

M5 HiPer T7 核酸内切酶 I 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer T7 核酸内切酶 I	250u	MF460-01
M5 HiPer T7 核酸内切酶 I	1250u	MF460-05

【储存条件】: -20°C

【产品简介】

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。

【活性定义】: 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。

【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。

【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

【产品组份】

	MF460-01	MF460-05
T7 Endonuclease I, 10 U/ μ l	25 μ l	125 μ l
T7 Endonuclease I Reaction Buffer(10x)	0.5ml	1.25 ml

【使用方法】

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。

1.1 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)

1.2 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。

1.3 用磁珠或者其他方法纯化 PCR 产物。

1.4 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

2.1 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 μ l	0 μ l	0 μ l	0 μ l
阴性细胞PCR产物(200 ng)	0 μ l	x μ l	0 μ l	0 μ l
Control template *	0 μ l	0 μ l	2 μ l	0 μ l
10 x T7 Endonuclease I Reaction Buffer	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Nuclease-free Water	To 19 μ l	To 19 μ l	To 19 μ l	To 19 μ l

2.2. 在 PCR 中进行如下退火程序：

温度	时间
95°C	5 min
95-85°C	-2°C/sec
85-25°C	-0.1°C/sec
4 度	保存

2.3. 在退火产物中加 1 μ l 的 T7 Endonuclease I。

2.4. 37°C 孵育 15 min。

2.5. 加 1.5 μ l 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异性切割，请尽快进行电泳检测。

2.6. 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

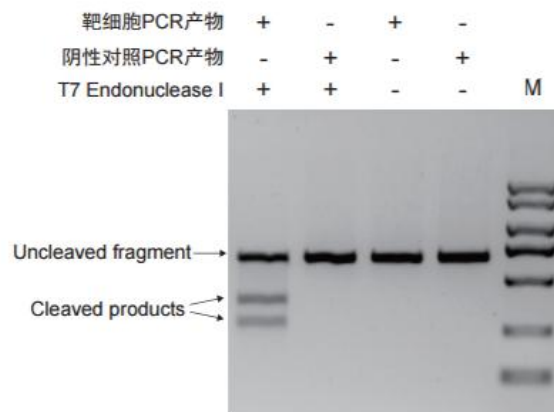


图1. 2%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物

M: DL 2,000 Plus DNA Marker

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。