

版本号: M16B01V1.0



TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

EcoRI

目录号: RK21102

规格: 10,000 U / 50,000 U

浓度: 20,000 U/mL

产品组成:

EcoRI (20,000 U/mL)	RM21603
10X Buffer CutS	RM20103

产品说明

识别位点



活性定义

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

酶存储液

10 mM KPO₄, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 200 μ g/mL BSA, 50% Glycerol, 1 mM DTT, 0.15% Triton X-100, pH 6.5 @ 25°C

保存温度

-20°C

酶切反应条件

1X Buffer CutS, 37°C

1X Buffer CutS 组成

50 mM KAc, 20 mM Tris-HAc, 10 mM MgAc₂, 100 μ g/mL BSA, pH 7.9 @ 25°C

快切

是, 在推荐反应体系下孵育 5-15 min 可完全酶切底物

在 ABclonal 反应缓冲液中的活性

CutA	CutB	CutC	CutS
10%	100%	10%	100%

热失活

65°C 加热 20 min

甲基化敏感性

dam 甲基化	不敏感
dcm 甲基化	不敏感
CpG 甲基化	重叠时被阻断

操作说明

推荐的 EcoRI 酶切反应体系 (以 50 μ L 体系为例)

组分	加入量
ddH ₂ O	Up to 50 μ L
10X Buffer CutS	5 μ L
DNA*	1 μ g
EcoRI**	0.5-1 μ L

*, 注: 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 酶活性。

**, 注: 在 50 μ L 反应体系中, 0.5 μ L 的 EcoRI 酶可以完全酶切 1 μ g 的 DNA 底物, 但一般推荐使用 1 μ L。

◆ 37°C 孵育 5-15 min 可以完全酶切 DNA 底物。

质量控制

- ◆ SDS-PAGE 检测蛋白纯度大于 95%。
- ◆ 无核酸外切酶、核酸酶活性。
- ◆ PCR 检测无宿主基因组残留。

优化的限制性内切酶反应

限制性内切酶反应需要注意很多关键因素:合适的 DNA 底物量、合适的内切酶与反应缓冲液体积可以达到最佳的酶切反应; 50 μL 反应体系中 1 U 的限制性内切酶在推荐条件下孵育 1 hr 可以完全酶切 1 μg DNA 底物; 在酶切反应中, 酶:DNA:反应体系的体积比可以作为指导; 大多数研究者按下面所示“推荐的限制性内切酶酶切反应体系”进行实验, 对不同来源、质量和纯度的 DNA 样品, 推荐使用 5-10 倍的内切酶进行过度酶切反应。

推荐的限制性内切酶酶切反应

限制性内切酶	0.5 μL 是充足的, 一般使用 1 μL
DNA 底物	1 μg
10X ABclonal 缓冲液	5 μL
总体积	50 μL
孵育时间	1 hr*
孵育温度	根据最适酶切温度而定

*, 注: 使用快切限制性内切酶时可以将孵育时间缩短至 5-15 min。

1. 酶

- 从冰箱拿出后置于冰上。
- 在反应体系中最后加入酶组分。
- 可以通过移液器上下吹打或者“轻弹”反应管混匀, 然后在微型离心机中短暂离心。尽量不要旋涡混匀。
- 一般推荐 5-10 U 酶/ μg DNA、10-20 U 酶/ μg 基因组 DNA, 酶切 1 hr。

2. DNA

- DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐。推荐在 DNA 纯化过程中加入清洗步骤。
- 甲基化的 DNA 会抑制某些限制性内切酶酶切反应。

3. 反应缓冲液

- 使用 1X 浓度。
- 对于某些限制性内切酶需要在反应缓冲液中按推荐浓度加入 SAM (S-腺苷甲硫氨酸)。

4. 反应体积

- 推荐在 50 μL 反应体系下酶切 1 μg DNA 底物。
- 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。
- 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。

推荐的反应体系

反应体积	酶量*	DNA	10X ABclonal Buffer
10 μL **	1 U	0.1 μg	1 μL
25 μL	5 U	0.5 μg	2.5 μL
50 μL	10 U	1 μg	5 μL

*, 注: 对于小体积反应体系, 限制性内切酶应稀释后加入反应体系。

** , 注: 为避免蒸发, 10 μL 反应体系的孵育时间不应超过 1 hr。

5. 孵育时间

- 孵育时间推荐 1 hr。
- 使用过量的酶或者快切酶能减少孵育时间。
- 对于许多限制性内切酶, 可以使用更少的酶孵育, 但需延长孵育时间到 16 hr。

6. 终止反应

酶切后的 DNA 无后续实验, 可以按下述方法终止反应:

- 用终止液终止反应。向 50 μL 酶切反应体系中加入 10 μL 终止液。[1X 终止液: 2.5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl, 0.08% SDS, 0.02% Tartrazine, 0.001% Xylene Cyanol FF, pH 8.0 @ 25°C]

酶切后的 DNA 有后续实验, 可以按下述方法终止反应:

- 热失活。
- 通过吸附柱或苯酚/氯仿纯化。

7. 对照实验

如果酶切 DNA 底物时遇到困难, 我们推荐如下对照实验:

- 对照 DNA 底物: 选择含有限制酶识别位点的对照 DNA 底物 (一般使用含多个限制酶识别位点的 DNA, 例如 λ 或 PUC19 质粒 DNA)。
- 如果对照 DNA 能够被切开, 而实验 DNA 酶切障碍。对于这种情况, 可以将这两种 DNA 混合后进行酶切反应。如果实验 DNA 中含有酶切反应抑制物 (例如高浓度盐、EDTA 或苯酚等), 对照 DNA 也将不会被切开。