

FastCut EcoRI

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8162	FastCut EcoRI	600 rxns

产品简介:

FastCut 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 FastCut 快速内切酶在通用的 FastCut 或 FastCut Color Buffer 中都具有优良的活性, 能够在 5~15 分钟内完成酶切。此外去磷酸化、连接试剂在 FastCut 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。

FastCut 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。FastCut 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。

识别位点:

GAATTC

5'...G ↓ A A T T C...3'

3'...C T T A A ↑ G...5'

同裂酶: FunII

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
FastCut EcoRI	600 μl
10× FastCut Buffer	2x1 ml
10× FastCut Color Buffer	2x1 ml

保存条件:

-20°C保存, 2 年有效。

建议反应条件:

1× FastCut 缓冲液;

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。

功能活性检测:

37°C下, 在 20 μl 通用 FastCut 反应体系中, 1 μl FastCut EcoRI 能够在 15 min 内完全消化 1 μg λDNA。

超长时间温育检测:

37°C下, 在 20 μl 通用 FastCut 反应体系中, 将 1 μl FastCut EcoRI 与 1 μg λDNA 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。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 FastCut EcoRI 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约 95%以上的连接产物。

非特异性内切酶活性检测:

37°C下, 在 20 μl 通用 FastCut 反应体系中将 1 μl FastCut EcoRI 与 1 μg 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 10%的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

蓝白斑检测:

使用 1 μl FastCut EcoRI 消化含有 lacZα 基因且仅在该基因上具有 1 个酶切位点的特定载体。将酶切产物重新连接后转化到大肠杆菌感受态细胞中, 涂布在含有 X-gal、IPTG 和相应抗生素的 LB 平板培养基上生长。成功连接的 β-半乳糖苷酶基因可以正确表达, 并生长出蓝色菌落; 而因酶切末端降解等原因未能重新连接的产物将得到白色菌落。对于 FastCut

系列限制酶而言，白色菌落的比例应当小于 1%。

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	15μl	16μl	30μl
10× FastCut Buffer 或 10× FastCut Color Buffer	2μl	3μl ^a	5μl
底物 DNA	2μl (up to 1μg)	10μl (~0.2μg)	10μl (5μg)
FastCut EcoRI	1μl	1μl	5μl
Total	20μl	30μl	50μl

a. 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× FastCut 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，停止反应（可选）；
- ⑤ 如果使用 FastCut 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	1μg	2μg	3μg	4μg	5μg
FastCut EcoRI	1μl	2μl	3μl	4μl	5μl
10× FastCut Buffer	2μl	2μl	3μl	4μl	5μl

或 10×FastCut Color Buffer

Total	20µl	20 µl	30µl	40 µl	50 µl
-------	------	-------	------	-------	-------

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
5	0	1	1	1	1	1	5

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	剪切受影响

在不同反应缓冲液中的活性

	FastCut Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB rCutSmart™ Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

注：活性数据来自限制酶标准反应体系下的检测。

注意事项：

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！