

T7 Endonuclease I

EN303-01/02

Version 5.1



Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

T7 Endonuclease I 识别并切割不完全配对DNA、十字型结构DNA、Holliday 结构或DNA分叉点、异源双链DNA；同时能以较低的速度切割带有切刻位点的双链DNA。该酶切割错配位点5'端的第一、第二或第三个磷酸二酯键。本产品是克隆重组T7核酸内切酶 I (T7 Endonuclease I) 基因后在大肠杆菌中表达纯化的高纯度T7 Endonuclease I 活性蛋白。

产品组成

组 分	EN303-01 (250U)	EN303-02 (1,250U)
T7 Endonuclease I	25 μ l	125 μ l
T7 Endonuclease I Reaction Buffer(10x)	1 ml	1 ml

储存条件

-20°C保存。

反应条件

1x T7 Endonuclease I Reaction Buffer, 37°C孵育。

单位定义

1单位指在50 μ l反应体系, 37°C条件下, 1小时将1 μ g超螺旋十字型结构的pUC(AT) 质粒切成90%以上的线性DNA所需要的酶量。

*pUC(AT)来自pUC19, 在其EcoRI和 PstI位点之间的多克隆位点处有修改。

质量控制

T7核酸内切酶 I 无核酸内切酶和核酸外切酶的污染。

用途

基因突变和SNP的检测, 可应用于TALEN、CRISPR/CAS9形成的突变体检测

识别错配DNA, 分解四方向交叉DNA或分支DNA

检测或切割异源二聚体DNA和切割DNA

随机切割线性DNA进行shot-gun克隆

T7核酸内切酶 I 检测突变体实验方案

1. PCR扩增带有突变位点的DNA片段

1. 提取转染后细胞的基因组DNA。

2. PCR扩增带有突变位点 (如TALEN或Cas9的target site) 的DNA片段, 建议用高保真酶进行扩增, 引物设计时, 建议扩增长度为0.5-1 kb, 突变位点不要设置在片段中央, 以便于切出两条大小不等的条带。每个待检测样品用以下模板设置三个PCR反应:

a: 靶细胞 (如TALEN或Cas9转染的细胞) 基因组DNA

b: 阴性对照细胞 (无特定靶序列转染的细胞) 基因组DNA

c: 水 (即不加模板)

3. 反应结束后，取少量扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。如目的条带单一且片段大小正确，则可进行下步实验。
4. 用磁珠或PCR产物纯化试剂盒等方法纯化PCR产物。
5. 对纯化后的PCR产物进行定量。

2. T7内切酶I酶切反应

1. 纯化后的PCR产物按下列顺序在EP管中配制反应体系:

编号	1	2
靶细胞PCR产物 (200ng)	x μ l	0
阴性对照PCR产物 (200ng)	0	x μ l
10 x T7 Endonuclease I Reaction Buffer	2 μ l	2 μ l
Nuclease-free Water	To 19 μ l	To 19 μ l

2. 在PCR仪中进行加热变性、退火复性处理，程序如下:

95°C	5 min
95-85°C	-2°C /sec
85-25°C	-0.1°C/sec
Hold	4°C

3. 添加T7 Endonuclease I 至退火后的PCR产物:

Annealed PCR product	19 μ l
T7 Endonuclease I	1 μ l

4. 37°C 孵育 15 min。
5. 反应结束后，添加 1.5 μ l 0.25 M EDTA 终止反应。
6. 终止后的酶切产物可直接通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

结果图示

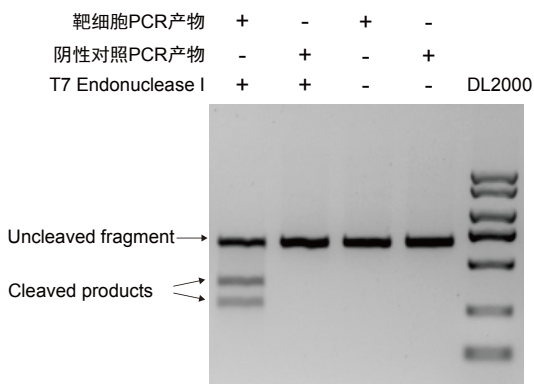


图1: 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物

注意事项

1. T7核酸内切酶I是一种底物结构选择性的酶。该酶以不同的活性作用于不同的DNA底物。因此，切割特定底物时，必须控制好酶的用量和反应时间。
2. 反应温度超过42°C时，会增加非特异性核酸酶活性。避免反应温度超过55°C，否则会导致酶活性降低。