

Cruiser™ Enzyme

■ 组份列表

产品组份	规格		
	50 rxns(GP0104)	100 rxns(GP0105)	250 rxns(GP0106)
Cruiser™ Enzyme	50µl	100µl	250µl
5xCruiser™ Buffer	150µl	300µl	600µl
6xStop Buffer	150µl	300µl	600µl

贮存条件:将 Cruiser™ 核酸酶置于-20℃保存,且避免污染;

将 Stop buffer、5xCruiser™ Buffer 置于 2~8℃。若长期储存时,应将试剂盒置于-70℃保存。

■ 操作步骤

1.DNA 的杂交

若获得目的片段来源于混合模板,即同时含有野生型、突变型,则退火后即获得杂交 DNA 片段;若获得的目的片段来源于单一模板,则需要单独制备相应的野生型片段,两者经 DNA 纯化后,等质量混合,再经热变性/自然冷却,获得杂交片段。实验步骤如下:

1) 将实验组的野生型 DNA 和突变型 DNA 按照以下体系加入 0.2-ml PCR 反应管中:

野生型 DNA	120ng
突变型 DNA	120ng
<hr/>	
总体积	7µl

2) 将 PCR 反应管置于 PCR 仪中 98℃ 孵育 3min。

3) 孵育后,不要打开 PCR 仪的盖子,将 PCR 反应管留在 PCR 仪中放置 10min 以上,自然冷却(待其温度下降至 40℃ 以下)。

2.Cruiser™ 酶切

1) 取新的 0.2-ml 的 PCR 反应管,分别加入 Cruiser™ 核酸酶和 5xCruiser™ 缓冲液,总体积为 10µl,涡旋震荡或移液器吹打混匀,此步骤应避免长时间处于室温或 37℃。酶切体系如下:

Cruiser™ 核酸酶	1µl
5xCruiser™ 缓冲液	2µl
杂交后的 DNA	240ng
<hr/>	
总体积	10µl

2) 置于 PCR 仪中 45℃ 孵育 15~20min。

3) 酶切步骤结束后,应向上述 10 µl 反应体系内加入 2µl 6×Stop Buffer,随后进行琼脂糖电泳检测或置于-20℃保存。当酶切后片段预计<500 bp 时,推荐使用 1.5%~2%的琼脂糖凝胶电泳,若酶切片段的尺寸相近且需要将其分开显示,可提高琼脂糖凝胶浓度并延长电泳时间,凝胶最大浓度推荐≤2.5%。