

FlyCut® NcoI

NcoI快速内切酶

使用前请仔细阅读说明书

目录号: JN101

版本号: Version 1.0

保存: -18℃及其以下温度下保存两年。

浓度: 20000 units/ml

产品说明

本产品由重组NcoI基因的载体, 在大肠杆菌中经诱导表达、纯化而成, 分子量大小为32.3 kDa, 识别位点为: C[^]ATGG。反应温度为37℃, 热失活条件为80℃加热20分钟。对dam, dcm和哺乳动物DNA的CpG甲基化不敏感。

特点

- 5分钟快切。
- 通用缓冲液。
- 无星号活性。

适用范围

基因组DNA, 质粒DNA, PCR产物。

产品组成	JN101-01	JN101-02
Component	500 units	2×500 units
FlyCut® NcoI	250 µl	250 µl
10×FlyCut® Buffer	1 ml	1 ml

10×DNA Loading Buffer

活性定义

1单位是指50 µl反应体系中, 37℃时1小时完全消化1 µg λDNA所需的酶量。

质量控制

连接和再切: 10倍过量FlyCut® NcoI消化, 95%以上的DNA片段能够在25℃条件下用T4 DNA连接酶连接, 连接后的片段95%可以被切开。

16小时孵育: 10单位酶在50 µl反应体系中与1 µg DNA孵育16小时, 效果与1单位酶孵育1小时的带型一样。

酶切末端完整性: 酶切、连接含LacZα基因(唯一位点)的质粒转化于涂有X-gal/IPTG的平板上, β-半乳糖苷酶的成功表达是检测基因在克隆后保持完整性的标准。蓝色菌落表示基因的完整, 白色菌落表示基因被破坏, 经酶消化后的白色菌落必须少于3%。

核酸外切酶活性: 50 µl反应体系中, 100单位酶与1 µg ³H标记的DNA (PCR纯化产物), 在37℃条件下, 孵育4小时, 释放不超过0.1%的放射性物质。

核酸内切酶活性: 50 µl反应体系中, 15单位酶与1 µg pBR322 DNA在37℃条件下, 孵育4小时, RFI型转变为RFII型的比例不超过10%。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM DTT, 400 µg/ml BSA, 50% Glycerol

10×FlyCut® Buffer

500 mM Tris-Ac pH 7.9, 1 M KAc, 120 mM MgAc₂, 1 mg/ml BSA



推荐单酶切反应体系

Component	Volume	Volume
DNA	$\leq 1 \mu\text{g}$	1-2 μg
10× <i>FlyCut</i> [®] Buffer	2 μl	5 μl
<i>FlyCut</i> [®] NcoI	0.5 μl	1 μl
Nuclease-free Water	Variable	Variable
Total volume	20 μl	50 μl

使用前请将*FlyCut*[®] Buffer充分混匀；

酶切不完全或酶切2 μg 以上的DNA时，适当增加酶量，但总酶量不超过体系的1/10。

不同DNA由于其结构不同会导致酶切的效果不同，因此可根据酶切效果调整反应时间。

反应条件

37℃孵育5-15分钟；终止反应时，可加入10×DNA Loading Buffer至终浓度1×，或者80℃加热20分钟。

推荐双酶切反应体系

Component	Volume
DNA	$\leq 2 \mu\text{g}$
10× <i>FlyCut</i> [®] Buffer	5 μl
<i>FlyCut</i> [®] Enzyme I	1 μl
<i>FlyCut</i> [®] Enzyme II	1 μl
Nuclease-free Water	Variable
Total volume	50 μl

使用前请将*FlyCut*[®] Buffer充分混匀；

酶切不完全或酶切2 μg 以上的DNA时，适当增加酶量，但总酶量不超过体系的1/10。

不同DNA由于其结构不同会导致酶切的效果不同，因此可根据酶切效果调整反应时间。

反应条件

在推荐反应温度下，孵育5-15分钟。终止反应时，可加入10×DNA Loading Buffer至终浓度为1×，或者加热失活。

如果两种酶反应温度不同，参考“双酶切反应注意事项”。

双酶切反应注意事项

FlyCut[®] Buffer能使任意两种酶在其中保证100%活性并降低星号活性的影响。

- 按照推荐条件建立反应体系。反应体系中甘油的浓度应<5%以避免星号活性。例如：50 μl 反应体系中总酶量不超过5 μl 。
- 在推荐反应温度、时间下孵育，双酶切反应不建议孵育过夜。
- 如果两种酶反应温度不同，加入第一种酶在推荐的温度下孵育，如SmaI (推荐反应温度25℃)，热失活第一种酶后再加入第二种酶，按推荐温度孵育。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

