天净沙系列

CAT#:240335

低温运输，-20℃保存

天净沙

大肠杆菌核糖核酸酶 HII 5 U/μL

Skygen RNase HII 5 U/μL

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是大肠杆菌核糖核酸酶 HII，也称核糖核酸酶 H2 (RNase H2)，是大肠杆菌来源的重组核糖核酸内切酶。RNase HII 能够催化双链 DNA 分子内部嵌入的单个核糖核苷酸或核糖核苷酸链的 5′端磷酸二酯键的断裂，并产生一个 5′端磷酸基团和一个 3′端羟基。同时，RNase HII 对单链 RNA 以及单链 RNA 和单链 DNA 杂合双链中的 RNA 的切割活性极低，对 dsDNA、ssDNA 无切割活性；此外，RNase HII 还可沿着冈崎片段的 RNA 部分在多个位点进行缺刻 (Nick) 切割。本产品特点如下：

1. 本产品浓度为：5 U/μL。
2. 可识别双链 DNA 分子中的单个核糖核苷酸并进行切割。可降解冈崎片段。
3. 一个单位定义为：在 37°C、1× Buffer 中，30 分钟内产生与切割 100 pmoL 合成双链 DNA 底物所对应的荧光信号所需的酶量，该底物在荧光基团/淬灭基团对中的淬灭基团附近含有单个核糖核苷酸。
4. 不含除 RNase HII 之外其它种类的核糖核酸内切酶，不含外切酶。
5. 不能进行热失活；与 0.1% SDS 一起孵育可使 RNase HII 充分失活。
6. 纯化自携带编码大肠杆菌 RNase HII 核糖核酸内切酶基因的 *E.coli* 重组菌株。
7. 本产品仅能用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成分	编号	规格	包装
大肠杆菌核糖核酸酶 HII 5 U/μL	240335	50 μL	1.0 mL 本色瓶
10×反应缓冲液	240335a	300 μL	1.0 mL 本色瓶
使用手册	240335sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。

自备物品

底物等。

使用流程

一、双链 DNA 中单个核糖核苷酸的缺刻切割或冈崎片段中与 DNA 相邻的核糖核苷酸 5′端的切割：

1. 参考下表的配制反应体系，冰上进行（50 μL 体系）

组份	体积	最终浓度
含核苷酸的双链 DNA	X μL (100 pmoL)	2 pmoL/μL
10×反应缓冲液	5 μL	1 X
大肠杆菌核糖核酸酶 HII 5 U/μL	1 μL	0.1 U/μL

无核酸酶水	(44-x) μL	-

2. 为获得最好的底物切割效果，建议尝试多种 RNase HII 的加入量，摸索最优酶切反应体系。
3. 按照上表设置好反应体系后，适当轻轻混匀反应体系，随后低速离心以使粘附在管壁上的液体聚集于管底。
4. 反应条件：37°C 孵育 30 分钟。注：反应时间可以根据实际情况适当调节和优化，以确保获得更好的酶切效果。
5. 终止反应：反应完成后，向反应体系中加入终浓度为 0.1% SDS 可使其充分失活。
6. 8 M 尿素变性 PAGE 电泳检测含单个核苷酸的双链 DNA 切割效果，或进行后续实验。

二、RNase HII 与 T7 核酸内切酶 I 同时使用，在双链 DNA 核糖核苷酸位点处切割产生双链断裂：

7. 参考下表的配制反应体系，冰上进行（50 μL 体系）

组份	体积	最终浓度
含核苷酸的双链 DNA	X μL (100 pmoL)	2 pmoL/μL
10×反应缓冲液	5 μL	1 X
大肠杆菌核糖核酸酶 HII 5 U/μL	1 μL	0.1 U/μL
T7 核酸内切酶 I (10 U/μL)	2 μL	0.4 U/μL
无核酸酶水	(42-x) μL	-

8. 按照上表设置好反应体系后，适当轻轻混匀反应体系，随后低速离心以使粘附在管壁上的液体聚集于管底。
9. 反应条件：37°C 孵育 15-30 分钟。注：反应时间可根据实际情况适当调节和优化，以确保获得更好的酶切效果。
10. 终止反应：反应完成后，向反应体系中加入终浓度为 0.1% SDS 可使其充分失活。
11. 8 M 尿素变性 PAGE 电泳检测双链 DNA 切割效果，或进行后续实验。

三、RNase HII-dependent PCR (rhPCR)，即核糖核酸酶 HII 依赖性 PCR：

12. 引物设计：rhPCR 的引物需设计成不能被 DNA 聚合酶进行延伸，且在 3′末端附近含有单个核糖核苷酸。因此 rhPCR 的引物在设计时须符合以下三个要求：
    a) 5′端长度，GC 含量和 Tm 与常规 PCR 一致，以保证后续在被 RNase HII 切割后延伸的正常进行。

b) 单个核糖核苷酸，为 RNase HII 提供切割位点。

c) 3′端单个核糖核苷酸后为 4 个或 5 个核苷酸长度的延伸，再加上一个不可延伸的阻断分子，如双脱氧核糖核酸、丙二醇或其它封闭基团，以阻止 DNA 聚合酶的延伸，除非阻断分子被 RNase HII 酶切后移除。

13. 参考下表的配制反应体系，冰上进行（50 μL 体系）

组份	体积	最终浓度
模版 DNA	X μL	10 pg-1 μg/50 μL
10× Taq 反应缓冲液 (含 Mg2+)	5 μL	1 X
dNTP（2.5 mM）	4 μL	0.2 mM
引物混合液（10 mM）	4 μL	0.8 μM
大肠杆菌核糖核酸酶 HII 5 U/μL	1 μL	0.1 U/μL
Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)	0.25 μL	0.025 U/μL
无核酸酶水	(35.75-x) μL	-

14. 对于不同类型的模板在 50 μL 反应体积中推荐用量如下：哺乳动物基因组 DNA：0.1-1 μg；大肠杆菌基因组 DNA：10-100 ng；质粒 DNA：0.1-10 ng。过多的模板 DNA 容易导致非特异性的 PCR 产物。

15. 使用移液器轻轻吹打混匀或轻微混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。

16. 如果所使用的 PCR 仪有热盖则省略本步骤。如果 PCR 仪没有热盖，则在管内滴入一滴矿物油。

17. 各设置好的 PCR 反应管置于 PCR 仪上，准备进行 PCR 反应。

18. rhPCR 反应参数的设置可以参考如下示例：

程序	温度	时间
起始变性	94°C	3 min
30 个循环	94°C	30 sec
	55-60°C	30 sec
	72°C	2 min
最终延伸	72°C	10 min
4°C forever		

	19. PCR 反应的设置需根据模板、引物、PCR 产物的长度和 GC 含量等条件的不同设定不同的 PCR 反应条件包括温度、时间和循环数等。 20. 延伸的时间（72°C，2 min）设置需根据 PCR 产物的长度进行设置，通常每 kb 产物的延伸时间为 1.5 分钟。例如 PCR 产物的长度为 1 kb，则延伸时间可以设置为 1.5 分钟，PCR 产物的长度为 2 kb，则延伸时间可以设置为 3 分钟，以此类推。 21. 对于初次进行的 PCR，为尽量确保可以扩增出预期的 PCR 产物，可以把循环数设置为 35。对于需进行半定量或定量的 PCR 反应循环数一定要进行适当优化，使 PCR 反应没有达到平台期。 **四、注意事项** 22. 与 RNase H 相比，RNase HII 对 RNA/DNA 杂交链中 RNA 的酶切活性较低。 23. RNase HII 处理冈崎片段时，优先在 RNA/DNA 序列交界处的核糖核苷酸处产生 5′缺刻。 24. 相比与 RNA/DNA 杂交链或冈崎片段，RNase HII 更倾向于切割含有单个核糖核苷酸的双链 DNA 分子。 25. 用于依赖于 RNase HII 的 PCR 时(rhPCR)，需要使用 3′端带封闭基团的 DNA 引物。 26. RNase HII 在 50-75°C 之间均有活性，其用量可根据不同的应用进行适当调节。 27. RNase HII 与绝大多数的 PCR，LAMP 等缓冲体系兼容。 28. RNase HII 在 Mg2+浓度为 1-6 mM 之间的缓冲体系中均可发挥活性。 29. RNase HII 极其耐热，95°C 15 分钟活性无明显降低，不能进行热失活；反应结束后加入 0.1% SDS 或 DNA Loading Buffer 可使其充分失活。
关联产品	大肠杆菌 MutL 蛋白，0.5 μg/μL