

Genaxxon BioScience

DNase I (RNase free)

Deoxyribonuclease 1 (E.C. 3.1.21.1)

fon:
 +49 (0)7357 - 91 63 77
 fax:
 +49 (0)7357 - 91 63 78
 eMail:
info@genaxxon.com
 internet:
www.genaxxon.com

Product	Cat#	Package size
DNase I (RNase free), ca. 3000 KU/mg	M3032.0010	10 mg
DNase I (RNase free), ca. 3000 KU/mg	M3032.0050	50 mg
DNase I (RNase free), ca. 3000 KU/mg	M3032.0100	100 mg

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 polynucleotides 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 Mg²⁺ single-strand nicks are generated and in the presence of Mn²⁺ 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 Mg²⁺ and additional Ca²⁺. Calcium ions (5 mM) 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.

The enzyme is used in molecular biology techniques like digestion of DNA, in the RNA purification or generating "random nicks" for "nick translation" or "footprint"-assays or investigation on chromatin.

DNase I is suitable for eliminating DNA from RNA preparations prior to sensitive applications, such as RT-PCR. Since no RNA purification procedure removes 100% of the DNA, RNA samples should be digested with DNase I before RT-PCR. A simple 15 minute digestion at room temperature removes the contaminating DNA. DNase I is inactivated by adding the stop solution and heating. Heating also denatures the RNA, so the RNA can be used directly for reverse transcription.

RNase-free DNase I: Dissolve DNase I at 1 mg/ml in 0.1 M iodoacetic acid plus 0.15 M sodium acetate at a final pH of 5.3. The solution is then heated 40 minutes at 55°C and cooled. Finally, 1 M CaCl₂ is added to the solution to 5 mM. Store frozen in small aliquots.

Material needed but not supplied:

- 10X Reaction Buffer: 400 mM Tris/HCl (pH 8.0), 100 mM MgSO₄ and 10 mM CaCl₂.
- Storage Buffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 50% glycerol (v/v), 1 mM MgCl₂. **conc. of DNase I: not below 1 mg/ml!**
- Ca²⁺ and Mg²⁺ or Mn²⁺
- Stop solution: 20 mM EGTA (pH 8.0)

Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme required to completely degrade 1 µg of lambda DNA in 10 minutes at 37°C in 50 µl of a buffer containing 40 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂. Under these conditions one unit of DNase I activity is comparable to 1 Kunitz unit.

Inhibitors

EGTA; EDTA; DTT; salt concentration > 100 mM

Stability

In lyophilised form DNase 1 is stable for more than 3 years at -20°C.
 In solution (conc. > 1 mg/ml), DNase I is stable for more than 1 year at -20°C.

Associated activities

To test RNase activity, 50 ng of [3H]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%.

Genaxxon BioScience

DNase I (RNase free)

Deoxyribonuclease 1 (E.C. 3.1.21.1)

fon:
 +49 (0)7357 - 91 63 77
 fax:
 +49 (0)7357 - 91 63 78
 eMail:
info@genaxxon.com
 internet:
www.genaxxon.com

Product	Cat#	Package size
DNase I (RNase free), ca. 3000 KU/mg	M3032.0010	10 mg
DNase I (RNase free), ca. 3000 KU/mg	M3032.0050	50 mg
DNase I (RNase free), ca. 3000 KU/mg	M3032.0100	100 mg

Produktbeschreibung

Deoxyribonuklease I (DNase I) aus Rinderpankreas ist eine Endonuklease (Glykoprotein), die die Phosphodiesterbindung in der DNA bevorzugt hinter Pyrimidinnukleotiden spaltet. Daraus ergibt sich ein Polynukleotid 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 β -Mercaptoethanol DNase I.

Das Enzym findet in molekularbiologischen Techniken Anwendung zum Verdau von DNA, wie 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).

Deoxyribonuklease I ist leicht löslich in 0,15 M Natriumchlorid oder in Reaktionspuffer (z. B. 50 mM Tris · Cl, pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$ (Einzelstrang-'Nicks') bzw. 10 mM $MnCl_2$ (Doppelstrang-Brüche); 50 μ g/ml BSA; Ref. 2 Suppl. 8 Seite 3.12.5). Zur Lagerung kann DNase I in 50 % Glycerin (w/v); 20 mM Tris · Cl, pH 7,5; 1 mM $MgCl_2$ gelöst werden. Die Konzentration sollte aus Stabilitätsgründen mindestens 1 mg/ml betragen. In dieser Lösung ist DNase I mindestens ein Jahr stabil (Ref. 2 Suppl. 8 Seite 3.12.5). In lyophilisierter Form ist sie 2 - 5 Jahre bei +4°C stabil. Wenn Protease-frei, verliert DNase I in Lösung bei pH 5 - 7 bei 62°C für 5 Stunden kaum an Aktivität. Das Enzym kann durch Hitze (10 Minuten) bei 99°C inaktiviert werden.

RNase-freie DNase I: 1 mg/ml DNase I in 0,1 M Iodessigsäure plus 0,15 M Natriumacetat bei einem finalen pH-Wert von 5,3. Die Lösung wird dann für 40 Minuten auf 55°C erhitzt und anschließend gekühlt. Zuletzt wird 1 M $CaCl_2$ mit einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. In kleinen Aliquots bei -20°C lagern (gemäß Ref. 2 Seite 3.12.6 Supplement 8).

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.

Spezifikationen

Ursprung:	Rinderpankreas
Molekulargewicht:	ca. 31 kDa
CAS-Number:	[9003-98-9]
Aktivität:	mind. 3000 U/mg (Kunitz)
Löslichkeit:	Leicht löslich bei 5 mg/ml in 150 mM NaCl. Ergibt eine klare, farblose Lösung.
Lagerung:	- 20°C.
Unitdefinition:	Eine Einheit ist definiert als die Menge Enzym, die einen Anstieg um 0.001 in der Absorption (260 nm) pro Minute bei 25°C und pH 5.0, basierend auf der Methode von Kunitz, verursacht.