

## 产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		1,000 U	5,000 U
NcoI (10,000 U/mL)	RM21617	100 µL	500 µL
10x Buffer CutS	RM20103	1.25 mL	2 × 1.25 mL

## 产品说明

### 识别位点



### 活性定义

1 活性单位 (U) 是指在 50 µL 反应体系中, 37°C 1 hr 内完全酶切 1 µg λDNA 所需的酶量。

### 保存温度

-20°C

### 酶切反应条件

1X Buffer CutS, 37°C 反应

### 1X Buffer CutS

50 mM KAc, 20 mM Tris-HAc, 10 mM MgAc<sub>2</sub>,  
 100 µg/mL rHSA, 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

### 热失活

80°C 温育 20 min

### 甲基化敏感性

dam 甲基化	dcm 甲基化	CpG 甲基化
不敏感	不敏感	不敏感

## 操作说明

### 推荐的 NcoI 酶切反应体系 (以 50 µL 体系为例)

组分	加入量
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 µL
10X Buffer CutS	5 µL
DNA*	1 µg
NcoI**	1 µL

\* 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 NcoI 酶活性。

\*\* 注: 50 µL 反应体系中, 0.5 µL NcoI 可以完全酶切 1 µg 的 DNA 底物, 但一般推荐使用 1 µL。

◆ 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%。
- ◆ 无核酸外切酶和核酸酶活性。
- ◆ 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可以达到最佳的酶切效果。大多数研究者按下面所示“推荐限制性内切酶酶切反应”进行实验，对于不同来源、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体系

限制性内切酶	0.5 $\mu\text{L}$ 是充足的，一般使用 1 $\mu\text{L}$
DNA 底物	1 $\mu\text{g}$
10X ABclonal 缓冲液	5 $\mu\text{L}$
总体积	50 $\mu\text{L}$
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/ $\mu\text{g}$  DNA、10-20 U 酶/ $\mu\text{g}$  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的酶切反应。

### 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  $\mu\text{L}$  反应体系下酶切 1  $\mu\text{g}$  DNA 底物。
- 反应体系中加入的酶的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 $\mu\text{L}$ **	1 U	0.1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{L}$
25 $\mu\text{L}$	5 U	0.5 $\mu\text{g}$	2.5 $\mu\text{L}$
50 $\mu\text{L}$	10 U	1 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{L}$

\* 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  $\mu\text{L}$  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可减少孵育时间。
- 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  $\mu\text{L}$  酶切反应体系中加入 10  $\mu\text{L}$  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，推荐设置对照实验：

- 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  $\lambda$  DNA 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。