

产品货号	G05F133S	贮存条件
产品规格	100T	-20℃
EcoRV	100 μL	-20℃
10×Buffer	250 μL	-20℃
10×Color Buffer	250 μL	-20℃

### 【产品介绍】

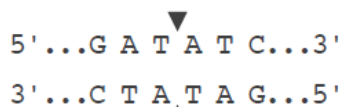
本产品 EcoRV 为经过基因工程重组的快速内切酶，可以在 5~15min 内精确完成 DNA 切割。适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。

本产品 EcoRV 快速内切酶具有如下特点：

- 5~15min 内即可完成酶切反应；
- 共用同一种酶切 Buffer，大大简化酶切反应体系；
- 优异的酶活冗余度，轻松应对底物过量或困难模板酶切；
- 去磷酸化、连接试剂在本酶切 Buffer 中具有 100%活性，支持一管化反应，完成“酶切 - 修饰 - 连接”过程。

### 【产品信息】

#### ➢ 酶切位点：



- 最适反应温度：37℃
- 失活条件：80℃孵育 20min
- 受 EcoBI 甲基化影响，序列可能重叠，剪切可能受影响
- 同裂酶：Eco32I
- 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 在低温冰盒上建立如下体系：

试剂	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH <sub>2</sub> O	15 μL	16 μL	30 μL
10×Buffer 或 10×Color Buffer	2 μL	3 μL <sup>a</sup>	5 μL
底物 DNA	2 μL (~1 μg)	10 μL (~0.2 μg)	10 μL (~5 μg)
EcoRV	1 μL	1 μL	5 μL
总计	To 20 μL	To 30 μL	To 50 μL

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×Buffer 加入量可适当减少至 2 μL。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 轻轻反复吸打以混匀（切勿涡旋），然后瞬时离心；

③ 在 37℃ 孵育 15 min（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）；

④ 在 80℃ 温育 20 min 即可使酶失活，停止反应（可选）。

## 2. 双酶切/多酶切

- 每种快速内切酶的用量为 1 μL，并根据需要适当扩大反应体系；
- 所有快速内切酶的体积总和不得超过总反应体系的 1/10；
- 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。

### 【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 EcoRV 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 EcoRV 与 1 μg λDNA 共同温育 3h，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 EcoRV 消化底物，回收酶切产物，在 22℃ 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 EcoRV 与 1 μg 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4h，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 lacZ α 基因的载体以 1 μL EcoRV 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。对于系列限制酶而言，白色菌落比例应小于 1%。

### 【注意事项】

- 本产品可在 -20℃ 下可贮存一年。
- 本产品为快切内切酶，不适合过夜酶切。
- 本产品在日常其它厂家反应缓冲液中的活性为 100%。
- 仅用于科学研究用途。

### 【相关产品】

货号	产品名称	规格
G05F300	T4 Ligase	200U/1000U
G05F140	Fspl	25T/50T
G05F147	HindIII	250T/500T
G05F101	Hinfl	250T/500T
G05F151	Hpal	50T



Version: 20190106 (第一版)