



快速内切酶 PmlI

产品货号: F7510S

储存条件: -20°C



同裂酶: AclI, Eco72I, PspCI, BbrPI (注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。)

产品组成

组分	规格
LabFD™ PmlI	100 ul
10×LabFD™ Buffer	1 ml
10×LabFD™ Color Buffer	1 ml

产品简介

LabFD快速内切酶是一系列经过基因工程重组的快速限制性内切酶, 适用于质粒DNA、PCR产物或基因组DNA等的快速酶切。所有LabFD快速内切酶在通用的LabFD或 LabFD Color Buffer 中都具有优良的活性, 能够在5~15分钟内完成酶切。此外, LABLEAD去磷酸化、连接试剂在LabFD Buffer中均具有100%活性, 支持一管化反应, 提升“酶切-修饰-连接”的体验。LabFD 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。LabFD 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×LabFD buffer; 37°C温育; 参照“DNA 快速酶切流程”配制反应体系。

失活条件: 80°C温育 20 min。

质量控制

功能活性检测

37°C下, 在 20ul 反应体系中, 1ul LabFD™ PmlI 能够在 15min 内完全消化 1ug λHindIII。

超长时间温育检测

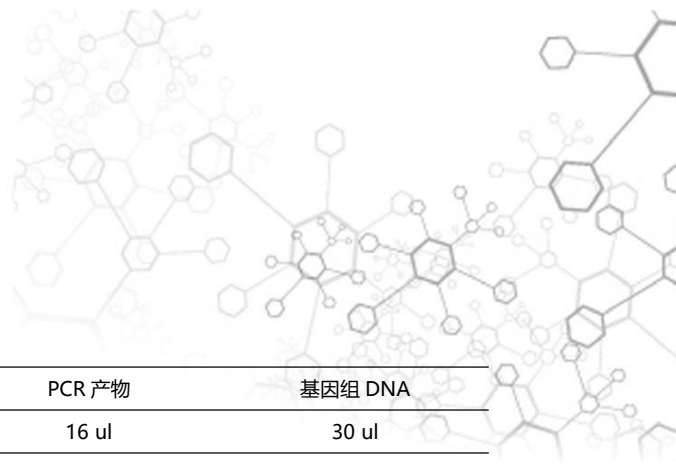
37°C下, 在 20ul 反应体系中, 将1ul LabFD™ PmlI与1ug λHindIII共同温育 3h, 未检测到其他核酸酶污染或星号活性引起的底物非特异性降解, 更长时间酶切可能出现星号活性。

酶切-连接-再酶切检测

37°C下, 使用 10倍酶量的 LabFD™ PmlI消化 DNA 底物, 回收酶切产物, 在 22°C下使用 T4 DNA Ligase (Fast) 可以将超过95%的酶切产物重新连接。将连接产物再次回收后, 使用相同的内切酶可以重新切开95%以上的连接产物。

注: 盐浓度高于 10 mM 时酶活受到抑制, 请避免使用含有较多盐离子的 DNA 底物。





使用方法

1. DNA 快速酶切流程

(1) 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH ₂ O	15 ul	16 ul	30 ul
10×LabFD Buffer 或 10×LabFD Color Buffer	2 ul	3 ul	5 ul
底物 DNA	2ul (up to 1 ug)	10 ul (~0.2 ug)	10 ul (5 ug)
LabFD™ PmlI	1 ul	1 ul	5 ul
Total	20 ul	30 ul	50 ul

注：本体系适用于经过纯化的PCR产物酶切。未纯化的PCR产物具备一定的离子强度，10×LabFD Buffer 加入量可适当减少至2 μl。但由于DNA聚合酶同时具有外切酶活性，会影响酶切产物，因此如下一步需进行克隆等操作，建议酶切前对PCR产物进行纯化。

- (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15 min（质粒），或15~30 min（PCR产物），或30~60 min（基因组DNA）；
- (4) 80°C温育 20 min 即可使酶失活，终止反应（可选）；
- (5) 如果使用LabFD™ Color Buffer进行酶切反应，得到的产物可以直接进行上样电泳。

2. 双酶切或多酶切

- (1) 每种快速内切酶的用量为1 μl，并根据需要适当扩大反应体系；
- (2) 所有快速内切酶的体积总和不得超过总反应体系的1/10；
- (3) 如果所用的几种快速内切酶的最适反应温度不同，应先以最适温度低的酶开始酶切，再添加最适温度较高的酶，在其最适反应温度下进行酶切反应。

3. 适用于质粒的扩大反应体系

DNA	1 ug	2 ug	3 ug	4 ug	5 ug
LabFD™ PmlI	1 ul	2 ul	3 ul	4 ul	5 ul
10×LabFD Buffer 或 10×LabFD Color Buffer	1 ul	2 ul	3 ul	4 ul	5 ul
Total	20 ul	20 ul	30 ul	40 ul	50 ul

注：如果总反应体系大于 20 μl，应适当增加温育时间，尽量使用水浴、金属浴或沙浴。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
3	0	0	0	0	0	0	10

甲基化修饰影响

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

在不同反应缓冲液中的活性

	LabFD™ Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart® Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	< 12.5%	100%	< 12.5%

注：活性数据来自 LABLEAD 限制酶标准反应体系下的检测。

