

FastCut PspGI (EcoRII)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8192	FastCut PspGI (EcoRII)	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：

CCWGG

5'...↓C C W G G ...3'

3'... G G W C C↑...5'

同裂酶：EcoRII, Psp6I, AjiI

异裂酶：BciT130I, BseBI, Bst2UI, BstNI, MvaI

注：同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。

产品组成：

组分	规格
FastCut PspGI (EcoRII)	200 µl
10× FastCut Buffer	2x1 ml
10× FastCut Color Buffer	2x1 ml

保存条件:

-20°C保存, 2 年有效。

建议反应条件:

1× FastCut 缓冲液;

75°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:

75°C下, 在 20 µl 通用 FastCut 反应体系中, 1 µl FastCut PspGI (EcoRII)能够在 15 min 内完全消化 1 µg λDNA (Dcm-)。

超长时间温育检测:

75°C下, 在 20 µl 通用 FastCut 反应体系中, 将 1 µl FastCut PspGI (EcoRII)与 1 µg λDNA (Dcm-)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:

75°C下, 使用 10 倍酶量的 FastCut PspGI (EcoRII)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 PspGI (EcoRII)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 ₂ O	15μl	16μl	30μl
10× FastCut Buffer 或 10× FastCut Color Buffer	2μl	3μl ^a	5μl
底物 DNA	2μl (up to 1μg)	10μl (~0.2μg)	10μl (5μg)
FastCut PspGI (EcoRII)	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 75°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 PspGI (EcoRII)	1μl	2μl	3μl	4μl	5μl
10× FastCut Buffer 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
71	2	6	5	5	17	7	136

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	剪切受阻	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 FastDigest Buffer	NEB rCutSmart™ Buffer	Takara 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！