

EcoR I

使用说明书

货号/规格: E1024-A/800 rxns, E1024-B/2,500 rxns

识别位点:

5' G ↓ A A T T C 3'
3' C T T A A ↑ G 5'

产品简介

EcoR I 限制性内切酶可识别 G^AAATTC 位点, 于 37°C 下使用通用型缓冲液在 5-15 分钟内的切割效果最佳。

东盛限制性内切酶在 *Digest* 和 *Green* 反应缓冲液中均具备 100% 活性。

通用型 *Digest* 缓冲液可实现 5-15 分钟内快速完成 DNA 单酶切、双酶切或多酶切, 无需更换缓冲液或后续 DNA 纯化步骤。DNA 修饰酶 (如 *Klenow* 片段、*T4 DNA* 连接酶、碱性磷酸酶和 *T4 DNA* 聚合酶) 在缓冲液中均具有 100% 活性。因此, 在下游应用中使用的酶可直接添加至反应混合物中。较短的孵育时间和较优的通用型 *Digest* 缓冲液组成消除了星活性效应。

Green 缓冲液包括用于直接将酶切反应产品上样至凝胶的 1 种密度试剂和 2 种示踪染料。

产品组成

组分	E1024-A	E1024-B
EcoR I	800 μ L	500 μ L \times 5
10X <i>Digest</i> Buffer	1 mL \times 2	1 mL \times 5
10X <i>Green</i> Buffer	1 mL \times 2	1 mL \times 5

储存条件

保存于 -20°C。

特点

- 所有东盛限制性内切酶在通用型缓冲液中 100% 活性

- 与下游应用的 100% 缓冲液兼容性
- 5 - 15 分钟内即可完成酶切
- 直接上样至凝胶
- 无星活性

适用范围

- 分子克隆
- 限制位点作图
- 基因分型
- *Southern* 印迹
- 限制性片段长度多态性 (RFLP)
- SNP 分析

建议反应条件

- 1X *Digest Buffer* 或 1X *Green Buffer*
- 37°C 孵育。
- 1 μ L EcoR I 可酶切的最大量:
 - 1 μ g *lambda DNA*, 5 min
 - 1 μ g 质粒 DNA, 15 min
 - 0.2 μ g PCR 产物, 20 min
 - 1 μ g 基因组 DNA, 5 min, 或 5 μ g 基因组 DNA, 30 min

热失活

80°C 加热 5 min。

甲基化对酶切的影响

Dam: 从不重叠-无影响。

Dcm: 从不重叠-无影响。

CpG: 可能重叠-剪切受阻。

EcoKI: 从不重叠-无影响。

EcoBI: 可能重叠-无影响。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λ DNA	Φ X174	pBR322	pUC57	pUC18/19	pTZ19R/U	M13mp18/19
5	0	1	1	1	1	1

使用方法
不同 DNA 的快速酶切

① 室温下按以下顺序准备反应体系:

Component	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
Nuclease-free Water	15 μ L	17 μ L	30 μ L
10X Digest Buffer 或 10X Green Buffer	2 μ L	2 μ L	5 μ L
DNA	2 μ L (up to 1 μ g)	10 μ L (~0.2 μ g)	10 μ L (5 μ g)
enzyme	1 μ L	1 μ L	5 μ L
Total volume	20 μ L	30 μ L	50 μ L

② 温和混匀并瞬离。

③ 在 37°C 孵育 15 分钟(质粒和基因组 DNA), 或 20 分钟(PCR 产物)。

可选: 80°C 加热 5 min 使酶失活。

DNA 的双酶切或多酶切

- 反应混合物中酶的总体积不应超过总反应体积的 1/10。
- 每种酶用量为 1 μ L, 适当放大反应条件。
- 如果酶需要不同的反应温度, 从需要较低温度的酶开始, 然后加入第二种酶, 在较高的温度下孵育。

质粒 DNA 的扩大反应体系

Component	20- μ L rxn	20- μ L rxn	30- μ L rxn	40- μ L rxn	50- μ L rxn
DNA	1 μ g	2 μ g	3 μ g	4 μ g	5 μ g
enzyme	1 μ L	2 μ L	3 μ L	4 μ L	5 μ L
10X Digest Buffer 或 10X Green Buffer	2 μ L	2 μ L	3 μ L	4 μ L	5 μ L

Total volume	20 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	50 μ L
--------------	------------	------------	------------	------------	------------

注意: 注:若总反应量超过 20 μ L, 则增加孵育时间 3-5 min。使用水恒温器, 不建议使用空气恒温器, 因为热量传递到反应混合物的速度很慢。

本品仅供科学研究使用。