



DNase I, RNase frei

Desoxyribonuklease I

DNase I Endonuklease

Artikel Nr.	Größe
E1345-01	1.000 Einheiten
E1345-02	5.000 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Einheit wird als die Menge des Enzyms definiert, die erforderlich ist, um 1 µg Plasmid-DNA in 10 Minuten bei 37°C vollständig zu verdauen.

Eine funktionelle Einheit Dnase I besitzt etwa die Enzymaktivität von 0,3 Einheiten nach Kunitz (3).

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°

Qualitätskontrolle:

Funktionaler Test durch Verdau von Plasmid-DNA. Die Abwesenheit von RNase-Aktivität wurde validiert, indem Konzentrationen von RNA-Proben vor und nach Inkubation mit einem Überschuss an DNase I spektrophotometrisch vermessen wurden.

Hinweis 1: Diese DNase I-Präparation enthält keine Beimischung von Ribonuklease-Inhibitor und ist entsprechend vor RNase-Kontamination zu schützen. Ribonuklease Inhibitor ist als separates Produkt erhältlich (Best. Nr. E4210).

Hinweis 2: DNase I reagiert empfindlich gegenüber physikalischer Denaturierung. Deswegen sollten DNase I-haltige Lösungen keinesfalls gevortext werden. Durchmischen des Ansatzes erfolgt durch vorsichtiges Anschnipsen bzw. Invertieren des Reaktionsgefäßes oder durch Pipettieren.

Unspezifische Deoxyribonuclease, Endonuklease, erzeugt 5'-phosphorylierte di-, tri- und Oligonukleotide aus einzel- und doppelsträngiger DNA.

Anwendungsgebiete:

- Darstellung DNA-freier RNA durch Abbau kontaminierender DNA in RNA-Präparationen (3).
- Vorbereitung DNA-freier RNA zur weiteren Verwendung in RT-PCR und RT-qPCR (4).
- Abbau von Vorlagen-DNA ("Template") nach *in vitro* Transkription.
- Studien von DNA-Protein Interaktionen (Footprinting).
- DNA-Markierung ("Labelling") durch Einkerbungs-Ersetzung ("Nick-Translation").
- Erzeugung zufällig geschnittener DNA-Fragmente ("Random Libraries") (5).

Enzymatische Aktivität:

DNase I benötigt Ca²⁺ und Mg²⁺ - Ionen um doppelsträngige DNA zu hydrolysieren. In Gegenwart von Mg²⁺ schneidet DNase I jeden der beiden dsDNA-Stränge unabhängig voneinander an zufällig gewählten Stellen (Reaktionspuffer I zum vollständigen Abbau von kontaminierender DNA aus RNA-Präparationen). In Gegenwart von Mn²⁺ schneidet das Enzym hingegen beide dsDNA-Stränge an etwa der selben Stelle. Hierdurch werden DNA-Fragmente mit stumpfen Enden ("blunt") oder mit überhängenden Enden einer Länge von nur einem oder zwei Nukleotiden geschnitten (Reaktionspuffer 2 für Erzeugung von Zufallsbibliotheken) (5).

10x Reaktionspuffer I (Reaction Buffer I, → RNA-Isolierung):

100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 100 mM CaCl₂, pH 7.4 @ 25°C.

10x Reaktionspuffer II (Reaction Buffer II, → DNA-Bibliotheken):

20 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 22°C), 300 mM KCl, 0.1 mM Dithiothreitol, 7 mM EDTA, 20 mM Magnesiumazetat, 200 µg/ml Rinderserumalbumin und 50% [v/v] Glycerin.

Inaktivierung:

Hitzeinaktivierung für 10 Minuten bei 65°C in Gegenwart von EDTA oder EGTA (Chelatbildner).

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

20 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol und 0.6 nmol [³H]poly(A)-poly(dT) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl (6).

Chemische Inhibitoren:

Metallchelatorbildner (EDTA, EGTA), Übergangsmetalle, SDS, reduzierende Agenzien ((DTT, β-Mercaptoethanol).

Literatur:

1. Kunitz, M (1950) *J. Gen Physiol* 33: 349-362.
2. Vanecko, S und Laskowski, M (1961). *J Biol Chem* 236: 3312-3316.
3. Siehe Hinweise zum jeweils optionalen, aber meist nicht erforderlichen DNase I Verdau in den Manuals der GeneMatrix RNA-Kit Serie (Best Nr. E359-6, -7, -8 und -9).
4. Sanyal, A., et al. (1997) *Mol. Biotechnol.*, 8, 135-137.
5. Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.