

快速内切酶 NcoI

货号: AC13956

规格: 30T

保存: -20°C 保存, 有效期 2 年。



同裂酶: Bsp19I

注: 同裂酶对于不同的甲基化修饰也许具有不同敏感性。

产品组成:

组分	30T	Storage
快速内切酶 NcoI	30 μ l	-20°C
10 \times Reaction Buffer	1 ml	-20°C
10 \times Reaction Color Buffer	1 ml	-20°C

产品说明:

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。快速内切酶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, 去磷酸化、连接试剂在 Reaction 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。

建议反应条件: 1 \times Reaction 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。

产品应用:

1. DNA 快速酶切流程

①冰上按照下表配制反应体系:

	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH ₂ O	15 μ l	16 μ l	30 μ l
10 \times Reaction Buffer 或 10 \times Reaction Color Buffer	2 μ l	3 μ l	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)
快速内切酶 NcoI	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 Reaction 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
快速内切酶 NcoI	1 μ l	2 μ l	3 μ l	4 μ l	5 μ l
10 \times Reaction Buffer 或 10 \times Reaction 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，应适当增加温育时间，尽量使用水浴、金属浴或沙浴。

质量控制

质控项目	质控标准
功能活性检测	最适反应温度下，在 20 μ l 反应体系中，1 μ l 快速内切酶 NcoI 能够在 15 min 内完全消化 1 μ g λ DNA。
星号活性测试	最适反应温度下，将 1 μ l 快速内切酶 NcoI 与 1 μ g λ DNA 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 μ l 快速内切酶 NcoI 消化底物，回收酶切产物。在 22 $^{\circ}$ 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，使用 1 μ l 快速内切酶 NcoI 与 1 μ g 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 lacZ α 基因的载体以 1 μ l 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 Reaction 系列限制酶而言，白色菌落比例应小于 1%。

不同 DNA 中的酶切位点数量

λ DNA	Φ X174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
4	0	0	0	0	3	0	20

甲基化修饰影响

Dam	Dcm	CpG	EcoKI	EcoBI
无影响	无影响	无影响	无影响	无影响

在不同反应缓冲液中的活性

	BIOISCO Reaction Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart [®] Buffer	Takara QuickCut [™] Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

注：活性数据来自 BIOISCO 限制酶标准反应体系下的检测。