

1. ОПИСАНИЕ

HindIII — эндонуклеаза рестрикции из *Haemophilus influenzae Rd*, экспрессированная в клетках *E. coli*. Изошизомеры: Ssbl.

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°C 30–60 минут.

3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- На эффективность рестрикции сильно влияет чистота выделенной плазмиды (остатки этанола или фенола снижают активность).
- Во избежание появления звездчатой активности не рекомендуется добавлять фермент в объеме более 10% от общей реакционной смеси.
- Для препаративной рестрикции (ДНК > 1 мкг) подбирайте объем так, чтобы концентрация ДНК была 100-150 нг/мкл.
- На 100 мкл реакционной смеси рекомендуется добавлять не менее 3 мкл HindIII.

4. ЧАСТЫЕ ВОПРОСЫ (FAQ)

В: Я вижу дополнительные полосы на геле («шмер»). В чем причина?

О: Если в буфере для нанесения нет **SDS**, а фермент не был инактивирован, ДНК может оставаться связанной с рестриктазой. Используйте буфер с **SDS** или прогрейте пробу.

В: Зависит ли работа HindIII от метилирования?

О: HindIII нечувствителен к **Dam** и **Dcm** метилированию, однако работа может быть заблокирована **CpG**-метилированием, если сайт перекрывается с **CpG**-динуклеотидом.

В: Почему лигирование после HindIII идет плохо?

О: Убедитесь, что вы полностью инактивировали рестриктазу (**80°С, 20 мин**) перед добавлением лигазы, иначе HindIII разрежет лигированные фрагменты обратно.

5. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

500 РЕАКЦИЙ

- 1 пробирка: 500 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

1500 РЕАКЦИЙ

- 3 пробирки по 500 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

6. ХАРАКТЕРИСТИКИ

АКТИВНОСТЬ

10 ед./мкл

ИНАКТИВАЦИЯ

Полная инактивация при 80 °С, 20 мин

7. СОСТАВ РАСТВОРОВ

Буфер для хранения: 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 250 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мМ EDTA, 500 мкг/мл БСА, 50% Глицерин

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

8. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За одну единицу активности принято количество фермента, которое за 60 минут при 37 °С полностью расщепляет 1 мкг ДНК фага λ в реакционном объеме 50 мкл.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Фермент и реакционный буфер необходимо хранить при температуре -20 °С. Для буфера избегайте многократных циклов замораживания-размораживания.

Рекомендуется сделать аликвоты CutFast по 10-50 мкл.

