

EcoRI, ADCF

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8232	EcoRI, ADCF	5000 U (20 U/μl)

产品简介:

EcoRI, ADCF 经过基因工程重组, 能够在 15 min~1 h 内精确完成质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的酶切。

本品的发酵重组表达、纯化、制剂等各个环节, 都不使用包含动物来源的成分, 也未使用抗生素。

识别位点:

GAATTC

5'...G↓AATTC...3'

3'...CTTAA↑G...5'

同裂酶: FnuII

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。

注: ADCF(animal derived component free), 不含动物源性相关组分。

产品组成:

组分	规格
EcoRI, ADCF	5000 U (20 U/μl)
10× FastCut™ Buffer (ADCF)	2×1 ml

保存条件:

-20℃保存, 2 年有效。

特性和用法:

- 生产全程无动物源性成分

- 质量标准更高，严格控制宿主残留
- 满足疫苗生产要求

失活条件：

80°C温育 20 min。

甲基化敏感性：

对于被 CpG 甲基化的 DNA，剪切可能受阻，
对于被 EcoBI 甲基化的 DNA，剪切可能受阻。

活性定义：

1 活性单位 (U) 是指在 50 μ l 反应体系中，37°C 1 h 内完全酶切 1 μ g λ DNA 所需的酶量。

蛋白纯度检测：

本品经 SDS-PAGE 检测纯度 $\geq 95\%$ 。

核酸内切酶残留检测：

将 20 U 酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37°C 温育 4 h，通过 DNA 电泳检测质粒无变化。

蓝白斑检测：

将含有单一 lacZ α 基因的载体以 1 μ l EcoRI, ADCF 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 ADCF 系列限制酶而言，白色菌落比例应小于 1%。

DNase 残留检测：

将 20 U 酶液与双链 DNA 底物在 37°C 温育 16 h，通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

RNase 残留检测：

将 20 U 酶液与 RNA 在 37°C 温育 1 h，通过电泳检测 RNA 无降解。

酶切 - 连接 - 再酶切检测:

最适反应温度下, 将 20 U 酶液消化底物, 回收酶切产物, 在 22°C 下使用适量 T4 DNA Ligase (Fast) 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。

宿主 DNA 残留检测:

将酶液中残留的核酸经 E.coli 16S rDNA 特异性的 TaqMan qPCR 检测, E.coli 基因组残留低于 10 pg。

宿主蛋白残留检测:

本品经 ELISA 法检测 E.coli 宿主蛋白含量 ≤ 50 ppm。

微生物限度检测:

本品经微生物计数法检测, 需氧菌总数 ≤ 5 cfu/ml, 霉菌和酵母菌 总数 ≤ 5 cfu/ml。

细菌内毒素残留检测:

本品细菌内毒素残留 < 0.5 EU/KU

使用方法:

① 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系:

组分	加入量
ddH ₂ O	up to 50 μ l
10 \times FastCut Buffer (ADCF)	5 μ l
底物 DNA ^a	1 μ g
EcoRI, ADCF	10~20 U
Total	50 μ l

a. DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐, 否则将会影响 EcoRI, ADCF 酶活性; 甲基化的 DNA 会抑制某些限制性内切酶酶切反应。

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~1 h, 一般推荐 5 U~10 U 酶/ μ g DNA、10 U~20 U 酶/ μ g 基因组 DNA, 温浴 1 h, 如需过夜酶切反应, 请将酶量调整至 1U;

- ④ 80℃温育 20 min 即可使酶失活，停止反应，或者通过吸附柱或苯酚/氯仿纯化终止反应；
- ⑤ 反应体系中加入的酶体积不应超过总体积的 10%，避免酶中过多的甘油引起星号活性；
- ⑥ 限制性内切酶存储缓冲液中的添加剂(例如甘油、盐)与底物溶液中的污染物(例如盐、EDTA 或乙醇等)相同，反应体积越小，酶切反应抑制效应越强；
- ⑦ 小体系推荐加样体系：

DNA	0.1 µg	0.5 µg
EcoRI, ADCF	1 U	5 U
10× FastCut Buffer (ADCF)	1 µl	2.5 µl
Total	10 µl ^b	25 µl

b. 为避免蒸发，10 µl 反应体系的孵育时间不应超过 1 h。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
5	0	1	1	1	1	1	5

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	剪切受影响	无影响	剪切受影响

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！