

T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)

产品编号	产品名称	包装
D7080S	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250U
D7080M	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	1250U
D7080L	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	5000U

产品简介:

- 碧云天生产的T7 Endonuclease I (T7 Endo I, T7EI), 即T7核酸内切酶I, 是一种比较特殊的DNA内切酶, 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)。T7EI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脂键。此外, T7EI也能以很慢的速度切割含有缺刻的双链DNA(nicked double-stranded DNA)。本产品常用于CRISPR/Cas9等导致的基因突变的鉴定。
- T7EI切割错配碱基位点的活性如图1所示。需要特别注意的是T7EI能识别长度大于或等于2bp的插入、缺失或突变导致的错配DNA, 不能识1bp的插入、缺失或突变。

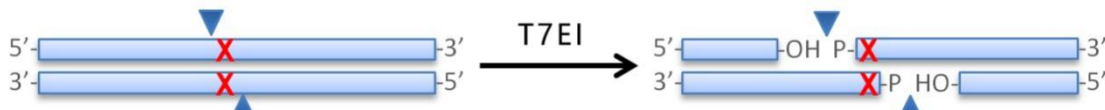


图1. T7 Endonuclease I (T7EI)切割位点示意图。X, 代表错配位点。

- 用途:** T7EI常用于CRISPR/Cas9、TALEN或以及其它基因编辑工具形成的突变体检测, 也常用于基因点突变和SNP的检测, 也可以用于分解四方向交叉DNA(four-way junction)或分支DNA(branched DNA)、检测或切割异源双链DNA和缺刻DNA(heteroduplex and nicked DNA), 以及随机切割线性DNA(借助线性DNA分子内或分子间部分配对形成的不完全匹配双链DNA)用于进行鸟枪法(Shot-gun)克隆和测序等。
- 碧云天生产的T7EI酶切野生型/突变体形成的杂合双链DNA的效果(图2):

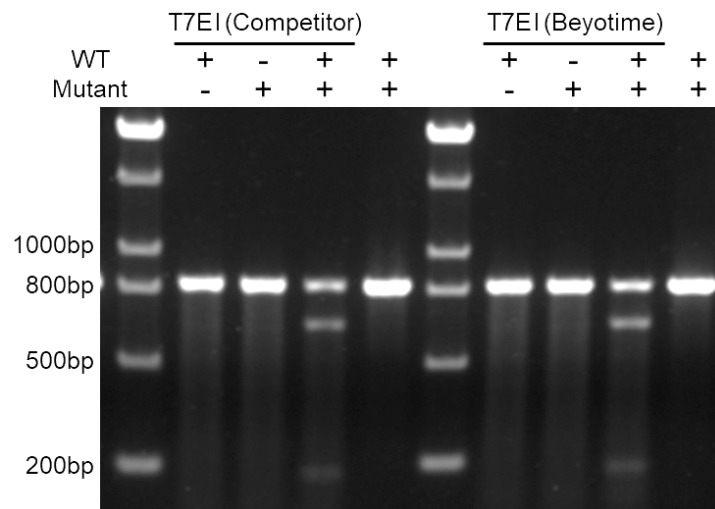


图2. 碧云天生产的T7EI和国际知名品牌的同类产品(Competitor T7EI)酶切野生型/突变体形成的杂合双链DNA效果图。使用高保真酶分别PCR扩增不带突变位点的野生型DNA片段(WT, 800bp)以及有5个碱基突变的DNA片段(Mutant, 800bp), 经电泳检测它们的PCR产物均为单一条带后, 按图所示将200ng的野生型片段、200ng的突变体片段及100 ng突变体片段与100 ng野生型混合物分别经变性、退火和复性处理(95°C 5min, 95°C-85°C -2°C/second, 85°C-25°C -0.1°C/second)后加入10U T7EI, 37°C酶切30min, 然后进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测。如图所示, 野生型与突变体的混合物经退火后部分片段会形成5个碱基的错配loop区并被T7EI识别和酶切, 800bp的片段被切割成600bp和200bp两个片段, 而单独的野生型或单独的突变体则不会被切割。

- 碧云天生产的T7EI酶兼容性好, 与碧云天的多种PCR扩增体系是完全兼容的(图3)。对于PCR产物通常无须任何纯化处理即可用于本产品的酶切鉴定。

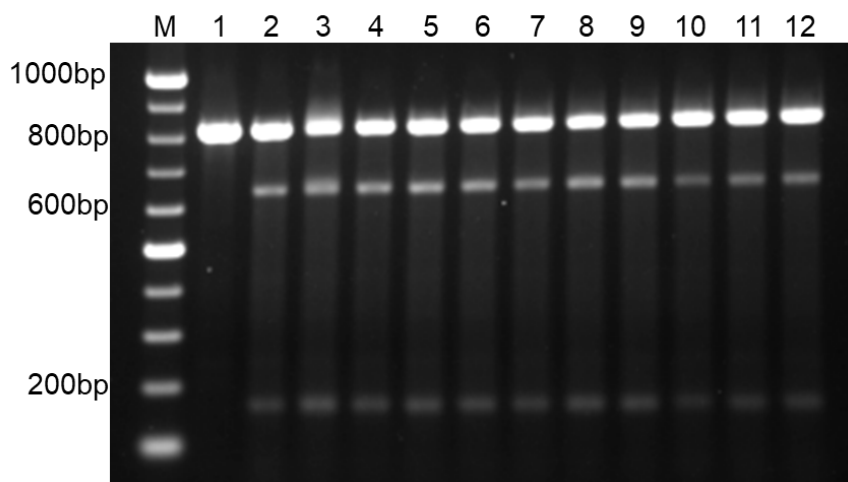


图3. 碧云天生产的T7 Endonuclease I (T7EI)对于碧云天不同PCR buffer的兼容效果。酶切体系为20 μ l，将本试剂盒提供的Control Template (D7080-3)分别加入不同的PCR buffer体系至PCR buffer为1X，混匀后，取5 μ l至一新的离心管中作为酶切底物。随后加入2 μ l 10X Reaction Buffer (D7080-2)、12 μ l 超纯水和1 μ l T7EI (10U/ μ l) (D7080-1)，混匀后37 $^{\circ}$ C酶切30min，1%的琼脂糖凝胶电泳检测。1. 不加T7EI；2. 加T7EI，用水取代PCR buffer；3. D7205-2 10X PCR Buffer (with Mg²⁺)；4. D7218-2 10X BeyoTaq Buffer (with Mg²⁺)；5. D7216-2 10X Pfu Buffer (with Mg²⁺)；6. D7220-2/D7222-2 10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg²⁺)；7. D7211-2 10X Hot-Start PCR Buffer；8. D7213-2 10X BeyoAmp™ Buffer；9. D7215-2 10X BeyoAmp™ Plus Buffer；10. D7241S-2 10X HemoTaq™ PCR Buffer；11. D7243S-2 10X HemoTaq™ HF PCR Buffer；12. D7248S-2 10X PlantTaq™ PCR Buffer。如图所示，本产品 and 这些PCR buffer体系都可以很好兼容。因此在目的条带正确且单一时可以不经过纯化直接取5 μ l PCR产物至酶切体系中变性退火后进行酶切反应。

- **来源：**大肠杆菌表达的T7噬菌体基因3的重组蛋白。
- **活性定义：**One unit is defined as the amount of enzyme required to convert > 90% of 1 μ g of supercoiled cruciform pUC(AT) to > 90% linear form in a total reaction volume of 50 μ l in 1 hour at 37 $^{\circ}$ C。
- **10X Reaction Buffer:** 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 7.9。
- **纯度：**纯度大于95%，不含T7EI之外的DNA内切酶和外切酶，不含RNA酶，不含磷酸酯酶。
- **失活或抑制：**85 $^{\circ}$ C加热15min或加入EDTA至终浓度20mM可以使T7EI失活。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7080S-1	T7 Endonuclease I (10U/ μ l)	25 μ l
D7080S-2	10X Reaction Buffer	0.2ml
D7080S-3	Control template (100ng/ μ l)	10 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7080M-1	T7 Endonuclease I (10U/ μ l)	125 μ l
D7080M-2	10X Reaction Buffer	0.5ml
D7080M-3	Control template (100ng/ μ l)	20 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7080L-1	T7 Endonuclease I (10U/ μ l)	0.5ml
D7080L-2	10X Reaction Buffer	1.2ml
D7080L-3	Control template (100ng/ μ l)	50 μ l
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，至少一年有效。

注意事项：

- T7EI 是一种依赖于底物结构并进行选择性酶切的酶，其对不同的 DNA 底物显示出不同的反应活性。因此，切割特定底物时，必须控制好酶量和反应时间。
- 反应温度超过 42 $^{\circ}$ C 时，会增加其非特异性酶切的活性；而反应温度超过 55 $^{\circ}$ C 则会降低其酶活性。

- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

- 按下表配置反应体系(以 20 μ l 体系为例)。通常 PCR 产物推荐使用 5 μ l，过多的 PCR 产物由于 PCR buffer 的存在可能会干扰后续的酶切反应。

Component	Positive Control	Negative Control	Control template
PCR product(约200ng)	5 μ l	5 μ l	2 μ l
10 x T7 Endonuclease I Reaction Buffer	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Nuclease-free Water	12 μ l	12 μ l	15 μ l

- 退火反应：

Step	Temperature	Time
1	95°C	5min
2	95°C-85°C	-2°C/sec
3	85°C-25°C	- 0.1°C/sec
4	4°C	Hold

- 在上述 19 μ l 退火后的体系中加入 1 μ l T7EI，37°C 孵育 15-30min。通常孵育 15min 已经足够，如果希望确保获得更好的酶切效果可以孵育 30min。
- 85°C 加热 15min 或加入 1.5 μ l 的 0.25 M EDTA 终止酶切反应。
- 将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，拍照观察，并分析酶切效果。Control Template 酶切后的效果请参考图 3。

Version 2020.05.06