T7 Endonuclease I

EN303

Version 20.1

Vazyme

产品概述

T7 Endonuclease I识别并切割不完全配对DNA、十字型结构DNA、Holiday结构或DNA分叉点、异源性DNA；同时能以较低的速度切割带有切割位点的双链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基因后在大肠杆菌中表达纯化的高纯度活性蛋白，可用于基因突变、SNP、TALEN或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；检测异源性二聚体或切刻DNA；或用于随机切割线性DNA进行Shot-gun克隆。

产品组分

组 分	EN303-01 (250 U)	EN303-02 (1,250 U)
T7 Endonuclease I	25 μl	125 μl
T7 Endonuclease I Reaction Buffer(10 ×)	1 ml	1 ml
Control template *	10 μl	20 μl

*本试剂盒中提供的Control template为突变型和野生型PCR产物 1:1（各100 ng）的混合，使用前需退火成含不配对的杂合链。

保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

适用范围

适用于基因突变、SNP、TALEN或CRISPR/Case9形成的突变体检测等。

质量控制

蛋白纯度：经SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色测定T7 Endonuclease I 纯度>95%。

核酸残留：无外切酶及内切酶污染。

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℃时，会增加非特异性核酸酶活性。避免反应温度超过55℃，否则会导致酶活性降低。

实验流程

1. PCR扩增带有突变位点的DNA片段

▲ 使用高保真酶PCR扩增带突变位点的DNA片段（如TALEN或Cas 9的target site），建议扩增DNA长度为0.5 - 1 kb，引物设计时突变位点不要设置在片段中间，以便电泳区分切割两个大小不等的条带。

a. 提取转染后的细胞基因组DNA。设置如下三个PCR反应：
靶细胞基因组DNA（带突变位点）
对照细胞基因组DNA（不带突变位点）
水（无DNA模板）

b. PCR 结束后，电泳检测产物，若产物大小正确且条带单一，则进行下步实验。

c. 用磁珠或者其他方法纯化PCR产物。

d. 对纯化后的产物进行定量。

▲ 产物纯化定量后便于计算突变率，否则只能进行突变体的验证实验。

2. T7 Endonuclease I 酶切反应

a. 按下表配制如下反应体系：

组分	阳性细胞	阴性细胞	阳性对照	无模板对照
靶细胞PCR产物(200 ng)	x μl	0 μl	0 μl	0 μl
阴性细胞PCR产物(200 ng)	0 μl	x μl	0 μl	0 μl
Control template	0 μl	0 μl	2 μl	0 μl
10 × T7 Endonuclease I Reaction Buffer	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Nuclease-free ddH_2O	To 19 μl	To 19 μl	To 19 μl	To 19 μl

b. 在PCR中进行如下退火程序：

温度	时间
95°C	5 min
95 ~ 85°C	-2℃/sec
85 ~ 25°C	-0.1℃/sec
4°C	∞

c. 在退火产物中加1 μl的T7 Endonuclease I。

d. 37℃孵育15 min。

e. 加1.5 μl的0.25 M EDTA终止酶切反应。

▲ 不加EDTA终止反应的产物在常温长时间放置会产生非特性切割，请尽快进行电泳检测。

f. 将酶切产物直接以2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

▲ 溴酚蓝Loading buffer会覆盖250 bp左右的条带，请使用OG Loading buffer电泳。

3. 电泳结果

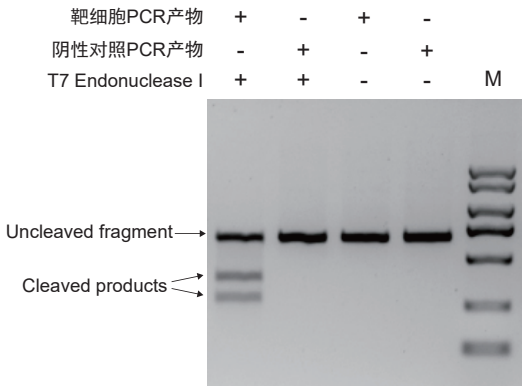

图1. 2%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物

M：DL 2,000 Plus DNA Marker

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。