

## FastCut KpnI

| 产品编号    | 产品名称         | 包装规格     |
|---------|--------------|----------|
| NBS8175 | FastCut KpnI | 200 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:

GGTACC

5'...G G T A C ↓ C...3'

3'...C ↑ C A T G G...5'

异裂酶: Asp718I, Acc65I

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 KpnI             | 200 µl |
| 10× FastCut Buffer       | 2x1 ml |
| 10× FastCut Color Buffer | 2x1 ml |

### 保存条件:

-20℃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:**

不可热失活, 请使用酚氯仿抽提或柱纯化。

**功能活性检测:**

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

**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 KpnI 与 1 µg λDNA (HindIII digest) 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 KpnI 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 KpnI 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 KpnI 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 <sub>2</sub> O                            | 15μl            | 16μl             | 30μl       |
| 10× FastCut Buffer 或 10× FastCut Color Buffer | 2μl             | 3μl <sup>a</sup> | 5μl        |
| 底物 DNA                                        | 2μl (up to 1μg) | 10μl (~0.2μg)    | 10μl (5μg) |
| FastCut KpnI                                  | 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 酚氯仿抽提或柱纯化（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 KpnI       | 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 |
|------|-------|--------|-------|----------|------|------------|--------|
| 2    | 0     | 0      | 1     | 1        | 1    | 1          | 8      |

### 甲基化修饰影响

| Dam | Dcm | CpG | EcoKI | EcoBI |
|-----|-----|-----|-------|-------|
| 无影响 | 无影响 | 无影响 | 无影响   | 无影响   |

### 在不同反应缓冲液中的活性

|    | FastCut Buffer | Thermo Scientific<br>FastDigest Buffer | NEB<br>rCutSmart™ Buffer | Takara<br>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！