

产品组分

组分名称	组分目录号	浓度	规格-1 5,000 U	规格-2 25,000 U
Exonuclease III (<i>E.coli</i>)	RM20521	100,000 U/mL	50 µL	250 µL
10X ABuffer A	RM20125	10X	1.25 mL	1.25 mL

产品说明

Exonuclease III (*E.coli*) (Exo III)能降解 dsDNA 的平末端、5'-突出末端或切口，从 dsDNA 链的 3'-OH 末端逐步释放 5'-单磷酸核苷酸，产生 ssDNA 片段。每次 Exo III 酶结合到 dsDNA 上时，都有少量核苷酸被移除，从而导致 DNA 分子群体中发生不同程度的末端渐进缺失。

尽管 Exo III 可以将 dsDNA 上的 Nicks 外切成 Gaps，但 Exo III 的最佳底物是平末端 dsDNA 或 3'-末端凹陷 dsDNA。3'-突出末端的 dsDNA 能阻止 Exo III 降解，其抵制程度取决于 3'-突出末端的突出长度，突出 4 个或更长的碱基时能够完全阻止 Exo III 的酶切。另外，该酶对 ssDNA、硫代磷酸酯连接的核苷酸无活性。

Exo III 的酶活性部分依赖于 DNA 的螺旋结构，并表现出序列依赖性(C>A=T>G)。温度、盐浓度、酶与 DNA 的比值都能够对酶活性产生很大影响，所以不同的应用需要使用不同的反应条件。

Exo III 还具有以下三种酶活性：

3'-磷酸酶活性：切除 3'-末端的磷酸基团，产生 3'-OH 基团；

RNase H 活性：外切核酸酶活性，降解 RNA-DNA 杂合体中的 RNA 链；

AP-内切核酸酶活性：切割脱嘌呤或脱嘧啶位点(AP 位点)的磷酸二酯键，产生 5'-端无碱基的脱氧核糖 5'-磷酸残基。

保存温度

-20°C

产品应用

- 与 S1 Nuclease 协同作用，制备单向缺失的 DNA 片段
- 定点突变
- 链特异性探针制备
- Sanger 法测序单链底物制备

产品来源

E.coli 来源的 Exo III 基因在大肠杆菌中表达并分离纯化得到。

活性定义

1 活性单位(U)是指在 50 µL 反应体系中，在 37°C 30 min 内催化 0.15 mM [³H]-dsDNA 释放 1 nmol 酸溶性物质所需的酶量。

反应条件

1X ABuffer A, 37°C 反应

1X ABuffer A 组成

10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7 @ 25°C

酶储存液

5 mM KPO₄, 200 mM KCl, 5 mM β-ME, 0.05 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 6.5 @ 25°C

热失活

70°C, 20 min

注意事项

- 硫代磷酸键不能被 Exo III 所酶切。
- DNA 片段单向删除缺失也可以被α-硫代磷酸酯连接的 3'-末端所保护。
- Exo III 在 ABclonal Buffer 中的活性分别为：

ABuffer A	ABuffer B	ABuffer C	ABuffer S	CutS
100%	75%	25%	75%	100%

使用说明

Exo III 可从 3'至 5'方向，有效降解具有缺口的 dsDNA 和线性 dsDNA（平末端或 5'突出），使超螺旋 dsDNA 完好无损，可参考以下步骤进行酶切反应：

1. 冰上配置反应体系。

组分	使用量
DNA	~5 μg
Exonuclease III (<i>E.coli</i>)	0.5 μL (50 U)
10X ABuffer A	5 μL
Nuclease-Free-Water	to 50 μL

2. 37°C 孵育 30 min。

3. 加入终浓度至少为 11 mM 的 EDTA 终止反应。

4. 70°C 孵育 30 min 使酶失活。

5. 要纯化酶切处理过的样品，我们建议使用以下步骤之一：

- ① 采用 DNA 柱式纯化试剂盒对产物进行纯化；
- ② 在琼脂糖凝胶上对产物进行电泳，然后使用凝胶回收试剂盒进行 DNA 回收；
- ③ 进行苯酚/氯仿萃取，然后采用乙醇沉淀。

注：对于需要更精确的结果或部分消化酶解反应，推荐酶与底物的滴定来确定具体投量。