

产品简介

FEN1 是经构建特殊融合表达载体, 转化宿主工程菌发酵表达、精制纯化而成, 无核酸及核酸酶残留。FEN1 可催化双链 DNA 底物位点 5' DNA flaps 的切割, 形成 5' 磷酸末端, 其切割产物, 可以通过 DNA 连接酶连接, 以产生双链 DNA。在细胞内, FEN1 是冈崎片段成熟途径的重要参与者, 在碱基切除修复中也发挥作用。

产品组成

组成	E208 (1,600 U)
FEN1 (32 U/μl)	50 μl
10 × FEN1 Buffer	2 × 750 μl

产品应用

特异性切割 flap DNA 结构

储存条件

-20°C 保存, 于 -20 ~ 0°C 运输。▲ 避免反复冻融。

单位定义

在 10 μl 的反应体系中, 65°C 孵育 10 min, 可切割 10 pmol 的带有 5' flap 寡核苷酸底物的酶量定义为一个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测: 20 U 本品和 0.6 μg λ-Hind III 在 74°C 下孵育 1 h, DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测: 20 μl 反应体系, 10 U 本品和 1 μg λDNA, 37°C 温育 4 h, DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测: 20 U 本品和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30 min, RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测: 50 μl 体系中, 以 ddH₂O 为模板, 扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 染色, 无扩增条带。

实验案例

1. 体系配制

组分	用量 (A 组)	用量 (B 组)
10 × FEN1 Buffer	2 μl	2 μl
Target ssDNA	5 μl	5 μl
DP	5 μl	5 μl
UP	5 μl	5 μl
FEN1	2 μl	-
ddH ₂ O	to 20 μl	to 20 μl

2. 65°C 孵育 1 h, 得到如 Fig. 1 所示结果

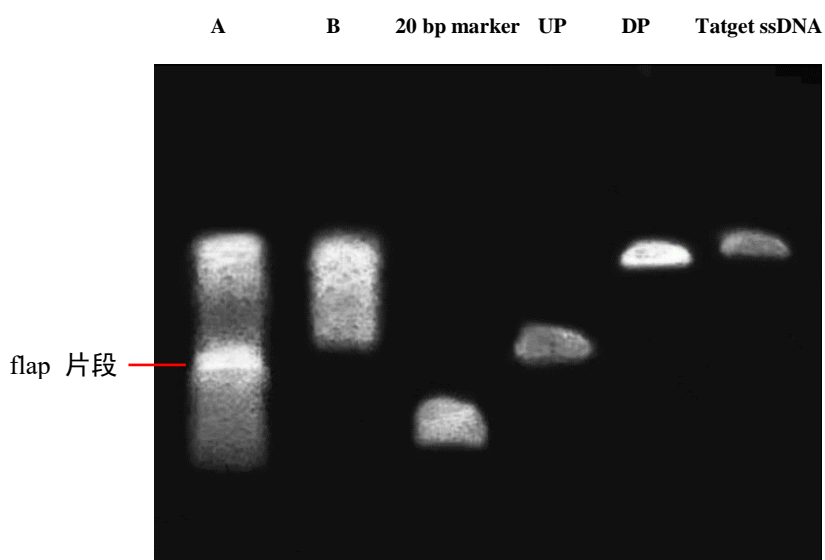


Fig. 1 FEN1 水解 Flap 片段结果图

注: Tatget ssDNA (43 nt): 单链靶标 DNA; UP (26 nt): 5'端 24 nt 与 Tatget ssDNA 上游的 5'端互补, 3'端剩余碱基 2 nt 与 Tatget ssDNA 不互补的引物; DP (40 nt): 5'端 21 nt 与 Tatget ssDNA 上游的 5'端不互补, 3'端剩余碱基 19 nt 与 Tatget ssDNA 互补的引物。

结论: 由 A 和 B 两组实验结果发现, 添加 FEN1 后可特异性切割产生游离的 flap 片段。