

riboEDIT™ T7EI Enzyme (10U/uL) 产品使用说明

RN: R12002.1

产品简介

riboEDIT™ T7EI Enzymes 是经 *E.coli* 重组表达的结构特异性酶，可识别并切割非完全配对的双链 DNA、十字形结构 DNA、Holliday 交叉 DNA、异源双链 DNA，或缓慢地切割带有切刻的双链 DNA；可有效识别大于 1 个碱基的基因错配，广泛应用于由 CRISPR-Cas9、锌指核酸酶(ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)等工程核酸酶所介导的基因突变检测。

表 1 试剂盒组分清单

试剂组分	浓度	C11054-1	C11054-2	C11054-3
		20T	100T	500T
riboEDIT™ T7EI Enzyme	10U/μL	10μL	50μL	250μL
riboEDIT™ T7EI Buffer	10x	50μL	250μL	1250μL
Nuclease-free Water	-	1mL	1mL X 2	5mL X 2

运输保存

产品为**低温运输**。

收到产品后，请于**-20℃**保存，可以稳定保存 1 年。

使用前请**瞬时离心**。

产品须知

应用

基因突变检测

ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9 形成的突变体检测

检测或切割异源二聚体 DNA

产品来源

E.coli 重组表达

实验方法

T7E1酶切检测CRISPR-Cas9形成的插入/缺失突变 (indel) 操作步骤

实验步骤

- 1) 提取基因组: 收集经 CRISPR-Cas9 编辑的细胞, 抽提基因组, 并用紫外分光光度计定量。
- 2) PCR 扩增目的片段: 将纯化得到的基因组 DNA 稀释至合适的浓度范围, 吸取 100ng-500ng 基因组 DNA 用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 扩增包含突变位点的目的 DNA 片段, 并取少量样品跑琼脂糖凝胶, 检测 PCR 扩增产物的特异性。
- 3) PCR 产物纯化: 采用 DNA 纯化试剂盒或乙醇沉淀法纯化目的 DNA 片段, 并取少量样品跑琼脂糖凝胶, 以确保条带单一, 无杂带。用微量紫外分光光度计定量, 调整浓度至 50ng/ μ L。
- 4) DNA 片段退火: 纯化的 DNA 片段按照以下 DNA 双链退火体系 (表 1) 进行混合, 充分混匀后置于 PCR 仪器中运行以下退火程序 (表 2)。

注: 如果步骤 2) 中 PCR 产物特异性高, 可不进行 DNA 片段纯化步骤, 直接吸取 5-8 μ L PCR 产物加入退火体系直接进行双链 DNA 退火。

表 1. DNA 双链退火体系

组分	体积
10X riboEDIT™ T7E1 Buffer	2 μ L
纯化目的 DNA 片段 (50ng/ μ L)	4 μ L
Nuclease-free Water	14 μ L

表 2. DNA 双链退火程序

温度	降温速率	时间
95°C	-	5 min
95°C-85°C	2°C/s	-
85°C-25°C	0.1°C/s	-
25°C	-	5min

- 5) T7E1 酶切: 退火完成后, 每管加入 0.5 μ L riboEDIT™ T7E1 Enzyme (10U/ μ L), 37°C 温育 30min。
- 6) 电泳检测: T7E1 酶切后, 产物进行纯化, 然后使用 2%-3% 琼脂糖凝胶电泳或 Agilent 2200 Tape Station 检测酶切条带和 indel 效率。
- 7) Indel% 计算: 通过 Agilent 2200 Tape Station 检测得到的 DNA 片段分布和浓度结果, 如示例图片, a 为未切开的片段的摩尔浓度 (Peak Molarity [pmol/l]), b、c 分别为切开片段的摩尔浓度 (Peak Molarity [pmol/l])。或通过 ImageJ 等软件定量凝胶电泳条带, a 为未切开的片段的灰度值, b、c 分别为切开片段的灰度值, 按照以下公式计算基因编辑效率:

$$f(\text{cut}) = (b+c)/(a+b+c)$$

$$\text{Indel}\% = 100 * (1 - \sqrt{1 - f(\text{cut})})\%$$

示例图片

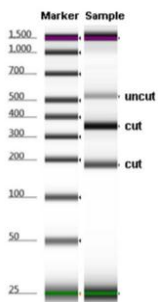


Fig 1. Agilent 2200 Tape Station 检测 T7E1 酶切后的 DNA 片段

FAQ

1. T7E1 酶切检测 CRISPR-Cas9 编辑效率发现无剪切条带是什么原因?

答: 可能原因如下:

- (1) CRISPR-Cas9 体系没有产生 indel, 建议实验前确保 CRISPR-Cas9 体系有效性。
- (2) 在细胞内, Cas9 核酸酶无法接近靶位点或无法剪切靶位点, 建议重新设计向导 RNA。
- (3) 没有进行 DNA 片段的变性、退火步骤, 可通过设置阳性对照组确认实验操作是否有误。

2. 琼脂糖凝胶电泳分析剪切效率时非特异性条带多, 无法分析剪切效率怎么办?

答: 可能原因如下:

- (1) 可通过设置阴性对照组来区分目标剪切条带和非目标条带。必要时, 需重新设计引物, 或通过优化 PCR 条件, 来降低非特异性扩增。建议采用巢式 PCR, 提高扩增片段的特异性。
- (2) 如果在编辑位点附近存在 SNP, 则不能用 T7E1 酶检测是否存在突变。

3. T7E1 突变检测时, 出现条带弥散的现象, 应该如何解决?

答: 由于 T7E1 酶本身具有弱的非特异切割 DNA 链的能力, 所以遇到这种情况, 可以增加 DNA 用量, 降低酶的用量, 减少酶切时间来降低非特异切割现象。