

GXFast EcoR V

REF: GR210611S



同裂酶: Eco32I

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 |
|--------------------------|--------|
| GXFast EcoR V | 200 µl |
| 10× CutOne™ Buffer | 2×1 ml |
| 10× CutOne™ Color Buffer | 2×1 ml |

产品简介

GXFast 快速内切酶是一系列经过基因工程重组、能够在 5~15 分钟内精确完成 DNA 切割的限制性内切酶，适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。GXFast 快速内切酶具有如下特点：5~15 分钟内即可完成酶切；共用一种酶切 Buffer，大大简化酶切反应体系；良好的酶活冗余度，轻松应对底物过量或困难模板酶切。此外，晶欣生物去磷酸化、连接试剂在 CutOne™ 酶切 Buffer 中具有 100% 活性，支持一管化反应，提升“酶切-修饰-连接”的体验。

建议的反应条件

1× CutOne™ 缓冲液；
37°C 温育；

参照“DNA 快速酶切流程”配制反应体系。

失活条件

80°C 温育 20 min。

质量控制

功能活性检测

最适反应温度下，在 20 µl 反应体系中，1 µl GXFast EcoR V 能够在 15 min 内完全消化 1 µg λDNA。

超长时间温育检测

最适反应温度下，将 1 µl GXFast EcoR V 与 1 µg λDNA 共同温育 3 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，延时酶切可能出现星号活性。

酶切-连接-再酶切检测

最适反应温度下，使用 1 µl GXFast EcoR V 消化底物，回收酶切产物。在 22°C 下使用适量 Fast T4 DNA Ligase 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。

非特异性内切酶活性检测

最适反应温度下，将 1 µl GXFast EcoR V 与 1 µg 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，质粒 DNA 仍然处于超螺旋状态。

蓝白斑检测

将含有单一 *lacZα* 基因的载体以 1 µl GXFast EcoR V 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 GXFast 系列限制酶而言，白色菌落比例应小于 1%。

图标注释

快速内切酶，可在 5~15 min 内完成反应

最适反应温度为 37°C

受 EcoBI 甲基化影响，序列可能重叠，剪切可能受影响

失活条件为 80°C 温育 20 min

3 h 温育未表现星号活性，延时酶切可能出现星号活性

使用方法

1. DNA 快速酶切流程

① 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

| | 质粒 DNA | PCR 产物 | 基因组 DNA |
|---|-----------------------------|---------------------------|------------------------|
| ddH ₂ O | 15 μ l | 16 μ l | 30 μ l |
| 10 \times CutOne™ Buffer 或 10 \times CutOne™ Color Buffer | 2 μ l | 3 μ l ^a | 5 μ l |
| 底物 DNA | 2 μ l (up to 1 μ g) | 10 μ l (~0.2 μ g) | 10 μ l (5 μ g) |
| GXFast EcoR V | 1 μ l | 1 μ l | 5 μ l |
| Total | 20 μ l | 30 μ l | 50 μ l |

a. 本体系适用于经过纯化的 PCR 产物酶切。未纯化的 PCR 产物具备一定的离子强度，10 \times CutOne™ Buffer 加入量可适当减少至 2 μ l。但由于 DNA 聚合酶同时具有外切酶活性，会影响酶切产物，因此如下一步需进行克隆等操作，建议酶切前对 PCR 产物进行纯化。

- 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（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）；
④ 80°C 温育 20 min 即可使酶失活，停止反应（可选）。

2. 双酶切或多酶切

- ① 每种快速内切酶的用量为 1 μ l，并根据需要适当扩大反应体系；
② 所有快速内切酶的体积总和不得超过总反应体系的 1/10；
③ 如果所用的几种快速内切酶的最适反应温度不同，应先以最适温度低的酶开始酶切，再添加最适温度较高的酶，在其最适反应温度下进行酶切反应。

3. 适用于质粒的扩大反应体系

| | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| DNA | 1 μ g | 2 μ g | 3 μ g | 4 μ g | 5 μ g |
| GXFast EcoR V | 1 μ l | 2 μ l | 3 μ l | 4 μ l | 5 μ l |
| 10 \times CutOne™ Buffer 或 10 \times CutOne™ Color Buffer | 2 μ l | 2 μ l | 3 μ l | 4 μ l | 5 μ l |
| Total | 20 μ l | 20 μ l | 30 μ l | 40 μ l | 50 μ l |

注：如果总反应体系大于 20 μ l，应当增加温育时间，尽量使用水浴、金属浴或沙浴。

不同 DNA 中的酶切位点数量

| λ DNA | Φ X174 | pBR322 | pUC57 | pUC18/19 | SV40 | M13mp18/19 | Adeno2 |
|---------------|-------------|--------|-------|----------|------|------------|--------|
| 21 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 9 |

甲基化修饰影响

| Dam | Dcm | CpG | EcoKI | EcoBI |
|-----|-----|-----|-------|-------------------|
| 无影响 | 无影响 | 无影响 | 无影响 | 序列可能重叠 剪切可能受影响 |

在不同反应缓冲液中的活性

| | CutOne™ Buffer | Thermo Scientific FastDigest Buffer | NEB CutSmart® Buffer | Takara QuickCut™ Buffer |
|----|----------------|--|-------------------------|----------------------------|
| 活性 | 100% | 100% | 100% | 100% |

注：活性数据来自晶欣生物限制酶标准反应体系下的检测。