

I-SceI

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8240	I-SceI	250U(5U/μl)

产品简介：

I-SceI 是一种来源于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 II 型内含子编码的核酸内切酶 (Intron-encoded endonuclease)，特异性识别并切割 18 bp 非回文序列 (5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3')，形成 4 bp 的 3'突出黏性末端。由于识别序列极长，其在基因组中自然出现的概率极低 (约每 7×10^{10} 个随机碱基出现一次)，这使得 I-SceI 成为精准基因组操作的理想工具。

识别位点：

TAGGGATAACAGGGTAAT
5'...T A G G G A T A A ↓ C A G G G T A A T...3'
3'...A T C C C ↑ T A T T G T C C C A T T A...5'

产品组成：

组分	规格
I-SceI (5 U/μl)	50 μl
pUC-I-SceI (100 ng/μl)	20 μl
10× FastCut Buffer	1 ml
10× FastCut Color Buffer	1 ml

保存条件：

-20°C保存，2年有效。

建议反应条件:

1× FastCut 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。

活性定义:

1 活性单位 (U) 是指在 37°C条件下反应 1 h 酶切 1 μg pUC-I-SceI 所需的酶量。

功能活性检测:

37°C下，在 20 μl 通用 FastCut 反应体系中，1 μl I-SceI 能够 在 15 min 内完全消化 1 μg pUC-I-SceI。

超长时间温育检测:

37°C下，在 20 μl 通用 FastCut 反应体系中，将 1 μl I-SceI 与 1 μg pUC-I-SceI 共同温育 3 h，未检测到其他核酸酶污染引起的底 物非特异性降解。

酶切-连接-再酶切检测:

37°C下，使用 10 倍酶量的 I-SceI 消化 DNA 底物，回收酶切产物，在 22°C下使用 T4 DNA Ligase (Fast)可以将超过 95%的酶切产物重新连接。将连接产物再次回收后，使用相同的内切酶可以重新切开约 95%以上的连接产物。

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：

② 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH ₂ O	15μl	16μl	30μl
10× FastCut Buffer 或 10× FastCut Color Buffer	2μl	3μl ^a	5μl

底物 DNA	2μl (up to 1μg)	10μl (~0.2μg)	10μl (5μg)
FastCut AatII	1μl	1μl	5μl
Total	20μl	30μl	50μl

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× FastCut Buffer 加入量可适当减少至 2 μl。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）；
- ⑤ 如果使用 FastCut Color Buffer 进行酶切反应，得到的产物可以直接进行上样电泳。

2. 适用于质粒的扩大反应体系

DNA	1μg	2μg	3μg	4μg	5μg
I-SceI (5 U/μl)	1μl	2μl	3μl	4μl	5μl
10× FastCut Buffer 或 10×FastCut Color Buffer	2μl	2μl	3μl	4μl	5μl
Total	20μl	20 μl	30μl	40 μl	50 μl

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

不同 DNA 中的酶切位点数量

λDNA	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	SV40	M13mp18/19	Adeno2
0	0	0	0	0	0	0	0

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

注意事项：

- 归位内切酶不具有限制性内切酶那样严格定义的识别序列。因此，单个碱基的改变并不影响其识别功能，但是会不同程度地降低酶切效率。识别序列中必需碱基的准确区域还

不确定。列出的识别序列是已知可识别并酶切的位点。

2. 随酶提供对照质粒 DNA，浓度为 100 ng/μl。I-SceI 酶切产生 2711 bp 的片段。
pUC-I-SceI 为氨苄抗性，可自行转化后大量提取用于其他实验。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其他用途！