

## FlyCut® EcoRV

使用前请仔细阅读说明书

目录号: JE301

保存: -20°C保存两年。

浓度: 20000 units/ml

### 产品说明

本产品由重组 EcoRV 基因的载体, 在大肠杆菌中经诱导表达、纯化而成, 分子量大小为 29.5 kDa, 识别位点为: GAT<sup>↓</sup>ATC。反应温度为 37°C, 热失活条件为 65°C加热 20 分钟。对 dam, dcm 甲基化不敏感, 对哺乳动物 DNA 的 CpG 甲基化敏感。

### 特点

- 5 分钟快切。
- 通用缓冲液。
- 无星号活性。

### 适用范围

基因组 DNA, 质粒 DNA, PCR 产物。

### 产品组成

Component	JE301-01	JE301-02
FlyCut® EcoRV	2000 units	2×2000 units
10×FlyCut® Buffer	500 µl	1 ml
10×DNA Loading Buffer	1 ml	1 ml

### 活性定义

1 单位是指 50 µl 反应体系中, 37°C时 1 小时完全消化 1 µg λDNA 所需的酶量。

### 质量控制

**连接和再切:** 10 倍过量 FlyCut® EcoRV 消化, 95% 以上的 DNA 片段能够在 25°C条件下用 T4 DNA 连接酶连接, 连接后的片段 95% 可以被切开。

**16 小时孵育:** 10 单位酶在 50 µl 反应体系中与 1 µg DNA 孵育 16 小时, 效果与 1 单位酶孵育 1 小时的带型一样。

**酶切末端完整性:** 酶切、连接含 LacZα基因 (唯一位点) 的质粒转化于涂有 X-gal/IPTG 的平板上, β- 半乳糖苷酶的成功表达是检测基因在克隆后保持完整性的标准。蓝色菌落表示基因的完整, 白色菌落表示基因被破坏, 经酶消化后的白色菌落必须少于 3%。

**核酸外切酶活性:** 50 µl 反应体系中, 100 单位酶与 1 µg <sup>3</sup>H 标记的 DNA (PCR 纯化产物), 在 37°C条件下, 孵育 4 小时, 释放不超过 0.1% 的放射性物质。

**核酸内切酶活性:** 50 µl 反应体系中, 15 单位酶与 1 µg pBR322 DNA 在 37°C条件下, 孵育 4 小时, RFI 型转变为 RFII 型的比例不超过 10%。

### 酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM DTT, 400 µg/ml BSA, 50% Glycerol

### 10×FlyCut® Buffer

500 mM Tris-Ac pH 7.9, 1 M KAc, 120 mM MgAc<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA

### 推荐单酶切反应体系

Component	Volume	Volume
DNA	≤1 µg	1-2 µg
10×FlyCut® Buffer	2 µl	5 µl
FlyCut® EcoRV	0.5 µl	1 µl
Nuclease-free Water	Variable	Variable
Total volume	20 µl	50 µl

### 识别位点

5'...GAT<sup>↓</sup>ATC...3'

3'...CTA<sup>↑</sup>TAG...5'



使用前请将 *FlyCut*<sup>®</sup> Buffer 充分混匀；

酶切不完全或酶切 2 μg 以上的 DNA 时，适当增加酶量，但总酶量不超过体系的 1/10。

不同 DNA 由于其结构不同会导致酶切的效果不同，因此可根据酶切效果调整反应时间。

#### 反应条件

37°C 孵育 5-15 分钟；终止反应时，可加入 10×DNA Loading Buffer 至终浓度 1×，或者 65°C 加热 20 分钟。

#### 推荐双酶切反应体系

Component	Volume
DNA	≤2 μg
10× <i>FlyCut</i> <sup>®</sup> Buffer	5 μl
<i>FlyCut</i> <sup>®</sup> Enzyme I	1 μl
<i>FlyCut</i> <sup>®</sup> Enzyme II	1 μl
Nuclease-free Water	Variable
Total volume	50 μl

使用前请将 *FlyCut*<sup>®</sup> Buffer 充分混匀；

酶切不完全或酶切 2 μg 以上的 DNA 时，适当增加酶量，但总酶量不超过体系的 1/10。

不同 DNA 由于其结构不同会导致酶切的效果不同，因此可根据酶切效果调整反应时间。

#### 反应条件

在推荐反应温度下，孵育 5-15 分钟。终止反应时，可加入 10×DNA Loading Buffer 至终浓度为 1×，或者加热失活。

如果两种酶反应温度不同，参考“双酶切反应注意事项”。

#### 双酶切反应注意事项

*FlyCut*<sup>®</sup> Buffer 能使任意两种酶在其中保证 100% 活性并降低星号活性的影响。

- 按照推荐条件建立反应体系。反应体系中甘油的浓度应 < 5% 以避免星号活性。例如：50 μl 反应体系中总酶量不超过 5 μl。
- 在推荐反应温度、时间下孵育，双酶切反应不建议孵育过夜。
- 如果两种酶反应温度不同，加入第一种酶在推荐的温度下孵育，如 SmaI (推荐反应温度 25°C)，热失活第一种酶后再加入第二种酶，按推荐温度孵育。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

