

ATP Dependent DNase

使用说明书

TaKaRa Code: D201

包 装:

ATP Dependent DNase (8~12 U/ μ l)	200 Units
10 \times ATP Dependent DNase Buffer	0.5 ml

保 存: -20 $^{\circ}$ C

●制品说明

本制品在含有 ATP 的 Buffer (制品中添附) 反应体系中, 能够特异地水解线性双链 DNA 产生脱氧核糖核酸, 对环状双链 DNA 不起作用。本制品可用于除去质粒或粘粒等环状 DNA 样品中残留的少量线性基因组 DNA 片段的污染, 减少对后续实验的影响。

在基因工程实验中, 制备的质粒和粘粒, 即使是通过氯化铯/溴乙锭梯度离心方法或其它严格的方法制备, 也常含有碱裂解操作过程中带来的少量细菌基因组 DNA 片段的污染, 尤其在制备低拷贝克隆载体的质粒或粘粒等时, 这种现象更为明显。使用本制品可以有效除去样品中的基因组 DNA, 然后通过 70 $^{\circ}$ C、5 min 的加热处理即可使本酶完全失活, 从而减少基因组污染物对质粒或粘粒等的常规分析、亚克隆和序列测定等后续实验结果的影响。

●酶贮存溶液

Tris-HCl (pH7.5)	20 mM
DTT	1 mM
EDTA	0.1 mM
Glycerol	50 %

●起 源: *Micrococcus luteus*。

●活性定义

以线性化的 pMD18 DNA 为底物, 在 1 mM ATP 存在、pH9.4 缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 催化生成 1 nmol 脱氧核苷酸所需要的酶量, 定义为 1 活性单位 (U)。

在 10 μ l 反应体系中, 加入本制品 0.2 U, 10 \times ATP Dependent DNase Buffer 1 μ l, 0.2 μ g 的线性化的 pMD18 DNA, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 30 分钟, 能够使线性化的 pMD18 DNA 产生 95% 以上的降解作用。

●纯 度

在 10 μ l 反应体系中, 加入本制品 1 U, 10 \times ATP Dependent DNase Buffer 1 μ l, 1 μ g 的 λ DNA 和 0.2 μ g 的 pMD18 DNA 质粒, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 16 小时, 能使 90% 以上的 λ DNA 电泳带降解消失, 同时 pMD18 DNA 的电泳谱带不发生变化。

●用 途

- (1) 低拷贝的质粒或粘粒的提取；
- (2) 除去质粒等环状 DNA 中线性基因组 DNA 污染物。

●使用注意

本制品来源于天然菌体，过量使用会造成目的环状 DNA 回收量降低。

●添附 Buffer 组成（保存：-20℃）

10×ATP Dependent DNase Buffer

Glycine - NaOH (pH9.4)	500	mM
DTT	10	mM
MgCl ₂	300	mM
ATP	20	mM

●使用例

通过使用 ATP Dependent DNase 除去 pUC18 质粒中含有的大肠杆菌基因组 DNA 片段污染物（占 60%），可以提高阳性克隆的比率。

1. 在微量离心管中制备下列反应液。

10×ATP Dependent DNase Buffer	1	μl
pUC18 质粒 DNA 混合物	1	μg
ATP Dependent DNase *	2	U
dH ₂ O	Up to	10 μl

*: 同时以不加 ATP Dependent DNase 作为对照实验。

2. 37℃反应 2 小时*。

*: 长时间反应效率有下降的倾向，建议反应 1~2 小时。

3. 70℃加热 5 分钟，使 ATP Dependent DNase 失活。

4. 在微量离心管中制备下列酶切反应液。

10×H Buffer	1	μl
3. 的反应液	5	μl
<i>EcoR</i> I	30	U
dH ₂ O	Up to	10 μl

5. 37℃反应 1 小时之后，进行 60℃ 15 min 反应，使 *EcoR* I 失活。

6. 在微量离心管中制备下列连接反应液。

10×T4 DNA Ligase Buffer	1	μl
5. 的反应液	2	μl
T4 DNA Ligase	350	U
dH ₂ O	Up to	10 μl

7. 16℃反应 1 小时。

8. 取上述连接液 2~10 μl，转化到 JM109 感受态细胞中，涂平板培养，进行蓝白菌落筛选并记数。实验结果表明，使用 ATP Dependent DNase 处理的 pUC18 质粒 DNA 混合物（含 60% 大肠杆菌基因组 DNA 片段）的自连结果中，白色菌落减少 80% 以上，有效抑制了大肠杆菌基因组 DNA 片段的污染。