

AarI

REF: EG25526S



同裂酶: PaqCI

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。

储存条件

-20°C 保存 2 年

产品组成

组分	规格
AarI (5 U/μl)	20 μl
AarI Activator	20 μl
10× CutOne® Buffer	1 ml
10× CutOne® Color Buffer	1 ml

产品简介

AarI 属于 Type IIS 型限制酶, 是 PaqCI 的完全同裂酶, 识别 CACCTGC 序列并在其下游进行切割, 形成 4 碱基的 5' 突出。不同于常规的 Type IIS 限制酶, AarI 酶切需要两个或两个以上识别位点, 搭配随酶附赠的激活剂可实现完全酶切, 在没有激活剂的情况下可以酶切, 但无法酶切完全。AarI 的识别序列长达 7 碱基, 在基因中的出现频率较低, 尤其适用于 Golden Gate 组装。

AarI 在通用的 CutOne® 或 CutOne® Color Buffer 中都具有优良的活性。CutOne® Color Buffer 包括红色和黄色示踪染料, 可将产物直接用于凝胶电泳。CutOne® Color Buffer 的红色染料与 2500 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近; 黄色染料与 10 bp 双链 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶中迁移速率接近。

建议反应条件

1× CutOne® Buffer;

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) 是指在激活剂存在下, 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, 5 U AarI 能够在 1 h 内完全消化 1 μg p615 DNA。


超长时间温育检测

37°C 下, 将 5 U AarI 与 1 μg p615 DNA 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 5 U AarI 消化底物, 回收酶切产物。在 22°C 下使用适量 T4 DNA Ligase (Fast) 可以将超过 95% 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约 95% 以上的连接产物。

图标注释

 最适反应温度为 37°C

 对于被 CpG 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻

 失活条件为 80°C 温育 20 min

 3 h 温育未表现星号活性, 更长时间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× CutOne® Buffer 或 10× CutOne® Color Buffer	5 μl
底物 DNA ^a	1 μg
AarI (5 U/μl)	1 μl
AarI Activator ^b	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 AarI 酶活性;

b. AarI 完全酶切需要按 1:1 的比例加入和酶体积一致的激活剂, 激活剂在电泳时表现为几十 bp 左右的条带, 请避免误判为非特异性切割。

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°C 温育 1~3 h;

④ 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

① AarI 是 PaqCI 的完全同裂酶;

② AarI 完全酶切需要两个或两个以上识别位点;

③ 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;

④ 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。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
12	0	0	0	0	0	0	9

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	剪切受影响	无影响	无影响

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	100%	< 12.5%	100%	< 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。