

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		250 U	1250 U
T7 Endonuclease I (10,000 U/mL)	RM20536	25 μ L	125 μ L
10X Buffer CutB	RM20105	1.25 mL	1.25 mL

产品说明

T7 Endonuclease I (T7 Endo I, T7EI), 即 T7 核酸内切酶 I, 能识别并切割不完全配对的 DNA (Non-perfectly matched DNA)、十字型结构 DNA (Cruciform DNA structures)、Holliday 结构或交叉 DNA (Holliday structures or junctions) 和异源双链 DNA (Heteroduplex DNA)。T7 Endonuclease I 切割的位点位于错配碱基 5'端的第一、第二或第三个磷酸二酯键。本产品常用于 CRISPR/Cas9 等导致的基因突变的检测。

产品来源

T7 Endonuclease I 编码来自 T7 gene3, 在大肠杆菌中诱导表达和分离纯化得到。

保存温度

-20°C

质量控制

蛋白纯度>95%。

无其他外切酶与内切酶污染。

失活

80°C加热 15 min 或加入 EDTA 至终浓度 20 mM。

操作说明

1. 设计并扩增目的片段

1.1 使用高保真酶 PCR 扩增带有突变位点的 DNA 片段, 引物设计时突变位点不要位于片段中间, 避免酶切后产生的片段大小接近, 扩增片段大小在 0.5-1 kb 为宜。

1.2 扩增产物经电泳检测, 产物大小正确且条带单一, 可进行酶切检测。

2. 产物酶切检测

PCR 产物如正确, 无需进行纯化, 可直接进行变性与退火。使用 Nanodrop 或 Qubit 对 PCR 产物进行定量, 反应中每个突变型与野生型 PCR 产物用量宜在 50-250 ng, PCR 产物用量过少会导致后续电泳条带较弱, PCR 产物用量过多会导致酶切不充分。

2.1 按下表配制变性退火反应体系。

试剂	19 μ L
10X Buffer CutB	2 μ L
PCR Product (WT)	50-250 ng
PCR Product (Mutant)	50-250 ng (投入量需与 WT 相同)
Nuclease-free Water	to 19 μ L

2.2 震荡混匀后，按下表在 PCR 仪上进行变性与退火反应。

步骤	温度	时间
变性	95°C	5 min
退火	95-85°C	-2°C/sec
	85-25°C	-0.1°C/sec
Hold	4°C	-

2.3 向退火产物中，加入 1 μL T7 Endonuclease I (10,000 U/mL) 并震荡混匀。

2.4 37°C 酶切 15 min，使用 PCR 仪可关闭热盖功能或设置热盖温度为 70°C。

注：酶切时长推荐为 15 min，但根据不同的 PCR 产物长度及起始量，可以适当调整时间以取得更好的电泳结果。但是请注意，T7 Endonuclease I 具有较弱的非特异性核酸酶活性，若酶切时间太长，电泳条带会产生拖带现象。

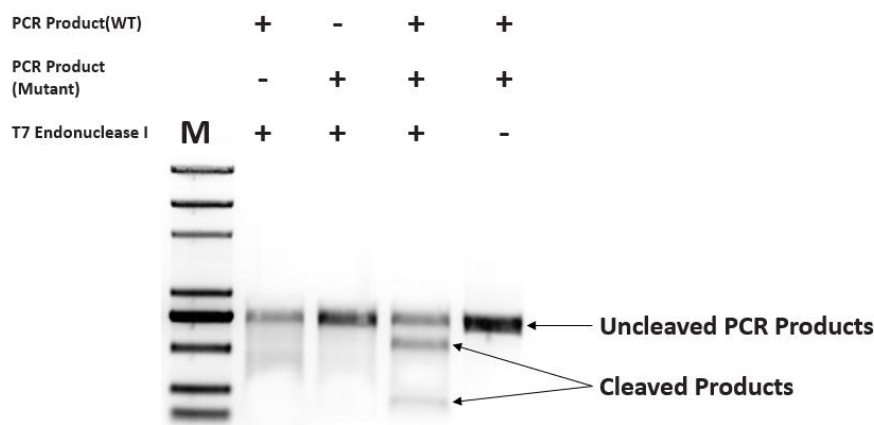
2.5 终止反应：可以选择加入 1.5 μL 0.25 M EDTA 终止反应，也可以选择 80°C 加热 15 min（PCR 仪热盖温度设置为 105°C）以使酶失活。建议立即进行凝胶电泳检测。

注：如不能及时检测，可以终止反应后 -20°C 保存。

2.6 使用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

电泳结果说明

1. 以野生型/突变体形成的杂合双链 DNA 为例



M: 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp、3000 bp、5000 bp

野生型/突变体退火后形成错配的杂合双链 DNA，经 T7 Endonuclease I 酶切后，产生了 190 bp 与 550 bp 两个新的条带。无错配的 WT PCR Product 与 Mutant PCR Product，退火后经 T7 Endonuclease I 酶切，仅因为非特异性核酸酶活性而产生轻微降解，有拖带产生。

注意事项

1. T7 Endonuclease I 具有底物选择性，切割不同的特定底物时活性不同，需要控制酶用量与反应时间。
2. 反应温度超过 42°C 时，会增加 T7 Endonuclease I 非特异性核酸酶活性。反应温度超过 55°C 时，酶活性降低。
3. 锰离子会显著增加 T7 Endonuclease I 非特异性核酸酶活性，避免 PCR Buffer 中含有锰离子。
4. T7 Endonuclease I 经测试可兼容多种 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，可以尝试将 PCR 产物经磁珠或柱法纯化后再进行实验。