

Recombinant DNase I (RNase-free)

Code No. 2270A **Size:** **1,000 U**
Conc.: **5 U/ μ l**

Supplied Reagents:
10X DNase I Buffer **1 ml**

Description:

Recombinant DNase I (RNase-free) is an endodeoxyribonuclease that catalyzes to the same extent the degradation of both single- and double-stranded DNA randomly, and produces 5'-P terminal oligonucleotides. As protease activity and ribonuclease activity have been eliminated, this enzyme is stable around its optimum neutral pH range. So, this enzyme is suitable for RNA preparation at neutral pH.

Storage Buffer:

20 mM	Tris-HCl, pH 7.5 (at 4 °C)
50 mM	NaCl
0.1 mM	CaCl ₂
50 %	Glycerol

Storage: -20°C

Source: Recombinant enzyme derived from non-animal host.

Unit definition:

One unit is the amount of the enzyme that increases the absorbance at 260 nm by 0.001 per minute at 25°C, pH 5.0, with calf thymus DNA as the substrate (Kunitz unit).¹⁾

Reaction mixture for unit definition:

100 mM	Sodium acetate, pH 5.0 (at 25 °C)
5 mM	MgSO ₄
40 μ g/ml	calf thymus DNA

Quality Control Data:

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Applications:

1. For digestion of template DNA without buffer exchange, after *in vitro* transcription with T7 or SP6 RNA Polymerase.⁵⁾
2. For nick translation together with DNA Polymerase I (Cat.#2130).²⁾
3. Making a DNA library for shotgun sequencing in the presence of Mn²⁺.³⁾
4. For foot-printing analysis of the interaction between DNA and protein.⁴⁾
5. For digestion of genomic DNA before RT-PCR.

Note:

As protease activity has been eliminated, this enzyme is stable around its optimum neutral pH range. The enzyme requires a divalent metal ion for its activity. It randomly produces nicks in double-stranded DNA in the presence of Mg²⁺, but in the presence of Mn²⁺, both strands of double stranded DNA are cleaved into fragments. The enzyme loses its activity reversibly with EDTA, and irreversibly by heat treatment at 75°C for 10 min.

Composition of Supplied Reagents (Store at -20 °C):

10X DNase I Buffer	
400 mM	Tris-HCl, pH 7.5
80 mM	MgCl ₂
50 mM	DTT

Application example:

Digestion of genomic DNA in a sample for RT-PCR

1. Prepare the following reaction mixture.

total RNA	20 - 50 μ g
10X DNase I Buffer	5 μ l
Recombinant DNase I (RNase-free)	2 μ l (10 U)
Ribonuclease Inhibitor	20 U
DEPC-treated water	up to 50 μ l
2. Incubate for 20 - 30 min at 37°C.
3. Perform one of the following procedures to inactivate DNase I.
 - A. Heat treatment
 - (1) Add 2.5 μ l of 0.5 M EDTA, and incubate at 80°C for 2 min.
 - (2) Increase reaction volume to 100 μ l with DEPC treated water.
 - B. Phenol/Chloroform extraction
 - (1) Mix 50 μ l of DEPC treated water and 100 μ l of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) together.
 - (2) Centrifuge at 12,000 rpm for 5 min at room temperature, then transfer the upper layer to a new tube.
 - (3) Add equal amount of chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1) and mix.
 - (4) Centrifuge at 12,000 rpm for 5 min at room temperature, then transfer upper layer to new tube.
4. Add 10 μ l of 3 M sodium acetate and 250 μ l of chilled ethanol, and then mix. Keep it for 20 min at -80°C.
5. Centrifuge at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C. Remove the supernatant.
6. Wash the precipitate with chilled 70 % ethanol. Centrifuge at 12,000 rpm for 5 min at 4 °C and remove the supernatant.
7. Dry the precipitate.
8. Dissolve the precipitate in a suitable amount of DEPC-treated water. Confirm the genomic DNA is removed completely by electrophoresis and measure the RNA concentration. When the genomic DNA is not removed completely, increase the amount of enzyme or extend reaction time.

References:

- 1) Kunitz M. *J Gen Physiol.* (1950) **33**: 349-377.
- 2) Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C, and Berg P. *J Mol Biol.* (1977) **113**: 237-251.
- 3) Anderson S. *Nucleic Acids Res.* (1981) **9**: 3015-3027.
- 4) Galas D J and Schmitz A. *Nucleic Acids Res.* (1978) **5**: 3157-3170.
- 5) Green M R, Maniatis T, and Melton D A. *Cell.* (1983) **32**: 681-694.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6973 or from our website at www.takara-bio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

Recombinant DNase I (RNase-free)

Code No. 2270A 容量： 1,000 U
濃度： 5 U/ μ l

添付試薬：
10 \times DNase I Buffer 1 ml

●製品説明

Recombinant DNase I (RNase-free) は、一本鎖および二本鎖の DNA を同程度にランダムに分解し、5'-P 末端を持つオリゴヌクレオチドを生成させる endodeoxyribonuclease である。Mg²⁺ 存在下では二本鎖 DNA にランダムにニックを入れるが、Mn²⁺ 存在下では二本鎖の同時切断が起こり、DNA を断片化する。本酵素は、実用上問題とならないレベルまで Protease および RNase を除いているため、中性域での安定性が向上しており、RNA の調製の際に安全に用いることができる。

●形状 20 mM Tris-HCl (pH7.5 at 4°C)
50 mM NaCl
0.1 mM CaCl₂
50 % Glycerol

●保存 - 20°C

●起源 Recombinant enzyme derived from non-animal host.

●活性の定義

仔牛胸腺 DNA を基質として、25°C、pH5.0 において反応液の 260 nm の吸光度を 1 分間に 0.001 増加させる酵素活性を 1 U とする (Kunitz unit¹⁾)。●

●活性測定用反応液組成

100 mM 酢酸ナトリウム (pH5.0 at 25°C)
5 mM MgSO₄
40 μ g/ml 基質 DNA

●品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトのドキュメントセンターからダウンロードできます。

●用途

1. T7 あるいは SP6 RNA Polymerase を用いて *in vitro* transcription による RNA 合成を行った後、buffer 置換せずに鋳型 DNA を消化⁵⁾ する際に用いられる。
2. DNA Polymerase I (製品コード 2130) と共に nick translation²⁾ に用いられる。
3. Mn²⁺ 存在下で shot-gun sequencing のための DNA ライブラリー作製³⁾ に用いられる。
4. DNA-タンパク質の相互作用を調べるフットプリント法⁴⁾ に用いられる。
5. RT-PCR 前のゲノム DNA の除去に用いられる。

●使用上の注意

- 本酵素の至適 pH は中性付近にあり、実用上充分なまで Protease を除いているために中性付近でも安定である。
- 本酵素は、活性の発現に二価金属イオンを要求する。
- Mg²⁺ 存在下では二本鎖 DNA にランダムにニックを入れるが、Mn²⁺ 存在下では二本鎖の同時切断が起こり、DNA を断片化する。EDTA により可逆的に失活し、75°C、10 分の熱処理で不可逆的に失活する。

●添付試薬液組成 (保存: - 20°C)

10 \times DNase I Buffer
400 mM Tris-HCl (pH7.5)
80 mM MgCl₂
50 mM DTT

●使用例

RT-PCR 前の混入ゲノム DNA 除去のための DNase I 処理方法

■操作手順

1. 以下の反応液を調製する。

total RNA	20 ~ 50 μ g
10 \times DNase I Buffer	5 μ l
Recombinant DNase I (RNase-free)	2 μ l (10 U)
RNase Inhibitor	20 U
DEPC 処理水	50 μ l に fill up
2. 37°C で 20 ~ 30 分間反応する。
3. 以下のいずれかの方法で DNase I を失活させる。
【熱処理】
 - (1) 2.5 μ l の 0.5 M EDTA を加えて、80°C で 2 分間インキュベートする。
 - (2) DEPC 処理水で 100 μ l に fill up する。
【フェノール/クロロホルム抽出】
 - (1) 50 μ l の DEPC 処理水と 100 μ l のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加えて混合する。
 - (2) 室温、12,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。
 - (3) 等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を加えて混合する。
 - (4) 室温、12,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。
4. 10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 250 μ l の冷エタノールを加えて - 80°C で 20 分間静置する。
5. 4°C、12,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てる。
6. 70%エタノールで沈殿を洗浄し、4°C、12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てる。
7. 沈殿を乾燥する。
8. 適量の DEPC 処理水に溶解後、電気泳動によりゲノム DNA が除去できたことを確認し、濃度を測定する。(ゲノム DNA が完全に除去できていない場合は、DNase I の量を増やすか、反応時間を延ばして再度行う。)

●参考文献

- 1) Kunitz M. *J Gen Physiol.* (1950) **33**: 349-377.
- 2) Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C, and Berg P. *J Mol Biol.* (1977) **113**: 237-251.
- 3) Anderson S. *Nucleic Acids Res.* (1981) **9**: 3015-3027.
- 4) Galas D J and Schmitz A. *Nucleic Acids Res.* (1978) **5**: 3157-3170.
- 5) Green M R, Maniatis T, and Melton D A. *Cell.* (1983) **32**: 681-694.

●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。