

MinuteCut™ EcoR V说明书

酶切位点

5'...GAT▼ATC...3'

3'...CTA▲TAC...5'



同裂酶：Eco32I

* 同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。

					
快速内切酶，可在 5~15 分钟内完成反应	最适反应温度为 37°C	失活条件为 80°C 温育 20 分钟	3 小时温育未表现星号活性，更长时间酶切可能出现星号活性	受 CpG 甲基化影响	受 EcoBI 甲基化影响

产品组成

Cat. No.	6005200
MinuteCut™ EcoR V	200 µl
10×MinuteCut™ Buffer	1.5 ml
10×MinuteCut™ Red Buffer	1.5 ml
10×Loading Buffer	1.5 ml
说明书	1 份

产品储存

- 20°C 保存,有效期为两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部: e-mail: technical@simgen.cn, 电话: 400-0099-857。

产品介绍

MinuteCut™ 快速内切酶是经过基因工程重组,能够在 5~15 分钟内快速、精确地完成 DNA 切割的限制性内切酶,适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 的快速酶切。所有 MinuteCut™ 快速内切酶系列产品均可共用一种 10×MinuteCut™ Buffer 或 10×MinuteCut™ Red Buffer,大大简化酶切反应体系。此外,本公司的去磷酸化、连接试剂在 MinuteCut™ 酶切 Buffer 中具有 100%活性,支持一管化反应,提升“酶切-修饰-连接”的体验。

质量控制

功能活性检测

最适反应温度下,在 20 µl 反应体系中,1 µl MinuteCut™ EcoR V 能够在 5 分钟内完全消化 1 µg λDNA。

超长时间温育检测

最适反应温度下,在 20 µl 反应体系中,将 1 µl MinuteCut™ EcoR V 与 1 µg λDNA 共同温育 3 小时,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。

非特异性内切酶活性检测

最适反应温度下,在 20 µl 反应体系中,将 1 µl MinuteCut™ EcoR V 与 1 µg 不含该酶切位点的超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 小时,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。

注意事项

1. 10×MinuteCut™ Red Buffer 可能会干扰酶切产物的荧光分析。因此，酶切产物荧光分析检测时推荐使用无色的 10×MinuteCut™ Buffer。
2. DNA 酶切 5 分钟仍不能被切开，说明 DNA 含有抑制内切酶活性的抑制物，可选用 Simgen DNA 纯化试剂盒（Cat. No. 2101050）对 DNA 进行纯化后再进行酶切。
3. 如果从野生型的大肠杆菌或者是非限制性内切酶缺陷型（endA+）的宿主菌（比如 BL21、HB101 等）中提取的质粒 DNA 用作酶切，可能会出现酶切产物拖尾的现象，可选用 Simgen DNA 纯化试剂盒（Cat. No. 2101050）对质粒 DNA 进行纯化后再进行酶切。
4. 不建议进行 3 小时以上酶切，易导致星活性。

操作步骤

1. DNA 快速酶切

① 在冰上按下表配置反应体系

	质粒 DNA	线性 DNA	PCR 产物 ^{*1}
DNA	≤1 μg	≤1 μg	≤0.2 μg
MinuteCut™ EcoR V	1 μl	1 μl	1 μl
10×MinuteCut™ Buffer 或 10×MinuteCut™ Red Buffer ^{*2}	2 μl	2 μl	3 μl
ddH ₂ O	加至 20 μl ^{*3}	加至 20 μl ^{*3}	加至 30 μl ^{*3}

^{*1} 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，且残留的 Taq 酶具有外切酶活性，会直接影响 DNA 酶切的精确度。因此如果酶切产物后续需进行克隆等操作，推荐用 Simgen DNA 纯化试剂盒（Cat. No. 2101050）对 PCR 产物进行纯化后再进行酶切。

^{*2} 反应体系不同，10×Buffer 的添加量不同，请确保终浓度为 1×。

^{*3} 若需要酶切的 DNA 大于推荐用量，可按比例增加各组分的用量。

- ② 轻轻吹打或轻弹管壁混匀，低速离心数秒使液体聚集到离心管管底。
- ③ 37°C 温育 5-15 分钟（PCR 产物和基因组 DNA 温育 5 分钟，质粒温育 15 分钟）。
- ④ 可选步骤：80°C 孵育 20 分钟，使酶失活。
- ⑤ 将酶切产物直接电泳（使用 10×MinuteCut™ Red Buffer）或与 10×Loading Buffer 混合后（使用 10×MinuteCut™ Buffer）电泳。

^{*} 若未进行步骤 4 操作就直接电泳，则电泳过程中内切酶可能会出现星活性，导致酶切产物电泳呈现涂抹带。因此即使使用的是 10×MinuteCut™ Red Buffer，也需与 10×Loading Buffer 混合后再进行电泳分析（10×Loading Buffer 中含有 SDS，可使内切酶失活）。

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。
- ^{*} 比如常用的双酶切体系需要在至少 20 μl 的反应体系中酶切；三酶切体系则需要在至少 30 μl 的反应体系中酶切。
- 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。

在不同反应缓冲液中的活性

	MinuteCut™ Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart® Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

^{*} 活性数据来自 Simgen 限制性内切酶标准反应体系下的检测。