

FuniCut™ EcoRV

产品信息

产品名称	产品编号	规格
FuniCut™ EcoRV	15011ES70	200 T

产品描述

FuniCut™系列内切酶是通过基因工程重组技术，可在 5~15 min 内精确完成 DNA 切割的快速限制性内切酶，适用于快速切割质粒 DNA、PCR 产物、基因组 DNA 等。FuniCut™系列快速内切酶共用一种酶切缓冲液，从而简化了酶切反应体系，另外，有良好的酶活冗余度，可轻松处理底物过量或困难模板的酶切。

产品组分

组分编号	组分名称	产品规格
15011-A	FuniCut™ EcoRV	200 μL
15011-B	10×FuniCut™ Buffer	2×1 mL
15011-C	10×FuniCut™ Color Buffer	2×1 mL

运输与保存方法

冰袋运输。-20°C 保存，有效期 2 年。

识别位置

5'-GAT↓ATC-3'

3'-CTA↑TAG-5'

推荐反应条件

1× FuniCut™ 缓冲液；

最适 37°C 孵育。

失活条件

80°C 孵育 20 min。

注意事项

- 1) 3 h 孵育未表现星号活性，延时酶切可能出现星号活性；
- 2) 受 EcoBI 甲基化影响，序列可能重叠，剪切可能受影响；
- 3) 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作；
- 4) 本产品仅作科研用途！

质量控制

- 1. 功能活性检测:** 最适反应温度下, 在 20 μL 反应体系中, 1 μL 酶能够在 15 min 内完全消化 1 μg λDNA 。
- 2. 超长时间孵育检测:** 最适反应温度下, 将 1 μL 酶与 1 μg λDNA 共孵育 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, 但延长孵育时间可能出现星号活性。
- 3. 酶切-连接-再酶切检测:** 最适反应温度下, 使用 1 μL 酶消化底物, 回收酶切产物, 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 下使用适量 T4 DNA 连接酶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。
- 4. 非特异性内切酶活性检测:** 最适反应温度下, 将 1 μL 酶与 1 μg 超螺旋质粒 DNA 共同孵育 4 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 质粒 DNA 仍然处于超螺旋状态。
- 5. 蓝白斑检测:** 将含有单一 *lacZa* 基因的载体以 1 μL 酶消化, 重新连接后转化入大肠杆菌感受态细胞, 涂布在含有对应抗生素、IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基平板上。连接正确的产物会生长出蓝色菌落, 而连接错误 (即 DNA 末端切口不完整) 的产物将得到白色菌落。对于 FuniCut™ 系列限制酶而言, 白色菌落比例应小于 1%。

使用方法

1. DNA 快速酶切流程

1) 按如下建议的加样顺序配制体系反应液 (冰上操作):

组分	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH ₂ O	15 μL	16 μL	30 μL
10 \times FuniCut™ Buffer 或 10 \times FuniCut™ Color Buffer	2 μL	3 μL^*	5 μL
底物 DNA	2 μL (~1 μg)	10 μL (~0.2 μg)	10 μL (5 μg)
FuniCut™ EcoRV	1 μL	1 μL	5 μL
Total	20 μL	30 μL	50 μL

*本体系指已纯化后的 PCR 产物。未纯化的 PCR 产物具备一定的离子强度, 10 \times FuniCut™ Buffer 加入量可适当减少至 2 μL 。若下一步进行克隆等实验, 酶切前需纯化 PCR 产物。

- 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 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min (质粒), 或 15~30 min (PCR 产物), 或 30~60 min (基因组 DNA)。
- 4) 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 即可使酶失活, 停止反应 (可选)。

2. 双酶切或多酶切

- 1) 每种内切酶的用量为 1 μL , 并根据需要适当扩大反应体系。
- 2) 所有内切酶的体积总和不得超过总反应体系的 1/10。
- 3) 如果选用的几种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, 以较高的温度进行孵育。

3.质粒的扩大反应体系

组分	体积 (20 μL)	体积 (20 μL)	体积 (50 μL)
DNA	1 μg	2 μg	5 μg
FuniCut™ EcoRV	1 μL	2 μL	5 μL
10×FuniCut™ Buffer 或 10×FuniCut™ Color Buffer	2 μL	2 μL	5 μL
Total	20 μL	20 μL	50 μL

【注】: 如果总反应体系大于 20 μL, 可使用水浴、金属浴或沙浴, 并增加孵育时间。

不同 DNA 中的识别位点数

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
21	0	1	1	0	1	0	9

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	无影响	无影响	序列可能重叠 剪切可能受影响

不同反应缓冲液中的活性

反应缓冲液	FuniCut™ Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart® Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

【注】: 活性数据来自翌圣生物限制酶标准反应体系下的检测。

同裂酶

Eco32I

【注】: 同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。