

## 1. ОПИСАНИЕ

**NotI** – улучшенная версия эндонуклеазы **NotI** из *Nocardia otitidis-caviarum*, с увеличенной удельной активностью и специфичностью, 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.
- Во избежание появления неспецифической активности не рекомендуется добавлять фермент 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 **NotI**.
- Избегайте многократных циклов замораживания-размораживания для реакционного буфера (рекомендуется аликвотирование).

#### 4. ЧАСТЫЕ ВОПРОСЫ (FAQ)

---

**В: Могу ли я использовать NotI в буферах для других рестриктаз?**

**О:** Да. NotI CutFast на 100% активен в универсальном буфере типа CutSmart.

---

**В: Влияет ли CpG метилирование на работу фермента?**

**О:** Да, CpG-метилирование блокирует расщепление, Dam и Dcm на активность не влияют.

---

**В: Почему лигирование после NotI идет плохо?**

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

---

## 5. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

### 50 РЕАКЦИЙ

- 1 пробирка: 50 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 0.5 мл 10x реакционного буфера
- 1 пробирка: 0.5 мл буфера для нанесения ДНК Нуар

### 150 РЕАКЦИЙ

- 3 пробирки по 50 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 1.5 мл 10x реакционного буфера
- 1 пробирка: 1.5 мл буфера для нанесения ДНК Нуар

### 250 РЕАКЦИЙ

- 5 пробирок по 50 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 1.5 мл 10x реакционного буфера

## 6. ХАРАКТЕРИСТИКИ

### АКТИВНОСТЬ

20 ед./мкл

### ИНАКТИВАЦИЯ

Полная инактивация при 80 °С, 20 мин

## 7. СОСТАВ РАСТВОРОВ

Буфер для хранения: 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мМ EDTA, 200 мкг/мл БСА, 50% Глицерин, pH=7.4

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

## 8. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За одну единицу активности принято количество рестриктазы, которое за 60 минут при 37°С полностью расщепляет 1 мкг контрольной плазмидной ДНК с 2 сайтами рестрикции в реакционном объеме 50 мкл.

## 9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Фермент и реакционный буфер необходимо хранить при температуре -20°С