

## FastCut PacI

| 产品编号    | 产品名称         | 包装规格    |
|---------|--------------|---------|
| NBS8189 | FastCut PacI | 25 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:

TTAATTAA

5'...TTAAT↓TAA...3'

3'...AAT↑TAATT...5'

### 产品组成:

| 组分                       | 规格    |
|--------------------------|-------|
| FastCut PacI             | 25 µl |
| 10× FastCut Buffer       | 1 ml  |
| 10× FastCut Color Buffer | 1 ml  |

### 保存条件:

-20°C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 PaeI 能够在 15 min 内完全消化 1 µg pPaeI 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 PaeI 与 1 µg pPaeI 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 PaeI 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 PaeI 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。

**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×<br>FastCut Color Buffer | 2μl             | 3μl <sup>a</sup> | 5μl        |
| 底物 DNA                                           | 2μl (up to 1μg) | 10μl (~0.2μg)    | 10μl (5μg) |
| FastCut Pacl                                     | 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 80°C 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 Pacl                                     | 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 |
|------|-------|--------|-------|----------|------|------------|--------|
| 0    | 0     | 0      | 0     | 0        | 0    | 1          | 1      |

**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%              | 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！