

【产品简介】

TOROIVD® 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。TOROIVD® 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，TOROIVD 去磷酸化、连接试剂在 CutUni 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。



【产品组成】

TOROIVD® KpnI 快速内切酶 (N233142S) 如下：

货号	组分	规格
N233142S	TOROIVD® KpnI	200 μL
	10×CutUni Buffer	2×1 mL
	10×CutUni Color Buffer	2×1 mL

【使用方法】

1. DNA 酶切流程。

1) 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

组分	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH ₂ O	15 μL	16 μL	30 μL
10×CutUni Buffer 或 10×CutUni 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)
TOROIVD® KpnI	1 μL	1 μL	5 μL
总体积	20 μL	30 μL	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×CutUni Buffer 加入量可适当减少至 2μL。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℃ 温育 15 min（质粒），或 15~30 min（PCR 产物），或 30~60 min（基因组 DNA）。

4) 80℃ 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 1μL，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 μg	2 μg	3 μg	4 μg	5 μg
TOROIVD® KpnI	1 μL	2 μL	3 μL	4 μL	5 μL
10×CutUni Buffer 或 10×CutUni Color Buffer	2 μL	2 μL	3 μL	4 μL	5 μL
总体积	20 μL	20 μL	30 μL	40 μL	50 μL

注：如果总反应体系大于 20μL，应适当增加温育时间，尽量使用水浴、金属浴或沙浴。

【图标注释】

快速内切酶，可在 5~15 min 内完成反应

最适反应温度为 37℃

失活条件为 80℃ 温育 20min

3h 温育未表现星号活性，延时酶切可能出现星号活性

【质量控制】

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 TOROIVD® KpnI 能够在 15 min 内完全消化 1 μ g λ DNA (HindIII digest)。

超长时间温育检测

最适反应温度下, 将 1 μ L TOROIVD® KpnI 与 1 μ g λ DNA (HindIII digest) 共温育 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 TOROIVD® KpnI 消化底物, 回收酶切产物。在 22°C 下使用适量 TOROIVD® T4 DNA Ligase(Fast) 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 μ L TOROIVD® KpnI 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 TOROIVD® KpnI 消化, 重新连接后转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 TOROIVD® 系列限制酶而言, 白色菌落比例应小于 1%。

【储运条件】

-20°C 保存。

【不同 DNA 中的酶切位点数量】

λ DNA	Φ X174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
2	0	0	1	1	1	1	8

【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】

	CutUni Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB CutSmart® Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

注: 活性数据来自 TOROIVD 限制酶标准反应体系下的检测。

