

T7 Endonuclease I

REF: EG24209-S/M

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格 S	规格 M
T7 Endonuclease I (10 U/μl)	25 μl	125 μl
10× Cut Buffer G	1.25 ml	1.25 ml
Control Template (T7EI)	20 μl	20 μl

产品简介

T7 Endonuclease I (T7 Endo I, T7EI), 中文名称 T7 核酸内切酶 I, 可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, 切割位点位于错配位点 5' 端的第一、第二或第三个磷酸二酯键。此外 T7EI 也能以很慢的速度切割含有缺刻的双链 DNA。值得注意的是, T7EI 可以识别长度大于或等于 2 个碱基对 (bp) 的插入、缺失或突变导致的 DNA 错配, 但不能识别 1 bp 的插入、缺失或突变。同时, T7 Endonuclease I 无法识别所有的 DNA 错配, 对 C 错配的切割效果最佳。

本品为克隆重组 T7 Endonuclease I 基因后在大肠杆菌中表达纯化获得的高纯度蛋白, 不含其他内切酶或外切酶污染。

产品应用

1. 基因突变、SNP、TALEN 或 CRISPR/Cas9 形成的突变体检测。
2. 检测或切割异源双链 DNA 和切刻的 DNA。
3. 随机切割线性 DNA 进行鸟枪法克隆。

活性定义

1 活性单位是指在 50 μl 体系中, 37°C 反应 1 h 将 1 μg 超螺旋质粒 DNA 结构 pUC(AT) 的 90% 以上转换为线性结构所需的酶量。

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白纯度不低于 95%。

非特异性内切酶活性

在 20 μl 反应体系中将 10 U T7 Endonuclease I 与 200 ng 的质粒 DNA 在 37°C 共同温育 2 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 20% 超螺旋质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

DNase 活性

在 20 μl 反应体系中将 10 U T7 Endonuclease I 与 15 ng 的双链 DNA 片段在 37°C 共同温育 2 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 双链 DNA 片段无变化。

使用方法

1. 配制退火反应体系

试剂	实验组	阴性对照 1	阴性对照 2	阳性对照
PCR 产物 (Wild Type)	200 ng	200 ng	/	/
PCR 产物 (Mutant)	200 ng	/	200 ng	/
Control Template (T7EI) ^a	/	/	/	2 μl
10× Cut Buffer G	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Nuclease-free water	To 19 μl	To 19 μl	To 19 μl	To 19 μl

a. Control Template 为突变型和野生型 PCR 产物 1:1 (各 100 ng) 的混合物, 使用前需退火成含不配对的杂合链。退火后经 T7EI 酶切产生 620 bp 和 175 bp 条带。

2. 使用 PCR 仪退火

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

3. T7 Endonuclease I 酶切

试剂	加入量
“步骤 1”的退火反应产物	19 μl
T7 Endonuclease I	1 μl

- ① 37°C 反应 15~30 min;
- ② 85°C 加热 15 min 或加入 1.5 μl 的 0.25 M EDTA 终止酶切反应。

4. 将酶切产物使用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测

注意事项

1. T7 Endonuclease I 具有底物结构选择性, 以不同的活性作用于不同的 DNA 底物。切割特定底物时必须控制酶量和反应时间以达到最佳酶切效果。
2. 反应温度超过 42°C 时会使 T7 Endonuclease I 非特异性核酸酶活性增强, 超过 55°C 会导致酶活下降。
3. Mn^{2+} 会显著增加 T7 Endonuclease I 非特异性核酸酶活性, 请使用不含 Mn^{2+} 的 PCR Buffer 进行 PCR 扩增。
4. T7 Endonuclease I 可兼容多种 PCR Buffer, PCR 产物可不经纯化直接用于酶切检测, 若酶切结果异常, 可以将 PCR 产物纯化后再进行实验。

Control Template (T7EI) 酶切示意图

