

产品货号	G05F186S	G05F186M	贮存条件
产品规格	25T	50T	-20℃
NcoI	25 μL	50 μL	-20℃
10×Buffer	60 μL	120 μL	-20℃
10×Color Buffer	60 μL	120 μL	-20℃

【产品介绍】

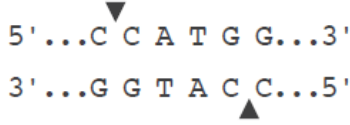
本产品 NcoI 为经过基因工程重组的快速内切酶,可以在 5~15min 内精确完成 DNA 切割。适用于质粒 DNA、PCR 产物或基因组 DNA 等的快速酶切。

本产品 NcoI 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:



5'...C C A T G G...3'
3'...G G T A C C...5'
- 最适反应温度: 37℃
- 失活条件: 80℃ 孵育 20min
- Dam、Dcm、CpG、EcoKI、EcoBI 甲基化修饰均无影响
- 同裂酶: Bsp19I
- 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 ₂ O	15 μL	16 μL	30 μL
10×Buffer 或 10×Color Buffer	2 μL	3 μL ^a	5 μL
底物 DNA	2 μL (~1 μg)	10 μL (~0.2 μg)	10 μL (~5 μg)
NcoI	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 NcoI 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 NcoI 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 NcoI 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 NcoI 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 NcoI 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, 如需过夜可在反应后放入 4℃。
- 本产品常见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
G05F188	NdeI	100T/200T
G05F190	NheI	25T/50T
G05F195	NotI	25T/50T
G05F197	NruI	50T



Version: 20190106 (第一版)