

XhoI, GMP Grade

REF: GMP504S

5'...C T C G A G...3'
3'...G A G C T C...5'



同裂酶: PaeR7I, Sfr274I, SlaI

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。

储运条件

-20 ± 5°C 保存, 有效期 24 个月。运输条件: ≤ 0°C。

产品组成

| 组分 | 规格 |
|-----------------------------|--------|
| XhoI, GMP Grade (20 U/μl) | 1 ml |
| 10× Cut Buffer F, GMP Grade | 6×1 ml |

产品简介

XhoI, GMP Grade 由大肠杆菌重组表达获得, 能够在 15 min~1 h 内精确完成目标 DNA 酶切。本品采用符合 GMP 规范的生产与质量管理体系, 保证生产过程以及原辅料全程可追溯。整个生产过程不使用抗生素和任何动物来源的原料及辅料, 对宿主蛋白、外源 DNA、非特异性内切酶、DNase、RNase 等工艺相关杂质, 以及微生物限度、细菌内毒素等进行严格控制。本品满足疫苗与药物生产等领域对原辅料的要求。

活性定义

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

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白检测纯度不低于 95%。

超长时间温育 / 星号活性

37°C 下, 在 50 μl Cut Buffer F, GMP Grade 反应体系中, 将 20 U XhoI, GMP Grade 与 1 μg λDNA (HindIII digest) 共同温育 16 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。更长时间酶切可能出现星号活性。

非特异性内切酶活性

37°C 下, 在 50 μl Cut Buffer F, GMP Grade 反应体系中将 20 U XhoI, GMP Grade 与 1 μg 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 20% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

DNase 活性

37°C 下, 在 20 μl Cut Buffer F, GMP Grade 反应体系中将 20 U XhoI, GMP Grade 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 双链 DNA 片段无变化。

RNase 活性

37°C 下, 在 10 μl Cut Buffer F, GMP Grade 反应体系中将 20 U XhoI, GMP Grade 与 500 ng RNA 共同温育 1 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 不低于 90% 的 RNA 仍保持完整。

宿主 DNA 残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法, 本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量低于 10 拷贝 / 20 U。

宿主蛋白残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3412 大肠埃希菌菌体蛋白质残留量测定法, 本品中大肠杆菌菌体蛋白质残留量低于 50 ppm。

微生物限度检测

采用中国药典 2020 版四部通则 1105 非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法, 本品需氧菌总数 ≤ 5 cfu/ml, 霉菌和酵母菌总数 ≤ 5 cfu/ml。

细菌内毒素残留

采用中国药典 2020 版四部通则 1143 细菌内毒素检查法第一法凝胶法, 本品中细菌内毒素残留低于 0.5 EU/KU。

支原体检测

采用支原体检测试剂盒 (LAMP 法) 检测 20 U XhoI, GMP Grade, 结果为阴性。

重金属残留

采用中国药典 2020 版四部通则 0821 重金属检查法第一法, 本品重金属残留低于 10 ppm。

图标注释

- 最适反应温度为 37°C
- 对于被 CpG 甲基化的 DNA, 剪切可能受阻
- 失活条件为 80°C 温育 20 min
- 按照建议反应条件未出现星号活性, 更长时间孵育或提高限制酶终浓度可能出现星号活性
- 不含动物源性相关组分
- 生产过程符合 GMP 规范

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 Cut Buffer F, GMP Grade | 5 μ l |
| DNA ^a | 1 μ g |
| XhoI, GMP Grade (20 U/ μ l) | 1 μ l |
| Total | 50 μ l |

a. DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、去垢剂或高浓度盐，否则将会影响 XhoI 活性。

- 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 $^{\circ}$ C 温育 15 min~1 h。
- ④ 80 $^{\circ}$ C 温育 20 min 使酶失活，停止反应。

注意事项

- ① 加入的酶体积不应超过总体积的 10%，避免酶储存液中过多的甘油引起星号活性。
- ② 酶储存缓冲液中的添加剂（例如甘油、盐）与底物溶液中的污染物（例如盐、EDTA、乙醇等）相同，因此反应体积越小，酶切反应抑制效应越强。

不同 DNA 中的酶切位点数量

| λ DNA | Φ X174 | pBR322 | pUC57 | pUC18/19 | SV40 | M13mp18/19 | Adeno2 |
|---------------|-------------|--------|-------|----------|------|------------|--------|
| 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |

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 | 无影响 |