

I-CeuI

REF: EG25529S

5'...TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA...3'
3'...ATTGATATTGCCAGGATTC CATCGCTT...5'



储存条件

-20°C保存 2 年

产品组成

组分	规格
I-CeuI (5 U/μl)	50 μl
pUC-HE (100 ng/μl)	20 μl
10× CutOne® Buffer	1 ml
10× CutOne® Color Buffer	1 ml

产品简介

I-CeuI 是一种来源于衣滴虫 (*Chlamydomonas eugametos*) 的归位内切酶, 经大肠杆菌重组表达纯化后获得。I-CeuI 特异性识别并切割 27 bp 非回文序列 (5'-TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA-3'), 形成 4 bp 的 3' 突出黏性末端。相较于 I-SceI, I-CeuI 识别序列更长, 其在基因组中自然出现的概率更低 (约每 5.6×10^{17} 个随机碱基出现一次), 在基因编辑中特异性更高。

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-HE 所需的酶量。

建议反应条件

1× CutOne® 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。

质量控制

功能活性检测

37°C 下, 在 20 μl 通用 CutOne® 反应体系中, 1 μl I-CeuI 能够在 15 min 内完全消化 1 μg pUC-HE。

超长时间温育检测

37°C 下, 在 20 μl 通用 CutOne® 反应体系中, 将 1 μl I-CeuI 与 1 μg pUC-HE 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-CeuI 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。

图标注释

- 最适反应温度为 37°C
- 失活条件为 80°C 温育 20 min

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。
- 随酶提供对照质粒 DNA, 浓度为 100 ng/μl。I-CeuI 酶切产生 2711 bp 的片段。pUC-HE 为氨苄抗性, 可自行转化后大量提取用于其他实验。

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：

	质粒 DNA	PCR 产物	基因组 DNA
ddH ₂ O	15 µl	16 µl	30 µl
10× CutOne® Buffer 或 10× CutOne® Color Buffer	2 µl	3 µl ^a	5 µl
底物 DNA	2 µl (up to 1 µg)	10 µl (~0.2 µg)	10 µl (5 µg)
I-CeuI (5 U/µl)	1 µl	1 µl	5 µl
Total	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× CutOne® 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 CutOne® 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	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
I-CeuI (5 U/µl)	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl
10× CutOne® Buffer 或 10× CutOne® Color Buffer	2 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl
Total	20 µl	20 µl	30 µl	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

在不同反应缓冲液中的活性

	CutOne® Buffer	Thermo Scientific FastDigest Buffer	NEB rCutSmart™ Buffer	Takara QuickCut™ Buffer
活性	100%	100%	100%	100%

注：活性数据来自百时美限制酶标准反应体系下的检测。

DNA 修饰酶在 CutOne® Buffer 和 CutOne® Color Buffer 中的活性

EG15208S Alkaline Phosphatase (Fast)	100%
EG15205S T4 DNA Ligase (Fast)	100%

注：活性数据来自百时美标准反应体系下的检测；T4 DNA Ligase(Fast) 需要 ATP 作为辅助因子。