

1. ОПИСАНИЕ

EcoRI – эндонуклеаза из *E. coli* RY13, экспрессированная в клетках *E. coli*.

2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

СТАНДАРТНАЯ РЕСТРИКЦИЯ

1. Смешайте: ДНК 1000 нг, 5 мкл 10X CutFast Buffer, воды до 49 мкл.
2. Добавьте 1 мкл рестриктазы.
3. Инкубируйте при 37°С 30–60 минут.

3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- На эффективность рестрикции сильно влияет чистота выделенной плазмиды. Наличие этанола, изопропанола, фенола или хлороформа, сорбента для выделения ДНК сильно снижают активность рестриктазы.
- 1 мкл фермента можно использовать для рестрикции в объеме меньше 50 мкл, во избежание появления неспецифической активности не рекомендуется добавлять рестриктазу больше чем 10% от объема реакционной смеси
- Для препаративной рестрикции при количестве ДНК более 1 мкг необходимо подобрать общий объем реакции так, чтобы итоговая концентрация ДНК была 100-150 нг/мкл. На 100 мкл реакционной смеси следует добавлять не менее 2 мкл рестриктазы.
- Избегайте многократных циклов замораживания-размораживания для реакционного буфера (рекомендуется аликвотирование).
- Рестриктаза нечувствительна к Dam и Dcm метилированию, однако метилированные CpG блокируют активность рестриктазы.

4. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

250 РЕАКЦИЙ

- 1 пробирка: 250 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 1.5 мл 10x реакционного буфера
- 1 пробирка : 1.5 мл 6x буфер для нанесения ДНК Нуар

750 РЕАКЦИЙ

- 3 пробирки по 250 мкл фермента в буфере для хранения
- 2 пробирки по 1.5 мл 10x реакционного буфера

1 пробирка : 1.5 мл 6x буфер для нанесения ДНК Нуар

5. ХАРАКТЕРИСТИКИ

АКТИВНОСТЬ **2 ед./мкл.**

ИНАКТИВАЦИЯ **Полная инактивация при 65 °С, 20 мин**

6. СОСТАВ РАСТВОРОВ

Буфер для хранения: 10 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 200 мкг/мл БСА, 50% Глицерин (pH 7.4)

Буфер CutFast (10x): 500 мМ KOAc, 200 мМ Tris-OAc, 100 мМ Mg(OAc)₂, 1 мг/мл БСА, pH 7.9

7. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За одну реакцию принято полное расщепление 1 мкг контрольной плазмидной ДНК за 60 минут при 37 °С в 1x буфере CutFast при добавлении 1 мкл HgaI в реакционный объем 50 мкл.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Срок годности 1 год. Фермент и реакционный буфер необходимо хранить при температуре -20 °С