

## Exonuclease III

产品编号	产品名称	包装
D6002S	Exonuclease III	5kU
D6002M	Exonuclease III	25kU
D6002L	Exonuclease III	100kU

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的Exonuclease III, 即核酸外切酶III, 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种能够特异催化缺刻或线性双链DNA从3'到5'方向降解的核酸外切酶[1]。本产品可以用于定点突变、探针制备、形成巢式缺失, 也可用于在双脱氧测序反应中产生单链线性DNA[1, 2]。
- Exonuclease III对平末端或5'突出末端的双链DNA具有催化偏好性, 对3'突出末端双链DNA的催化效率受粘性末端长度的影响, 超过4个碱基的3'突出末端会抑制Exonuclease III的酶切活性; 不能水解单链DNA及RNA[3]。同时, Exonuclease III还具有RNase H、3'-phosphatase和AP-endonuclease活性[4]。
- Exonuclease III与Exonuclease I (D6000)不同的是, 对单链DNA无催化降解活性, 只能特异性催化具有5'/3'突出末端、平末端或缺刻的双链线性DNA沿3'到5'方向的降解, 逐步去除单个dNMP; 对于单链DNA从3'到5'方向的降解, 推荐使用碧云天Exonuclease I (D6000); 对于单链DNA/RNA从3'到5'方向降解或将带有3'突出末端的双链DNA或双链RNA生成平末端, 推荐使用碧云天Exonuclease T (D6003); 对于单链DNA从5'到3'方向的降解或部分消除双链DNA的5'单链突出末端, 推荐使用碧云天RecJ<sub>r</sub> Exonuclease (D6006); 对于双链或单链DNA从5'到3'方向的降解, 推荐使用碧云天T5 Exonuclease (D7082); 对于带有5'磷酸化修饰的双链或单链线性DNA的降解, 推荐使用碧云天Lambda Exonuclease (D7084); 对于双链DNA从5'到3'方向的消化, 推荐使用碧云天Exonuclease VIII, truncated (D7088)。
- 碧云天Exonuclease III (D6002)识别并酶切双链DNA的原理请参考图1。

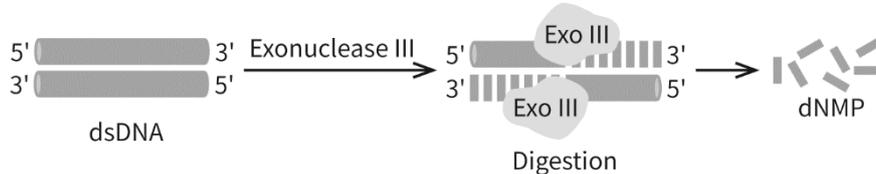


图1. 碧云天Exonuclease III (D6002)识别并酶切双链DNA的原理图。

- 碧云天Exonuclease III (D6002)催化降解不同类型双链DNA的效果请参考图2。

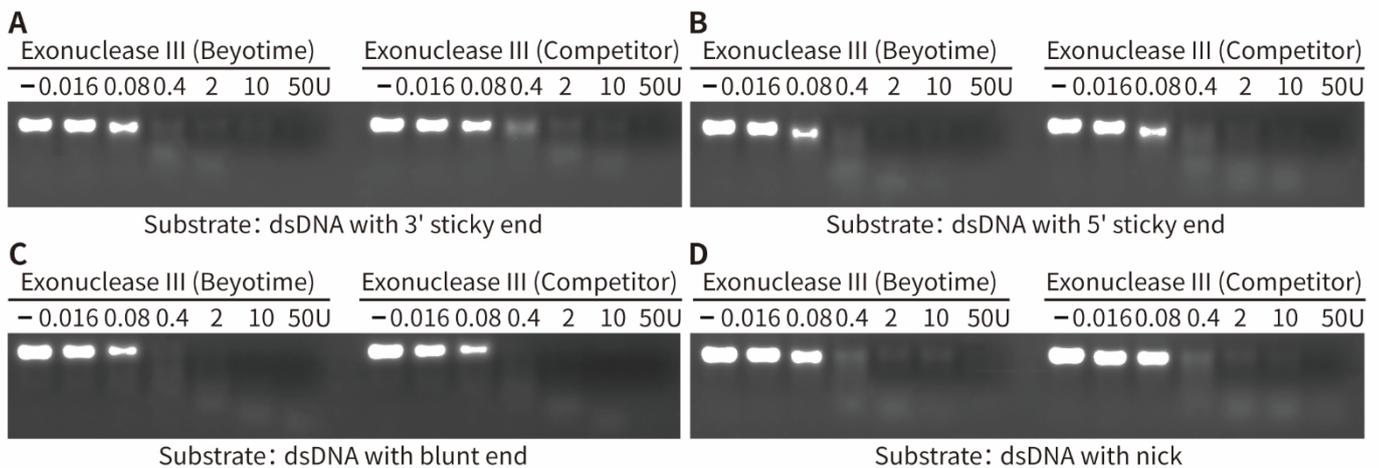


图2. 碧云天Exonuclease III (D6002)和N公司的同类产品(Competitor)催化降解不同类型双链DNA的效果图。在50μl反应体系(10mM Bis-Tris-Propane-HCl (pH 7.0 @ 25°C), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT)中加入10pmol不同类型的双链DNA (图A: 带有3'粘性末端的双链DNA; 图B: 带有5'粘性末端的双链DNA; 图C: 带有平末端的双链DNA; 图D: 带有缺刻的双链DNA)以及图中指定量的本产品或N公司的Exonuclease III, 适量BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876), 37°C 孵育30分钟进行反应, 反应结束后加入终浓度为11mM的EDTA, 再70°C加热30分钟进行失活, 随后立即放至冰上, 并加入DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 随后用3.5%琼脂糖凝胶电泳(170V电泳30分钟)进行电泳分析, 并使用NA-Red (EB升级换代产品, 2000X)

(D0128/D0130)室温染色5分钟，最终进行核酸染色和荧光成像分析。如图所示，本产品与N公司的产品相比，具有类似的消化降解各类型双链DNA的效果。各类型双链DNA的制备方法：将不同长度的互补DNA单链按照Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)说明书中的使用方法通过梯度降温退火形成不同类型的双链DNA。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- **用途：**定点突变；特异性探针的制备；形成巢式缺失；PCR产物的克隆；在双脱氧测序反应中产生单链线性DNA；与S1 Nuclease 配合使用，在DNA中形成单向缺失。
- **来源：**大肠杆菌表达的重组蛋白，表达基因为大肠杆菌Exonuclease III。
- **活性单位定义：**One unit is defined as the amount of enzyme required to produce 1nmol of acid-soluble total nucleotide in a total reaction volume of 50μl in 30 minutes at 37°C in 1X Reaction Buffer with 0.15mM sonicated duplex [<sup>3</sup>H]-DNA.
- **纯度：**不含除Exonuclease III以外的其它种类DNA内切酶和外切酶，不含RNA酶。
- **酶储存溶液：**5mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH6.5 @ 25°C), 200mM KCl, 200μg/ml BSA, 0.05mM EDTA, 5mM DTT, 50% (v/v) Glycerol.
- **Reaction Buffer (10X)：**100mM Bis-Tris-Propane-HCl (pH 7.0 @ 25°C), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT.
- **失活或抑制：**反应结束后先加入终浓度为11mM的EDTA终止反应，再进行70°C加热30分钟，使Exonuclease III充分失活。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D6002S-1	Exonuclease III (100U/μl)	50μl
D6002S-2	Reaction Buffer (10X)	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D6002M-1	Exonuclease III (100U/μl)	250μl
D6002M-2	Reaction Buffer (10X)	5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D6002L-1	Exonuclease III (100U/μl)	1ml
D6002L-2	Reaction Buffer (10X)	20ml
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20°C保存，两年有效。

#### 注意事项：

- Exonuclease III使用时宜放在冰盒内或冰浴上，使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- Exonuclease III对作用底物具有高度选择性，仅特异性催化双链DNA从3'到5'方向的降解，不能催化单链DNA和RNA的消化。请务必选择特定类型的底物，使用Exonuclease III进行酶切反应。
- 当单链DNA的5'端和3'端能相互配对形成双链时，双链部分也可以被Exonuclease III所酶切消化的。因此需要通过二级结构的预测和分析来确定单链DNA是否也可能被Exonuclease III所部分酶切消化。
- 3'突出末端超过4个碱基的双链DNA会抑制Exonuclease III的催化活性，不能被Exonuclease III有效水解。
- Exonuclease III的最佳反应温度是37°C，反应结束后先加入终浓度为11mM的EDTA终止反应，再进行70°C孵育30分钟，可以使其完全失活。
- 碧云天同时在售多种类型核酸外切酶，请根据底物类型及实验需求，自主选择合适的核酸外切酶产品进行酶切反应。
- Exonuclease III不能催化硫代磷酸链的水解，因此可通过加入含α-硫代磷酸的核苷酸来保护一个末端不被酶切，对DNA形成单向缺失。
- 桌面以及仪器设备表面等环境中的RNase、DNase、RNA和DNA的去除推荐使用碧云天RNase, DNase, RNA and DNA Away (R0127)进行快速处理。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. 双链DNA的退火。

将两条单链DNA等摩尔数(推荐终浓度为20μM (10-50μM均可))混合，90°C孵育1分钟，然后通过梯度降温至25°C退火形成dsDNA。推荐使用碧云天生产的Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)，并按照该产品使用说明进行退火反应。

##### 2. 以缺刻或双链DNA为底物，参考下表在冰浴中配制如下反应体系：

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease free Water	(44.5-x) $\mu$ l	-
Reaction Buffer (10X)	5 $\mu$ l	1X
dsDNA Substrate	x $\mu$ l (up to 5 $\mu$ g)	0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l
Exonuclease III (100U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	1U/ $\mu$ l
Total Volume	50 $\mu$ l	-

**注1:** 按上表配制好反应体系后, 适当轻轻混匀反应体系(可以用移液器吹打混匀, 或用Vortex在最低速度轻轻混匀), 随后低速离心使粘附在管壁上的液体沉至管底。

**注2:** 如果只进行一个反应, 请把除Exonuclease III以外的组分充分混匀后, 最后加入Exonuclease III; 如果同时进行多个反应, 可以把上表中除dsDNA Substrate之外的所有溶液和酶提前预混合后分装到各反应管内, 最后加入dsDNA Substrate。

**注3:** 为获得最好的底物酶切效果, 也可根据实际情况, 参考酶活单位定义适当调整底物与酶的用量, 摸索最优酶促反应体系。

**注4:** 反应体系中的dsDNA Substrate的最终浓度可以达到0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l, 用量已经比较大, 在该反应体系中可以确保充分酶切。实际使用过程中, 例如由于底物量有限等原因, 可以适当减少dsDNA Substrate的用量。

**注5:** Exonuclease III对平末端或5'突出末端双链DNA具有催化偏好性, 但对3'突出末端双链DNA的催化效率受突出末端长度的影响, 超过4个碱基的3'突出末端长度会抑制Exonuclease III的酶切活性, 推荐根据催化降解的底物类型不同, 适当调节反应时间。

**注6:** 温度、盐浓度、酶与DNA的比例对Exonuclease III活性影响很大, 因此可根据具体应用调整反应体系和反应条件。

3. **反应条件:** 37°C孵育30分钟。如果发现效果欠佳可以根据实际情况酌情适当调节反应时间。

4. **终止反应:** 反应结束后先加入终浓度为11mM的EDTA终止反应, 再70°C孵育30分钟, 使Exonuclease III充分失活。

5. **取消消化后的产物进行聚丙烯酰胺电泳或琼脂糖凝胶电泳, 拍照观察并分析效果。**

**注:** 由于Exonuclease III已经过充分失活处理, 反应产物通常无需进行纯化处理, 可直接用于后续相关实验; 如果后续实验对样品纯度要求较高, 可以通过酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化已消化去除双链DNA的反应产物, 或使用适当的DNA纯化试剂盒进行产物纯化。如果需要从酶切消化反应体系中纯化DNA样品, 推荐使用碧云天PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒(D0033); 如果需从琼脂糖凝胶中回收DNA样品, 推荐使用DNA凝胶回收试剂盒(D0056)或BeyoMag™磁珠法DNA凝胶回收试剂盒(D0043)。

6. **其它应用请参考相关文献进行。**

#### 常见问题:

1. Exonuclease III可以催化单链DNA或RNA样品的酶切消除吗?

不可以。Exonuclease III对作用底物具有高度选择性, 只能催化缺刻或双链线性DNA的水解, 对于其他类型的DNA或RNA底物均没有催化酶解活性。其中, Exonuclease III对平末端或5'突出末端双链DNA具有催化偏好性, 但对3'突出末端双链DNA的催化效率受突出碱基长度的影响, 超过4个碱基的3'突出末端长度会抑制Exonuclease III的酶切活性。

2. Exonuclease III的最佳反应温度是多少?

Exonuclease III在37°C条件下具有最佳酶活性。

3. Exonuclease III可以进行热失活吗? 终止Exonuclease III酶活反应的条件是什么?

可以。反应完成后, 建议先加入终浓度为11mM的EDTA, 再将反应产物在70°C条件下孵育30分钟, 即可使Exonuclease III充分失活, 以终止反应。

4. Exonuclease III是否可以和单链核酸外切酶配合使用, 用于质粒样品的纯化?

Exonuclease III可以和单链核酸外切酶, 如碧云天Exonuclease I (D6000), 配合使用对质粒样品进行纯化制备, 但同时会对带有缺刻的质粒造成降解和损伤, 这样理论上可以获得仅包含开环和超螺旋的质粒, 不会含有线性和缺刻的质粒。

5. Exonuclease III与T5 Exonuclease之间有什么不同?

两者都可以作用于双链DNA分子的降解, 但催化水解的方向相反, 其中Exonuclease III是沿3'→5'方向的消化双链DNA分子, 而T5 Exonuclease是沿5'→3'方向酶解双链或单链DNA分子。

6. Exonuclease III与Exonuclease I之间有什么不同?

两者都是沿着3'→5'方向催化DNA底物降解的核酸外切酶, 但Exonuclease III只特异性作用于缺刻或双链线性DNA, 而Exonuclease I只特异性作用于单链线性DNA。

7. Exonuclease III与T7 Exonuclease之间有什么不同?

两者作用底物类型相同, 但催化水解的方向相反, Exonuclease III是沿3'→5'方向的消化缺刻或双链DNA分子, 而T7 Exonuclease是沿5'→3'方向酶解缺刻或双链DNA分子。

8. Exonuclease III能否沿5'→3'方向降双链DNA分子?

不能。Exonuclease III只能特异性催化双链DNA分子沿着3'→5'方向逐步去除单个脱氧核糖核苷酸, 而不能对双链DNA分子从5'→3'方向降解。

#### 参考文献:

1. Smith AJ. Nucleic Acids Res. 1979. 6(3):831-48.
2. Guo LH, Wu R. Nucleic Acids Res. 1982. 10(6):2065-84.
3. Zhu YS, Isaacs ST, Cimino CD and Hearst JE. Nucleic Acids Res. 1991. 19(9):2511.
4. Rogers SG, Weiss B. Methods Enzymol. 1980. 65(1):201-11.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0251	Annealing Buffer for DNA Oligos (5X)	1ml
D6000	Exonuclease I	2kU/10kU/50kU
D6002	Exonuclease III	5kU/25kU/100kU
D6003	Exonuclease T	250U/1250U/5000U
D6006	RecJ <sub>f</sub> Exonuclease	1.5KU/7.5KU/30KU
D7082	T5 Exonuclease	1000U/5000U/20kU
D7084	Lambda Exonuclease	1KU/5KU/25KU
D7088	Exonuclease VIII, truncated	500U/2KU/10KU
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
ST036	DEPC	10g
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml/500ml
ST1249	DEPC (≥97%, Reagent grade)	2ml/10ml

Version 2025.01.16