

## FastCut AflII

| 产品编号    | 产品名称          | 包装规格    |
|---------|---------------|---------|
| NBS8132 | FastCut AflII | 100rxns |

### 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: CTTAAG

5'...C↓TTAAG...3'

3'...GAATT↑C...5'

同裂酶: BspTI, BfrI, BstAfl, MspCI, Vha464I

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 AflII           | 100 µl |
| 10×FastCut Buffer       | 1 ml   |
| 10×FastCut Color Buffer | 1 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:**

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 AflIII 能够在 15 min 内完全消化 1 µg EPE DNA。

**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 AflIII 与 1 µg EPE DNA 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 AflIII 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。

**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 AflIII                                | 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℃温育 15 min（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）；                                                                                 |      |      |      |
| ④ 80℃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 AflII                                   | 1μl  | 2μl   | 3μl  | 4μl   | 5μl   |
| 10× FastCut Buffer<br>或 10×FastCut Color Buffer | 2μl  | 2μl   | 3μl  | 4μl   | 5μl   |
| 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 |
|------|-------|--------|-------|----------|------|------------|--------|
| 3    | 2     | 0      | 0     | 0        | 1    | 0          | 4      |

## 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<br>Buffer | Thermo Scientific<br>FastDigest Buffer | NEB<br>rCutSmart™ Buffer | Takara<br>QuickCut™ Buffer |
|----|-------------------|----------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 活性 | 100%              | 75%                                    | 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！