

# DNase I

## Deoxyribonuclease I [E.C. 3.1.21.1]

From bovine pancreas

Product	Cat#	Package size
DNase I, min. 3000 U/mg (Kunitz)	M3028.0010	10mg
DNase I, min. 3000 U/mg (Kunitz)	M3028.0050	50mg
DNase I, min. 3000 U/mg (Kunitz)	M3028.0500	500mg

### Product description

Deoxyribonuclease I (DNase I) from bovine pancreas is an endonuclease (glycoprotein), which preferentially cleaves the phosphodiester bond in DNA behind pyrimidine nucleotides. This results in a polynucleotide with a 5'-phosphate and a free OH-group in position 3'. DNase I cleaves single-stranded and double-stranded DNA as well as chromatin. The specificity of the enzyme reaction (single-strand-“Nicks” versus double-stranded breaks) is determined by the ions available. In the presence of Mg<sup>2+</sup> single-strand nicks are generated and in the presence of Mn<sup>2+</sup> double-strand breaks. The pH-optimum of DNase I is 7.8 and it is activated by divalent cations. Maximum activation requires the presence of Mg<sup>2+</sup> and additional Ca<sup>2+</sup>. Calcium ions (5mM) protect DNase I from proteolytic digest. Inhibition is achieved by citrate, if activation is done by magnesium, but not if manganese has been the activator. Besides, it is inhibited by chelators such as EDTA and SDS or β-mercaptoethanol.

DNase I is used, among other things, to avoid unwanted cell clumping during tissue disaggregation, which makes dispersion of individual cells difficult. Since tissue disaggregation and subsequent isolation of single cells is always accompanied by rupture and lysis of some cells, DNA is released from these cells into the surrounding medium. The released DNA in the medium is thought to be responsible for undesirable cell clumping during tissue dissociation procedures. This clumping effect can be avoided by adding deoxyribonuclease (DNase) to the dissociation medium and has been described for a variety of different cell and tissue types.

The enzyme can also be used in molecular biology techniques like digestion of DNA, in the RNA purification (ref. 2 Suppl. 1 pp. 4.1.4) or generating “random nicks” for “nick translation” (ref. 2 Suppl. 9 pp. 3.5.4-6) or “footprint”-assays (ref. 2 Suppl. 7 chapter 12.4) or investigation on chromatin (ref. 2 Suppl. 48 chapter 21.4.1).

**NOTE:** This product is NOT recommended for isolation of RNA without prior chemical treatment to get rid of remaining RNase activity as this enzyme preparation is not guaranteed to be free of RNase activity.

### Preparation of stock solution

DNase I is used to digest DNA in the isolation and purification of RNA. Dissolve DNase at 2mg/mL in 0.15M sodium chloride or reaction buffer (e.g., 50mM Tris/HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub> (single strand nicks) or 10mM MnCl<sub>2</sub> (double strand breaks) respectively, 50µg/mL BSA).

### Storage and stability

For stability reasons the concentration of DNase I containing solutions should be at least 1mg/mL. Do not vortex.

This solution is stable for more than one year at -20°C (ref. 2 Suppl. 8 page 3.12.5).

The lyophilised form is stable for 2-5 years if kept at +2°C to +8°C.

If a solution is protease-free, DNase I will not lose significant activity at pH5-7 and 62°C for 5 hours.

**Heat-inactivation of DNase I:** Heat to 99°C for 10 minutes.

### Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme required to completely degrade 1µg of lambda DNA in 10 minutes at 37°C in 50µL of a buffer containing 40mM Tris/HCl (pH8.0), 10mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub> and 10mM CaCl<sub>2</sub>. Under these conditions one unit of DNase I activity is comparable to 1 Kunitz unit.

**Alternative definition:** One unit is defined as the amount of enzyme which causes an increase of absorbance at 260nm of 0.001 per minute at 25 °C and pH5.0 based on the method of Kunitz.

### Preparation of RNase-free DNase I (according to ref. 2, page 3.12.6 Supplement 8):

Since DNase I may contain trace amounts of RNases, it is recommended that DNase I is treated with the following protocol prior to use.

- Dissolve 1mg/mL DNase I in 0.1M iodoacetic acid plus 0.15M sodium acetate at a final pH of 5.3.
- Heat to 55°C for 40 minutes, then cool down the solution.
- Add 1M CaCl<sub>2</sub> to a final concentration of 5mM.
- Store in small aliquots at -20°C.

### Material needed but not supplied:

- 10X Reaction Buffer: 400mM Tris/HCl (pH8.0), 100mM MgSO<sub>4</sub> and 10mM CaCl<sub>2</sub>.
- Storage Buffer: 20mM Tris/HCl (pH7.5), 50% glycerol (v/v), 1mM MgCl<sub>2</sub>. **NOTE:** conc. of DNase I: not below 1mg/mL!
- Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup>
- Stop solution: 20mM EGTA (pH8.0)

### Associated activities

To test RNase activity, 50ng of [<sup>3</sup>H]RNA is incubated with 5 units DNase I in transcription buffer for 1 hour at 37°C, and the release of radiolabeled nucleotides is monitored by scintillation counting of TCA-soluble material. For passing the test the maximum count has to be below 3%.

### Inhibitors

EGTA; EDTA; DTT; salt concentration >100mM

### Specifications

<b>Source:</b>	bovine pancreas
<b>Molecular weight:</b>	approx. 31 kDa
<b>CAS number:</b>	[9003-98-9]
<b>Activity:</b>	min. 3000 U/mg (Kunitz)
<b>Solubility:</b>	Dissolves readily at 5mg/mL in 150mM NaCl to give a clear, colourless solution.
<b>RNase activity:</b>	not guaranteed free of RNase activity
<b>Storage:</b>	-20°C

### Literature

- (1) Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Seiten A4.40-42. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- (2) Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) 2001. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- (3) McDonald, M.R. (1955) *Methods Enzymol.* **2**, 437-447 Deoxyribonukleasen
- (4) Campbell, V.W. & Jackson, D.A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3726-3735  
Der Effekt von zweiwertigen Kationen auf den Wirkungsmechanismus von DNase I.
- (5) Meinkoth, J. & Wahl, G.M. (1987) *Methods Enzymol.* **152**, 91-94 Nick-Translation.
- (6) Cobianchi, F. & Wilson, S.H. (1987) *Methods Enzymol.* **152**, 94-110  
Enzyme zum Modifizieren und Markieren von DNA und RNA.

# DNase I

## Deoxyribonuclease 1 [E.C. 3.1.21.1]

Aus Rinderpankreas / Nicht RNase frei

Product	Cat#	Package size
DNase I, min. 3000 U/mg (Kunitz)	M3028.0010	10mg
DNase I, min. 3000 U/mg (Kunitz)	M3028.0050	50mg
DNase I, min. 3000 U/mg (Kunitz)	M3028.0500	500mg

### Produktbeschreibung

Deoxyribonuclease I (DNase I) aus Rinderpankreas ist eine Endonuclease (Glykoprotein), die die Phosphodiesterbindung in der DNA bevorzugt hinter Pyrimidinnucleotiden spaltet. Daraus ergibt sich ein Polynucleotid mit einem 5'-Phosphat und eine freie OH-Gruppe in Position 3'. DNase I schneidet einzelsträngige und doppelsträngige DNA sowie Chromatin. Die Spezifität der Enzymreaktion (Einzelstrang-'Nicks' versus Doppelstrang-Brüche) wird durch die verfügbaren Ionen bestimmt. In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  werden Einzelstrang-'Nicks' produziert und bei  $Mn^{2+}$  Doppelstrang-Brüche. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 7,8 und es wird durch zweiwertige Metallionen aktiviert. Maximale Aktivierung bedarf der Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und zusätzlich  $Ca^{2+}$ . Calcium-Ionen (5 mM) schützen DNase I vor proteolytischem Verdau. Eine Hemmung wird durch Citrat erzielt, wenn die Aktivierung durch Magnesium erfolgte, nicht aber, wenn Mangan als Aktivator fungierte. Des Weiteren hemmen Chelatoren wie EDTA und SDS oder  $\beta$ -Mercaptoethanol DNase I.

DNase I wird unter anderem dazu verwendet unerwünschte Verklumpung bei der Gewebedisaggregation zu vermeiden, die eine Dispersion einzelner Zellen erschwert. Da die Disaggregation von Gewebe und die nachfolgende Isolierung einzelner Zellen immer mit der Ruptur und Lyse einiger Zellen einhergeht, wird DNA aus diesen Zellen in das umgebende Medium abgegeben. Die freigesetzte DNA im Medium wird für die unerwünschte Zellverklumpung bei Gewebedissoziationsverfahren verantwortlich gemacht. Dieser Verklumpungseffekt kann durch Zugabe von Desoxyribonuclease (DNase) zum Dissoziationsmedium vermieden werden und wurde für eine Vielzahl von verschiedenen Zell- und Gewebetypen beschrieben.

Das Enzym kann in molekularbiologischen Techniken Anwendung finden, zum Beispiel zum Verdau von DNA, bei der RNA-Reinigung (Ref. 2 Suppl. 1 Seiten 4.1.4), dem 'Setzen' von 'random nicks' für die 'nick translation' (Ref. 2 Suppl. 9 Seiten 3.5.4-6), 'Footprint'-Experimenten (Ref. 2 Suppl. 7 Kapitel 12.4) oder Chromatin-Untersuchungen (Ref. 2 Suppl. 48 Kapitel 21.4.1).

**ACHTUNG:** Es wird nicht empfohlen, dieses Enzym für die Aufreinigung von RNA, ohne vorherige chemische Bearbeitung, einzusetzen.

### Herstellung der Stammlösung

DNase I wird eingesetzt, um DNA vor der Isolation von RNA und Proteinen zu verdauen. Löse hierzu DNase mit 2mg/mL in einer 0.15M Natriumchloridlösung oder Reaktionspuffer (bsp. 50mM Tris/HCl pH7,5, 10mM  $MgCl_2$  (single strand nicks) oder 10mM  $MnCl_2$  (double strand breaks), 50 $\mu$ g/mL BSA).

### Lagerung und Stabilität

Aus Stabilitätsgründen sollte die Konzentration einer DNase I enthaltenen Lösung mindestens 1mg/mL betragen. Nicht vortexen! Diese Lösung ist bei -20°C für mehr als 1 Jahr stabil (ref. 2 Suppl. 8 page 3.12.5). Lyophilisierte DNase I ist bei +2°C to +8°C für 3-5 Jahre stabil. In einer proteasefreien Lösung verliert DNase I bei pH5-7 und 62°C für 5 Stunden kaum an Aktivität.

**Hitzeinaktivierung von DNase I:** Für 10 Minuten auf 99°C erhitzen.

### Definition der Aktivität

Eine "Aktivitätseinheit" ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 $\mu$ g lambda DNA komplett in 10 Minuten bei 37°C in 50 $\mu$ L Puffer, der 40mM Tris/HCl (pH8,0), 10mM NaCl, 6mM  $MgCl_2$  und 10mM  $CaCl_2$  enthält, zu verdauen. Unter diesen Bedingungen entspricht 1 Einheit DNase I Aktivität 1 Kunitz unit.

**Alternative Definition:** Eine Einheit ist definiert als die Menge Enzym, die einen Anstieg um 0.001 in der Absorption (260nm) pro Minute bei 25°C und pH 5.0, basierend auf der Methode von Kunitz, verursacht.



### Herstellung von RNase-freier DNase I (entsprechend ref. 2, page 3.12.6 Supplement 8):

Da DNase I Spuren von RNasen enthalten kann, wird empfohlen vor der Benutzung von DNase I zur RNA-Reinigung die DNase I entsprechend dem folgenden Protokoll zu behandeln.

- Löse 1mg/mL DNase I in 0.1M Iodessigsäure plus 0.15M Natriumacetat bei einem pH-Wert von 5.3.
- Erhitze für 40 Minuten auf 55°C. Anschließend die Reaktion auf Eis kühlen.
- Gebe 1M CaCl<sub>2</sub> bis zu einer Konzentration von 5mM zu.
- Die Lösung kann, in kleinen Aliquots, bei -20°C gelagert werden.

### Benötigtes zusätzliches Material:

- 10X Reaktionspuffer: 400mM Tris/HCl (pH8,0), 100mM MgSO<sub>4</sub> und 10mM CaCl<sub>2</sub>.
- Lagerpuffer: 20mM Tris/HCl (pH7,5), 50% Glycerin (v/v), 1mM MgCl<sub>2</sub>. **ACHTUNG:** Konz. der DNase I: nicht unter 1mg/mL!
- Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup>
- Stopplösung: 20mM EGTA (pH8,0)

### Zusätzliche Aktivitäten

Um auf RNase Aktivität zu testen werden 50ng von [3H]RNA mit 5 units DNase I in transkriptionspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Freisetzung von radioaktiven Nukleotiden wird nach TCA-Fällung mittels Scintillationszähler gemessen. Es dürfen max. 3% Zunahme an Radioaktivität gemessen werden.

### Inhibitoren

EGTA; EDTA; DTT; Salzkonzentrationen >100mM

### Spezifikationen

Quelle:	Rinderpankreas
Molekulargewicht:	ca. 31 kDa
CAS-Nummer:	[9003-98-9]
Aktivität:	mind. 3000 U/mg (Kunitz)
Löslichkeit:	Leicht löslich bei 5mg/mL in 150mM NaCl. Ergibt eine klare, farblose Lösung.
RNase-Aktivität:	nicht garantiert frei an RNase-Aktivität
Lagerung:	-20°C.

### Literatur

- (1) Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Seiten A4.40-42. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- (2) Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) 2001. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- (3) McDonald, M.R. (1955) *Methods Enzymol.* **2**, 437-447 Deoxyribonukleasen
- (4) Campbell, V.W. & Jackson, D.A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3726-3735  
Der Effekt von zweiwertigen Kationen auf den Wirkungsmechanismus von DNase I.
- (5) Meinkoth, J. & Wahl, G.M. (1987) *Methods Enzymol.* **152**, 91-94 Nick-Translation.
- (6) Cobianchi, F. & Wilson, S.H. (1987) *Methods Enzymol.* **152**, 94-110  
Enzyme zum Modifizieren und Markieren von DNA und RNA.