

Pcil

REF: EG25514S

5'...**A**C A T G T...3'
3'...T G T A C **A**...5'

同裂酶: PsciI

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。

37 EK EB 80

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
Pcil (10 U/μl)	20 μl
10× Cut Buffer C	1 ml

产品简介

Pcil 属于 Type IIP 型限制性内切酶, 来源于柠檬色动性球菌 (*Planococcus citreus*), 经大肠杆菌重组表达后获得。Pcil 使用专属反应缓冲液 Cut Buffer C, 可实现快速酶切; 可兼容 Cutone® 缓冲液进行双酶切, 但长时间反应可能出现星号活性。

建议反应条件

1× Cut Buffer C;
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 50 μl 反应体系中, 37°C 1 h 内完全酶切 1 μg p615 所需的酶量。

质量控制

功能活性检测

37°C 下, 10 U Pcil 能够在 15 min 内完全消化 1 μg p615。

超长时间温育检测

37°C 下, 将 10 U Pcil 与 1 μg p615 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 10 U Pcil 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连接产物。

图标注释

- 37 最适反应温度为 37°C
- EK 对于被 EcoKI 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
- EB 对于被 EcoBI 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
- 80 失活条件为 80°C 温育 20 min

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× Cut Buffer C	5 μl
底物 DNA ^a	1 μg
Pcil (10 U/μl)	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 Pcil 酶活性;

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~1 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 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;

② 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。

③ Pcil 可以和其他 LightNing® 系列限制酶使用 CutOne® 缓冲液进行双酶切, 但不建议长时间 (超过 3 h) 反应。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
2	0	1	1	1	0	3	9

甲基化修饰影响

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

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	50%	< 12.5%	50%	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。