



SpeedCut Apa I

Shipping at : -20°C
Store at : -20°C

G G G C C | C
C | C C G G G

Code No. : LT-10-SC-604

容量 : 200 µl (200 reaction)

添付試薬 :

10 × SpeedCut Buffer : 1.5 ml × 1

10 × SpeedCut Green Buffer : 1.5 ml × 1

製品説明 :

SpeedCut は基質 DNA を迅速に切断できる制限酵素です。SpeedCut Enzyme は 10 × SpeedCut Buffer または 10 × SpeedCut Green Buffer 中で良好な切断活性を示し、プラスミド DNA や PCR 産物などの基質 DNA を、5 ~ 30 分の短時間で完全に切断できます。さらに 10 × SpeedCut Buffer および 10 × SpeedCut Green Buffer はすべての SpeedCut Enzyme で共通に使用できるため、複数種類の SpeedCut Enzyme を同時に反応させることができ、簡便、迅速に基質 DNA の切断が可能です。

SpeedCut Enzyme には、共通で使用できる 2 種類のバッファー (10 × SpeedCut Buffer、10 × SpeedCut Green Buffer) が添付されています。10 × SpeedCut Green Buffer には色素や比重剤が含まれているため、制限酵素反応後、アガロースゲル電気泳動に直接使用できます。子のバッファーに含まれる色素は 2 種類 (青・黄) で、1% アガロースゲルでの電気泳動で青色色素は 3 ~ 5 kbp、黄色色素は 10 bp の DNA フラグメントと同じ位置に確認されます。

起源 : *Acetobacter pasteurianus sub.pasteurianus***保存用バッファー組成 :**

10 mM Tris-HCl, pH7.5
100 mM KCl
0.1 mM EDTA
1 mM DTT
0.01% BSA
0.15% TritonX-100
50% Glycerol

活性測定 :

反応液 50 µl 中、1 µl の SpeedCut Enzyme を 1 × SpeedCut Buffer または 1 × SpeedCut Green Buffer 中で 37°C、5 分間反応を行うことにより、λ DNA 1 µg が完全に切断されることを確認しています。

品質管理 :**(1) 機能的活性テスト :**

50 µl の反応液中、1 µg の Linear DNA は 1 µl の SpeedCut Enzyme と 37°C で 5 分間反応後、完全に消化される。

(2) Star 活性テスト :

1 µg の DNA と 1 µl の SpeedCut Enzyme を 16 時間反応後、アガロースゲル電気泳動で DNA バンドパターンの変化は観察されない。

(3) 標識オリゴヌクレオチドアッセイ (LOA) テスト :

蛍光標識オリゴヌクレオチドを SpeedCut Enzyme 1 µl と 37°C で 1 時間インキュベートした後の分解率が 10% 未満でした。

メチル化の影響 :

配列が GGGCCCCWGG の場合は dcm methylase の影響を受ける。この場合、一般的な大腸菌由来の DNA は切断できない。

また、配列が GGGCCCCG の場合には、CG methylase の影響を受ける。

プロトコール :**1. 反応液の調製**

以下 A ~ C を混合し、D で 10 ~ 50 µl にメスアップします。

A : DNA 溶液 (Linear / Plasmid / PCR Product)

→ 下表の DNA 総量を超えないようご注意ください。

B-1 : 10 × SpeedCut Buffer (または B-2) ※

B-2 : 10 × SpeedCut Green Buffer (または B-1) ※

C : SpeedCut Apa I 制限酵素溶液

D : 滅菌水 (Sterilized water)

※ : B-1 または B-2 は終濃度 1 × になるよう調整ください。

※ : B-1 または B-2 のいずれかをご使用ください。

※ : B-2 は電気泳動用の比重剤、色素を含みます。

| A : | Linear DNA | Plasmid DNA | PCR product |
|---------------|------------------|------------------|------------------|
| DNA 総量 | ≤ 1 µg | ≤ 1 µg | ≤ 0.2 µg |
| B : | 1 µl ~ 5 µl | 1 µl ~ 5 µl | 1 µl ~ 3 µl |
| C : | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| D : | up to 10 ~ 50 µl | up to 10 ~ 50 µl | up to 10 ~ 30 µl |

2. A ~ D をチューブに入れたら穏やかに混合し、スピンドウンします。

3. ウォーターバスやブロックインキュベータを用い、37°C で 5 分間インキュベートします。

| SpeedCut Apa I | Linear DNA | Plasmid DNA | PCR product |
|----------------|------------|-------------|-------------|
| 反応温度 | 37°C | | |
| 反応時間 | 5 分 | | |

Note :

- (1) Star 活性が出やすくなるため、16 時間以上の反応は避けてください。
- (2) 2 種以上の複数の酵素で同時に反応する場合、加える酵素の量は反応液量の 1/10 を超えないように注意してください。もし、各酵素の反応温度が異なる場合は、低反応温度 → 高反応温度の順番で酵素を加えて反応させてください (低温反応の酵素反応の終了後、高温反応の酵素を入れて反応)。
- (3) 10 × SpeedCut Green Buffer は蛍光による解析に影響を与えるため、切断した断片を蛍光検出などに用いる場合は無色の 10 × SpeedCut Buffer をご使用ください。
- (4) 10 × SpeedCut Green Buffer に沈殿が生じた場合、室温で 5 分間ボルテックスを行い、完全に溶解させた後ご使用ください。この操作は品質には影響しません。