产品组分

组分名称	组分编号	浓度	规格 1 3,000 U	规格 2 15,000 U
SfiI	RM21611	20,000 U/mL	150 μL	750 μL
10X Buffer CutS	RM20103	10X	1.25 mL	3 × 1.25 mL

产品说明

识别位点

5'...G G C C N N N N ▼N G G C C...3'

3'..C C G G N ▲N N N N C C G G...5'

活性定义

1 活性单位（U）是指在 50 μL 反应体系中，50°C 1 hr 内完全酶切 1 μg pXba DNA 所需的酶量。

保存温度

-20°C

酶切反应条件

1X Buffer CutS，50°C 反应

37°C 酶活性

在 37°C 进行酶切反应时，SfiI 只有 10%的活性。

1X Buffer CutS

50 mM KAc, 20 mM Tris-HAc, 10 mM $MgAc_2$,

100 μg/mL rHSA, pH 7.9 @ 25°C

快切

是，在推荐反应体系下孵育 5-15 min 可完全酶切底物

热失活

否

甲基化敏感性

dam 甲基化	dcm 甲基化	CpG 甲基化
不敏感	重叠时被阻断	重叠时被阻断

操作说明

推荐的酶切反应体系（以 50 μL 体系为例）

组分	加入量
ddH_2O	Up to 50 μL
10X Buffer CutS	5 μL
DNA*	1 μg
SfiI	1 μL

* 注：DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐，否则将会影响限制性内切酶活性。

- ◆ 50°C 孵育 5-15 min 可以完全酶切 DNA 底物。
- ◆ 对不能热失活的内切酶，若有后续实验，推荐酶切后的产物纯化后使用。
- ◆ SfiI 需要两个拷贝识别位点序列才能发生酶切反应，这两个拷贝可以在相同分子或不同分子上（Wertzell L.M. et al., (1995) J. Mol. Biol. 248:581-595.）。

优化的限制性内切酶反应

限制性内切酶反应需要注意很多关键因素：合适的 DNA 底物量，合适的内切酶与反应缓冲液可以达到最佳的酶切效果。大多数研究者按下面所示“推荐限制性内切酶酶切反应”进行实验，对于不同来源、质量和纯度的 DNA 样品，推荐使用 5-10 倍的内切酶进行过度酶切反应。

推荐的限制性内切酶酶切反应体系

限制性内切酶	0.5 μL 是充足的，一般使用 1 μL
DNA 底物	1 μg
10X ABclonal 缓冲液	5 μL
总体积	50 μL
孵育时间	1 hr*
孵育温度	根据最适酶切温度而定

* 注：使用快切限制性内切酶时可以将孵育时间缩短至 5-15 min。

1. 酶

- 从冰箱拿出后置于冰上。
- 在反应体系中最后加入酶组分。
- 可以通过移液器上下吹打或者“轻弹”反应管混匀，然后在微型离心机中短暂离心，尽量不要旋涡混匀。
- 一般推荐 5-10 U 酶/μg DNA、10-20 U 酶/μg 基因组 DNA，酶切 1 hr。

2. DNA

- DNA 底物中应不含苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、洗涤剂或高浓度盐。推荐在 DNA 纯化过程中加入清洗步骤。
- 甲基化的 DNA 会抑制某些限制性内切酶的酶切反应。

3. 反应缓冲液

- 使用 1X 浓度。
- 对于某些限制性内切酶需要在反应缓冲液中按推荐浓度加入 SAM (S-腺苷甲硫氨酸)。

4. 反应体积

- 推荐在 50 μL 反应体系下酶切 1 μg DNA 底物。
- 反应体系中加入的酶的体积不应超过总体积的 10%，避免酶中过多的甘油引起星号活性。
- 限制性内切酶存储缓冲液中的添加剂(例如甘油、盐)与底物溶液中的污染物(例如盐、EDTA 或乙醇等)相同，反应体积越小，酶切反应抑制效应越强。

推荐的反应体系

反应体积	酶量*	DNA	10X ABclonal Buffer
10 μL**	1 U	0.1 μg	1 μL
25 μL	5 U	0.5 μg	2.5 μL
50 μL	10 U	1 μg	5 μL

* 注：对于小体积反应体系，限制性内切酶应稀释后加入反应体系。

** 注：为避免蒸发，10 μL 反应体系的孵育时间不应超过 1 hr。

5. 孵育时间

- 孵育时间推荐 1 hr。
- 使用过量的酶或者快切酶可减少孵育时间。
- 对于许多限制性内切酶，可以使用更少的酶孵育，但需延长孵育时间到 16 hr。

6. 终止反应

酶切后的 DNA 无后续实验，可以按下述方法终止反应：

- 用终止液终止反应。向 50 μL 酶切反应体系中加入 10 μL 终止液。[1X 终止液：2.5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl, 0.08% SDS, 0.02% Tartrazine, 0.001% Xylene Cyanol FF, pH 8.0 @ 25°C]

酶切后的 DNA 有后续实验，可以按下述方法终止反应：

- 热失活。
- 通过吸附柱或苯酚/氯仿纯化。

7. 对照实验

如果酶切 DNA 底物时遇到困难，推荐设置对照实验：

- 对照 DNA 底物：选择含有限制酶识别位点的对照 DNA 底物（一般使用含多个限制酶识别位点的 DNA，例如λ DNA 或 PUC19 质粒 DNA)。
- 如果对照 DNA 能够被切开，而实验 DNA 酶切障碍。对于这种情况，可以将这两种 DNA 混合后进行酶切反应。如果实验 DNA 中含有酶切反应抑制物（例如高浓度盐、EDTA 或苯酚等），对照 DNA 也将不会被切开。