为 20 μ l, 将酶的添加量控制在 10 U 左右, 反应时间控制在 2 小时左右, 双酶切效果较好。



进行 PCR 反应时，首先在 PCR 引物的 5' 末端设计限制酶酶切位点识别序列，可在扩增片段中引入酶切位点序列，利用酶切位点可将 DNA 片断断裂至经相同酶切的载体中。酶切时需要注意：限制酶不能切割靠近 DNA 末端的识别序列，因此限制酶识别序列的 5' 端附加上冗余碱基序列。

表中的 21 种限制酶使用在各种限制酶酶切位点 5' 端附加 0（无附加）、1、2 或 3 个碱基的任意序列的引物进行 PCR 反应，纯化 PCR 产物后，使用各限制酶进行酶切确认效率（数据为参考文献或本公司的数据），结果表明，基本上所有的酶在其酶切位点的 5' 端附加 3 个以上碱基后，可以对其酶切位点进行有效切割。

进行 PCR 反应时，首先在 PCR 引物的 5' 末端设计限制酶酶切位点识别序列，可在扩增片段中引入酶切位点序列，利用酶切位点可将 DNA 片断断裂至经相同酶切的载体中。酶切时需要注意：限制酶不能切割靠近 DNA 末端的识别序列，因此限制酶识别序列的 5' 端附加上冗余碱基序列。

表中的 21 种限制酶使用在各种限制酶酶切位点 5' 端附加 0（无附加）、1、2 或 3 个碱基的任意序列的引物进行 PCR 反应，纯化 PCR 产物后，使用各限制酶进行酶切确认效率（数据为参考文献或本公司的数据），结果表明，基本上所有的酶在其酶切位点的 5' 端附加 3 个以上碱基后，可以对其酶切位点进行有效切割。

参考文献: Qing,D.Y., Jiang,G and Frances, M.S. (1989) *Biotechniques*, **24**, 582-584

Enzyme	Base pairs from Terminus			
	0	1	2	3
<i>Aat</i> II	—	+	+	+
<i>Apa</i> I	—	—	±	+
<i>Bam</i> HI	—	±	+	+
<i>Bgl</i> II	—	—	±	+
<i>Bst</i> IX I	—	±	+	+
<i>Cla</i> I	—	±	+	+
<i>Eco</i> R I	—	±	+	+
<i>Eco</i> R V	—	+	+	+
<i>Hind</i> III	—	—	—	+
<i>Kpn</i> I	—	—	+	+
<i>Nco</i> I	—	—	+	+
<i>Nhe</i> I	—	+	+	+
<i>Not</i> I	—	—	+	+
<i>Pst</i> I	—	—	±	+
<i>Sac</i> I	—	±	+	+
<i>Sal</i> I	+	±	+	+
<i>Sma</i> I	—	±	+	+
<i>Spe</i> I	+	+	+	+
<i>Sph</i> I	—	—	+	+
<i>Xba</i> I	—	±	+	+
<i>Xho</i> I	—	—	±	+

(-) 为不能切断; (+) 为不能完全切断; (+) 为能完全切断。