

## 北京唯尚立德生物科技有限公司

### T7 核酸内切酶 I (T7 endonuclease I, T7E1)

货号		规格		价格	
#E001S		300 units		询价	
#E001L		1500 units		询价	
浓度	5,000 units/mL	储存	-20°C	反应条件	37°C 温育

编号	组成	E001S	E001L
1	T7E1	300U	5×300U
2	10× T7E1 buffer	200μL	5×200μL
3	阳性 DNA 与引物	Control 引物(10μM)	20μL
4		Control C(10ng/μL)	40μL
5		Control G(10ng/μL)	40μL

#### 应用

- 基因突变和 SNP 的检测, 可应用于 TALEN、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
- 检测或切割异源二聚体 DNA 和切割 DNA
- 随机切割线性 DNA 进行 shot-gun 克隆

#### 概述

T7 核酸内切酶 I 识别并切割不完全配对 DNA、十字型结构 DNA、Holliday 结构或交叉 DNA、异源双链 DNA 或者以更慢的速度切割或切割双链 DNA。该酶切割错配碱基 5' 端的第一、第二或第三个磷酸二酯键。

#### 来源

重组 T7 核酸内切酶 I (T7 endonuclease I, T7E1)

#### 反应条件

Buffer [50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (pH 7.9 @ 25°C)], 即同 1X NEBuffer 2, 37°C 温育。

#### 质保声明

T7 核酸内切酶 I 经过严格的质控检测, 确保该产品具有最高的活性和纯度。请使用前务必仔细阅读本手册。

#### 单位定义

1 单位指在 50 μL 反应体系, 37°C, 1 小时将 1 μg 超螺旋十字型结构的 pUC (AT) 质粒酶切成 90% 以上的线性 DNA 所需要的酶量。

#### 注意事项

T7 核酸内切酶 I 是一种具有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。切割特定底物时, 必须控制酶量和反应时间。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, 会导致酶活性降低。

#### T7E1 酶切法检测突变体实验步骤

##### 1、PCR 扩增目的片段:

PCR 扩增出带有突变位点(如 TALEN or CRISPR/Cas9 的 target site) DNA 片段, 长度约 500 bp, 突变位点最好不位于 PCR 片段中央, 这样将切割出两条大小不同的带;

PCR 反应的具体体系及条件参考实际使用的 PCR 聚合酶使用说明。

##### 2、突变体 DNA 与野生型 DNA 的 PCR 产物(无需纯化处理)按如下体系混合于 EP 管中:

## 北京唯尚立德生物科技有限公司

编号	1	2	3
突变体 DNA PCR 产物	5 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L	0
野生型 DNA PCR 产物	0	2.5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
10X T7E1 Buffer	1.1 $\mu$ L	1.1 $\mu$ L	1.1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	4.4 $\mu$ L	4.4 $\mu$ L	4.4 $\mu$ L
Total		10.5 $\mu$ L	

### 3、加热变性、退火复性处理：

两种方法处理，任选其一，如下：

I、在 1L 的烧杯中加入 500mL 水，加热使其沸腾后，将步骤 2 中的 EP 管置于浮板上放入沸水中，停止加热，将烧杯置于室温，待其自然冷却至室温即可（此过程大约需 1 至 1.5 小时）

II、使用 PCR 仪进行退火处理，设置程序如下，

95 $^{\circ}$ C 5 min  
 94 $^{\circ}$ C 2 sec, -0.1 $^{\circ}$ C/cycle, 200 times  
 75 $^{\circ}$ C 1 sec, -0.1 $^{\circ}$ C/cycle, 600 times  
 16 $^{\circ}$ C 2 min

### 4、T7E1 酶切反应：

上述反应体系分别加入 0.5  $\mu$ L T7E1 酶，37 $^{\circ}$ C 反应 20-30 min 后，立刻加 2 $\mu$ L DNA Loading Buffer（客户自备），混匀后 65 $^{\circ}$ C 煮 10 min，跑 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测分析酶切结果。（放置时间过长可能会导致 PCR 产物全部降解）

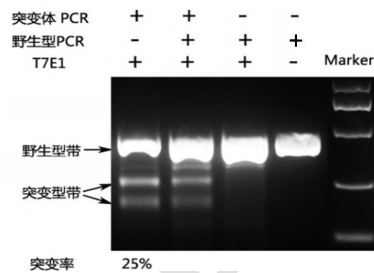


图. 非配对内切酶法-T7E1 法检测突变体的突变率。  
 突变型带：大约 300+200bp  
 野生型带：大约 500bp  
 突变率=突变型带/(野生型带+突变型带)（按照带的灰度计算）

### 阳性参照

阳性参照是一个碱基的点突变检测。使用本试剂盒提供阳性参照引物的混合物：

Control-GC-F ACACCTGATCAAGCCTGTTC  
 Control-GC-R CGCCAAAGAATGATCTGCG

分别以阳性 DNA **Control C** 和 **Control G** 为模板，PCR 扩增出 600bp 的阳性 DNA 片段，点突变标示如下：

ACACCTGATCAAGCCTGTTC\*\*\*\*\***G**\*\*\*\*\*CGCAGATCATTCTTTGGCG  
 TGTGGACTAGTTCGGACAAG\*\*\*\*\***C**\*\*\*\*\*GCGTCTAGTAAGAAACCGC

阳性参照可以分别单独 PCR 扩增后，PCR 产物等量混合，或者混合 DNA 模板进行 PCR 扩增，PCR 产物进行加热变性、退火复性处理后，使用 T7E1 酶切，产生 400bp+200bp 两个端片段。

### 使用限制

本试剂仅限于科学研究。

### 储存与安全

本品 4 $^{\circ}$ C 运输，储存于 -20 $^{\circ}$ C，有效期 12 个月。长期储存请置于 -80 $^{\circ}$ C。

本品采用蓝冰运输，蓝冰在使用前在 -80 $^{\circ}$ C 冷冻至少 72 小时。实验证明，使用上述方法运输，即使到货时蓝冰已经融化，泡沫塑料盒中的温度仍然能保持在 4 $^{\circ}$ C 或 4 $^{\circ}$ C 以下 24 小时。比较干冰运输的产品，其活性和稳定性无任何差异。产品纯化整个过程都在 4 $^{\circ}$ C 进行，且其贮存液经过优化，对保持酶活的稳定性起到重要作用。产品中含有 50% 甘油，可以使酶在 -35 $^{\circ}$ C 下保持液态，若使用干冰运输，酶将被冷冻，发生反复冻融可能会导致酶活性下降。