

GensCut EcoRV

5' ...GAT↓ATC...3'

3' ...CTA↑TAG...5'

目录号

GS00150

产品组成

组分	规格
GensCut EcoRV	200 μL
10×GensCut Buffer	2×1 mL
10×GensCut Color Buffer	2×1 mL

保存条件

-20°C保存 2 年。

产品简介

GensCut 快速内切酶是经过基因工程重组的限制性内切酶，可在 5~15 分钟内精确完成 DNA 切割，适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。GensCut 系列快速内切酶提供一种通用酶切 Buffer，简化酶切反应体系；同时具有良好的酶活冗余度，轻松应对底物过量或困难模板酶切。

产品特点

- 5~15min 内完成酶切反应；
- 一种通用的酶切 Buffer；
- 良好的酶活冗余度。

适用范围

适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。

注意事项

1. 酶切前建议对 PCR 产物进行纯化；
2. 3 h 温育未表现星号活性，延时酶切可能出现星号活性；
3. 受 EcoBI 甲基化影响，序列可能重叠，剪切可能受影响；
4. 所有内切酶的使用体积总和不得超过总反应体系的 1/10；
5. 失活条件为 80°C 温育 20min。

质量控制

1. 功能活性检测：最适反应温度下，在 20 μL 反应体系中，1 μL 酶能够在 15 min 内完全消化 1 μg λDNA 。
2. 超长时间温育检测：最适反应温度下，将 1 μL 酶与 1 μg λDNA 共孵育 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，但延长孵育时间可能出现星号活性。
3. 酶切-连接-再酶切检测：最适反应温度下，使用 1 μL 酶消化底物，回收酶切产物，在 22°C 下使用适量 T4 DNA 连接酶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。
4. 非特异性内切酶活性检测：最适反应温度下，将 1 μL 酶与 1 μg 超螺旋质粒 DNA 共同孵育 4h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，质粒 DNA 仍然处于超螺旋状态。
5. 蓝白斑检测：将含有单一 lacZ α 基因的载体以 1 μL 酶消化，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 GensCut 系列限制酶而言，白色菌落比例应小于 1%。

使用方法

1. DNA 的快速酶切

1) 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系；

组分	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH ₂ O	15 μL	16 μL	30 μL
10 \times GensCut Buffer /10 \times GensCut Color Buffer	2 μL	3 μL *	5 μL
底物 DNA	2 μL (\sim 1 μg)	10 μL (\sim 0.2 μg)	10 μL (5 μg)
GensCut EcoRV	1 μL	1 μL	5 μL
Total	20 μL	30 μL	50 μL

* :本体系指已纯化后的 PCR 产物。未纯化的 PCR 产物具备一定的离子强度，10 \times GensCut Buffer 加入量可适当减少至 2 μL 。若下一步进行克隆等实验，酶切前需纯化 PCR 产物。

- 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 孵育 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）。

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	1 μg	2 μg	3 μg	4 μg	5 μg
GensCut EcoRV	1 μL	2 μL	3 μL	4 μL	5 μL
10×GensCut Buffer					
/10×GensCut Color Buffer	2 μL	2 μL	3 μL	4 μL	5 μL
Total	20 μL	20 μL	30 μL	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 种的酶切位点数量

λ DNA	Φ X174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
21	0	1	1	0	1	0	9

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	无影响	无影响	序列可能重叠 剪切可能受影响

在不同反应缓冲液中的活性

缓冲液	GensCut Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart® Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

注意：活性数据来自金沙生物限制酶标准反应体系下的检测。

同裂酶

Eco32I；同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。