GenePharma

吉玛基因

www.genepharma.com

T7E1突变检测试剂盒操作手册

Operation Manual of T7E1 Mutation Assay Kits

上海电话：021-51320195　　E-mail：support@genepharma.com
苏州电话：0512-86668828　　E-mail：szsupport@genepharma.com
官网网址：www.genepharma.com

B014-V002-20230913

一、产品简介

T7E1突变检测试剂盒是检测DNA突变、DNA多态性的简单快速试剂盒。试剂盒主要利用T7核酸内切酶I能准确识别并切割不完全配对DNA的性质，检测PCR产物内所有类型的碱基替换以及插入/缺失突变。突变检测试剂盒广泛应用于精确检测人、哺乳动物、细菌、真菌、病毒以及植物基因的突变,也可用于基因的多态分析。

二、应用

用于TILLING、ZFN、TALEN和CRISPR-Cas9实验活性检测、突变效率检测及阳性克隆筛选；单核苷酸多态性(SNP)检测，碱基替换、插入或缺失突变检测。

三、T7E1酶的性质

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刻双链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。

四、运输及保存

T7E1突变检测试剂盒可以通过低温或干冰运输；-20ºC可保存1年。

五、试剂盒清单

T7E1	10X T7E1 Buffer	突变体DNA-PC	野生型DNA-NC
50 μL	100 μL	10 μL (1μg)	10 μL (1μg)

六、操作步骤

1、待检测DNA片段

一般采用PCR方法得到待检测DNA片段。

*本试剂盒内自带①阴性对照：野生型DNA-NC；②阳性对照：突变体DNA-PC。

2、制备杂链DNA片段

待检DNA或阴性对照、阳性对照，按下列组分配置退火反应液：

编号	PC	NC	待测DNA
突变体DNA-PC	2μL(200ng)	0	0
野生型DNA -NC	0	2μL (200ng)	0
待测DNA PCR产物	0	0	300-500ng
10X T7E1 Buffer	2μL	2μL	2μL
ddH2O	To 19μL	To 19μL	To 19μL
充分混合后，退火			

建议退火反应条件：

95℃ 5 min
95℃ 2 sec
-0.1℃/cycle, 200 times
75℃ 1 sec
-0.1℃/cycle, 600 times
16℃ 2 min

3、T7E1处理

体系	体积
退火后产物	19μL
T7E1	1μL
反应温度：37℃ 反应时间：30分钟	

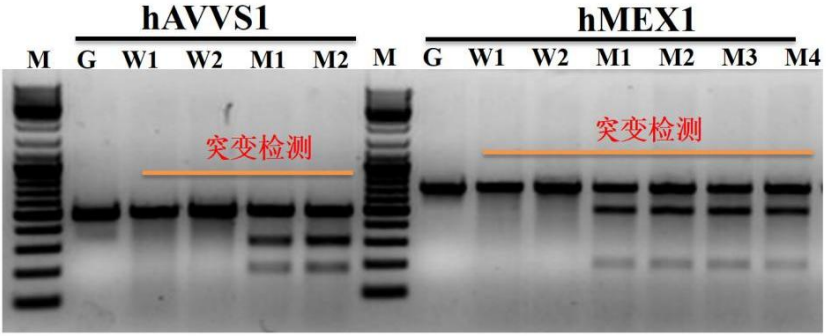
4、电泳分析

一般使用2%浓度的琼脂糖凝胶电泳分析检测产物，小片段使用1×TAE buffer电泳效果更好，阴性对照结果得到与PCR产物一样大小的产物，阳性对照除有PCR产物大小条带（灰度为a）外，还存在2个小的剪切条带（灰度为b和c），表明基因含有突变。

酶切片段比例：fcut=（b+c）/（a+b+c）

突变效率：indel（%）=100× $(1-\sqrt{(1-f_{cut})})$

图例：



上图为T7E1突变检测试剂盒检测的hAVVS1基因和hMEX1基因突变结果(胶图反色)。G为W1 PCR回收产物，WI W2为对应基因野生DNA检测结果，M1-M4 为对应基因突变 DNA 检测结果。

5、注意事项

T7E1具有底物结构选择性，能慢速切割或切刻双链DNA，检测突变时必须控制好酶量和反应时间，如果酶切后产物出现弥散，降低酶的用量再进行检测。