

EcoRI, ADCF

REF: EG22504S



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

同裂酶: FunII

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰可能具有不同敏感性。

储运条件

-20°C

产品组成

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

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。

活性定义

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

质量控制

蛋白纯度检测

本品经 SDS-PAGE 检测纯度 ≥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 lacZα 基因的载体以 1 μl 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。

图标注释

- 最适反应温度为 37°C
- 对于被 CpG 对甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
- 对于被 EcoBI 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
- 失活条件为 80°C 温育 20 min
- 按照推荐反应体系未出现星号活性
- 不含动物源性相关组分

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 CutOne™ 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°C 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 μ g	0.5 μ g
EcoRI, ADCF	1 U	5 U
10 \times CutOne™ Buffer (ADCF)	1 μ l	2.5 μ l
Total	10 μ l ^b	25 μ l

b. 为避免蒸发，10 μ l 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

λ DNA	Φ X174	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