

1. ОПИСАНИЕ

T5 экзонуклеаза — это нуклеаза бактериофага T5, экспрессированная в штамме *E. coli*.

2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

ОЧИСТКА ПЛАЗМИД И GIBSON ASSEMBLY

1. Для удаления линейной ДНК добавьте 1–5 ед. T5 экзонуклеазы на 1 мкг препарата.
2. Используйте 1X реакционный буфер (содержит Mg^{2+}).
3. Инкубируйте при 37°C в течение 30 минут.
4. Для сборки Гибсона фермент создает одноцепочечные «хвосты» на концах фрагментов.
5. В стандартной смеси T5 работает в паре с Phusion-полимеразой и Taq-лигазой.

3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- Сверхспирализованная плазмидная ДНК устойчива к T5, однако если плазида имеет много «ников», фермент начнет её деградацию. Не передерживайте реакцию более 60 минут.
- Наличие ЭДТА в концентрациях выше 1 мМ может полностью заблокировать активность, так как фермент требует ионов магния.
- Фермент сохраняет около 50–70% активности в большинстве стандартных ПЦР-буферов, если в них достаточно $Mg(2+)$.

4. ЧАСТЫЕ ВОПРОСЫ (FAQ)

В: Чем T5 экзонуклеаза отличается от Экзонуклеазы III?

О: Экзо III работает в направлении $3' \rightarrow 5'$ и не имеет эндонуклеазной активности к ssDNA. T5 работает в противоположном направлении ($5' \rightarrow 3'$) и расщепляет одноцепочечные кольцевые ДНК.

В: Можно ли использовать T5 для очистки ПЦР-смеси?

О: Да, она удалит праймеры и линейную матрицу. Однако, если ваш ПЦР-продукт линейный, T5 деградирует и его.

5. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

500 ЕД.

- 1 пробирка: 100 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 1 мл 10x реакционного буфера

2 500 ЕД.

- 1 пробирка: 500 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 1 мл 10x реакционного буфера

6. ХАРАКТЕРИСТИКИ

АКТИВНОСТЬ

5 ед./мкл

ИНАКТИВАЦИЯ

Нагревание или добавление хелаторов (ЭДТА)

7. СОСТАВ РАСТВОРОВ

10X реакционный буфер: 500 мМ KOAc (pH 7.9), 200 мМ Tris-OAc, 100 мМ Mg(OAc)₂, 10 мМ DTT

Буфер для хранения: 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 1 мМ TCEP, 0.1 мМ EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% глицерин

8. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За одну единицу активности принято количество фермента, необходимое для изменения оптической плотности $A(260)$ на 0.00032 за 1 минуту при 37°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Хранить при -20°C. Буфер для хранения содержит Triton X-100 и TCEP для обеспечения стабильности фермента при многократном использовании.