

DNase I, RNase-Free, HC

使用说明书

货号/规格: E1018-A/1,000 U

浓度: 50 U/ μ L

产品简介

DNase I (无 RNase) 是一种可酶切单链和双链 DNA 的核酸内切酶。它水解磷酸二酯键, 产生带有 5'-磷酸基团和 3'-OH 基团的单脱氧核糖核苷酸和寡脱氧核糖核苷酸。

该酶的活性严格依赖于 Ca^{2+} , 由 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 离子活化。

在 Mg^{2+} 存在时, DNase I 以统计意义上随机的方式独立切割 dsDNA 各链。 Mn^{2+} 存在时, 该酶几乎在同一位点切割两条 DNA 链, 产生带有平末端或仅一或两个核苷酸的突出端的 DNA 片段。

产品组成

组分	E1018-A
DNase I, RNase-Free, HC (50 U/ μ L)	20 μ L
10X DNase I Buffer (Mg^{2+} Plus)	1 mL
EDTA (50 mM)	1 mL

储存条件

保存于 $-20^{\circ}C$ 。

来源

重组 *E. coli* 菌株, 含有编码牛 DNase I 的克隆基因。

单位定义

一个单位是指在 $37^{\circ}C$ 下 1 分钟内完全降解 1 μ g 质粒 DNA 所需的酶量。

在以下混合物中测定酶活性:

10 mM Tris-HCl ($25^{\circ}C$ 时 pH 7.5)、2.5 mM $MgCl_2$ 、0.1 mM $CaCl_2$ 、1 μ g pUC19 DNA。
一个 DNase I 单位相当于 0.3 Kunitz 单位。

特点

- 重组酶
- 从非动物宿主纯化而来, 内源性 RNase 水平较低

适用范围

- 制备不含 DNA 的 RNA
- 体外转录后去除模板 DNA
- 在进行 RT-PCR 和 RT-qPCR 之前制备无 DNA 的 RNA
- 与 DNA 聚合酶 I 配合, 通过缺口平移进行 DNA 标记
- 采用 DNase I (无 RNase) 足迹法进行 DNA-蛋白相互作用研究
- 生成随机重叠 DNA 插入片段文库。使用含有 Mn^{2+} 的反应缓冲液

抑制与失活

- 抑制剂: 金属螯合剂、毫摩尔浓度的过渡金属 (例如锌)、SDS (即使浓度低于 0.1%)、还原剂 (DTT 和 β -巯基乙醇), 离子强度高于 50-100 mM。
- 在 EGTA 或 EDTA 存在下, 通过在 $65^{\circ}C$ 下加热 10 分钟灭活 (每 1 mol Mn^{2+}/Mg^{2+} 至少使用 1 mol EGTA/EDTA)。

使用方法

1. 从 RNA 样品中去除基因组 DNA

① 在 RNase-Free 的管中准备反应体系:

Component	Amount
RNA	1 μ g
10X DNase I Buffer (Mg^{2+} Plus)	1 μ L
DNase I, RNase-Free, HC (50 U/ μ L)	1 μ L
DEPC-treated Water (#R2041)	To 10 μ L

② $37^{\circ}C$ 孵育 30 min。

③ 加入 $1\ \mu\text{L}$ $50\ \text{mM}$ EDTA, 并在 65°C 下孵育 10 分钟。在没有螯合剂的情况下, RNA 在加热过程中与二价阳离子水解。或者, 使用苯酚/氯仿萃取。

④ 使用制备的 RNA 作为逆转录酶的模板。

注意:

- 每 $1\ \mu\text{g}$ RNA 使用不超过 1 U 的 DNase I, RNase-Free。
- DNase I, RNase-Free, HC 可以在使用前在 1X 反应缓冲液中稀释, 或在储存缓冲液中稀释以延长储存时间。
- 反应混合物和 $50\ \text{mM}$ EDTA 溶液的体积可以放大以获得大量的 RNA。RNA 的推荐终浓度为 $0.1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。
- RNase 抑制剂 RNasin (#R2011) 也可包含在反应混合物中, 以防止 RNA 降解。

2. 体外转录后去除模板 DNA

① 按每 $1\ \mu\text{g}$ 模板 DNA 中加入 2 U DNase I, RNase-Free, 直接添加到转录反应混合物中。在某些情况下, 应根据经验确定酶的量。

② 37°C 孵育 15 min。

③ 通过苯酚/氯仿提取灭活 DNase I。

3. 缺口平移法标记 DNA

① 准备反应体系:

Component	Amount
10X reaction buffer for DNA Polymerase I	2.5 μL
Mixture of 3 dNTPs, 1 mM* each (without the labeled dNTP)	1.25 μL
[α - ^{32}P]-dNTP, ~110 TBq/mmol (3000 Ci/mmol)	1.85-3.7 MBq (50-100 μCi)
DNase I, RNase-free freshly diluted to 0.002 U/ μL **	1 μL
DNA Polymerase I (#E1021)	5-15 U
Template DNA	0.25 μg
Water, nuclease-free (#P9021)	To 25 μL

注意:

* 要制备 3 个未标记的 dNTP (每个 1mM) 的混合物, 将每个 dNTP 的 $1\ \mu\text{L}$ 样品 ($100\ \text{mM}$) 与 $97\ \mu\text{L}$ 无核酸酶的水混合。储存在 -20°C 。

** DNase I, RNase-Free 可用 DNA 聚合酶 I 的 1X 反应缓冲液稀释: $50\ \text{mM}$ Tris-HCl (25°C 时 pH 7.5)、 $10\ \text{mM}$ MgCl_2 和 $1\ \text{mM}$ DTT。

② 立即在 15°C 孵育 15-60 min。

③ 通过加入 $1\ \mu\text{L}$ $0.5\ \text{M}$ EDTA, pH 8.0 终止反应。

④ 取一份样品 ($1\ \mu\text{L}$) 测定标记掺入的效率。预计 DNA 的比活性至少为 $10^8\ \text{cpm}/\mu\text{g}$ 。

本品仅供科学研究使用。