

製品コード 2670A

研究用

Takara

Cryonase™ Cold-active Nuclease

説明書

v201702Da

Cryonase Cold-active Nuclease は低温菌 *Shewanella* sp. 由来のエンドヌクラーゼを組換え大腸菌で発現・精製したものであり、あらゆる DNA および RNA 基質（一本鎖、二本鎖、直鎖状、環状）を低温で切断可能です。氷上でも活性を示すため、タンパク質など熱に不安定な物質を含むサンプル中の核酸を分解する際に有用です。

本製品は、京都大学化学研究所 江崎信芳教授らの研究グループとの共同研究のもとで、当社が同教授グループより *Shewanella* sp. Ac10 菌体の提供を受け、そのゲノム解析を行った成果に由来しています。

I. 内容

Cryonase Cold-active Nuclease 10,000 U (20 U/ μ l \times 500 μ l)

II. 形状

10 mM Tris-HCl, pH7.5
20 mM NaCl
2 mM MgCl₂
50% glycerol

III. 起源 組換え大腸菌で発現

IV. 保存 - 20°C

V. 活性の定義

サケ精巢由来 DNA を基質として、37°C、pH7.5 において反応液 (3 ml) 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。

VI. 活性測定用反応液組成

83 mM Tris-HCl, pH7.5
4.2 mM MgCl₂
33 μ g/ml 基質 DNA

VII. 純度

プロテアーゼの混入が検出限界以下である。

VIII. 用途

- ・ゲノム DNA の分解
- ・菌体からのタンパク質抽出時の粘性の低減
- ・2次元電気泳動サンプルの前処理
- ・ウイルス精製時の前処理

IX. 実験例

大腸菌からタンパク質を抽出する際の粘性の低減

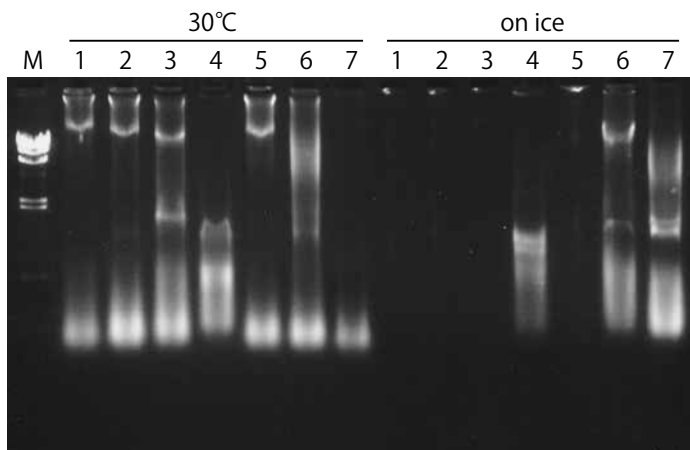
タンパク質抽出用試薬キット TALON® xTractor™ Buffer Kit (製品コード 635623 : 現在は製品名が xTractor Buffer Kit に変更になり、製品仕様も若干異なります) を用いて抽出を行う際に、DNase I を添加する代わりに Cryonase Cold-active Nuclease を添加し、粘性の低減を検討した例を以下に示します。

【方法】

TALON xTractor Buffer Kit のプロトコールに準じて抽出を行った。
タンパク質 A を発現させた大腸菌 BL21 湿菌体 6.4 mg に 128 μ l の TALON xTractor Buffer、1.28 μ l の Lysozyme (50 \times)、さらにそれぞれ 3 通りの量 (0.256 U、2.56 U、25.6 U) の DNase I または Cryonase Cold-active Nuclease を添加し、30 $^{\circ}$ C または氷上で 30 分間反応させた。

【結果】

- (1) アガロースゲル電気泳動による大腸菌ゲノムの解析
それぞれ抽出処理液の 10 μ l 分を電気泳動に供しました。

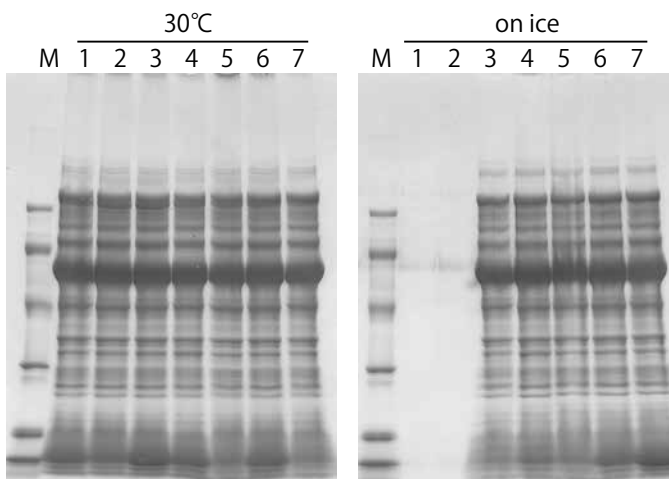


- M : λ -Hind III digest
1 : nuclease 無添加
2 : + DNase I、0.256 U
3 : + DNase I、2.56 U
4 : + DNase I、25.6 U
5 : + Cryonase Cold-active Nuclease、0.256 U
6 : + Cryonase Cold-active Nuclease、2.56 U
7 : + Cryonase Cold-active Nuclease、25.6 U
(xTractor Buffer Kit のプロトコールでは、0.256 U を使用)

上記の電気泳動画像でバンドが認められないレーンは、粘性のためピペティングができず、適切にアプライできなかつたものです。
氷上で処理した場合、DNase I は 2.56 U の使用でもピペティングが困難なほどの粘性が残りましたが、Cryonase Cold-active Nuclease では 2.56 U でゲノム DNA の分解による粘性の低減が確認されました。

(2) SDS-PAGE による抽出タンパク質の解析

アガロースゲル電気泳動に使用した残りの抽出処理液にサンプルバッファを加えて煮沸後、抽出処理液 4 μ l 相当分をそれぞれ SDS-PAGE に供しました。



M : Marker (97、66、45、31、21、14 kDa)

1 : nuclease 無添加

2 : + DNase I、0.256 U

3 : + DNase I、2.56 U

4 : + DNase I、25.6 U

5 : + Cryonase Cold-active Nuclease、0.256 U

6 : + Cryonase Cold-active Nuclease、2.56 U

7 : + Cryonase Cold-active Nuclease、25.6 U

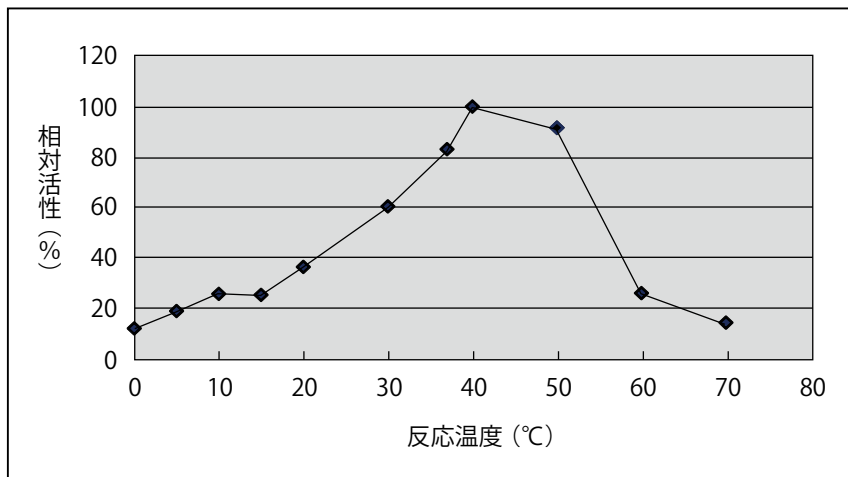
(xTractor Buffer Kit のプロトコールでは、0.256 U を使用)

氷上での処理の場合、Cryonase Cold-active Nuclease は DNase I より 1 オーダー低い添加量で粘性低減の効果を示しています。

氷上処理によりタンパク質に影響を与えることなく粘性を下げることでできる本酵素は、タンパク質抽出に有用な酵素であると考えられます。

X. Cryonase Cold-active Nuclease の参考データ

■各温度における相対活性



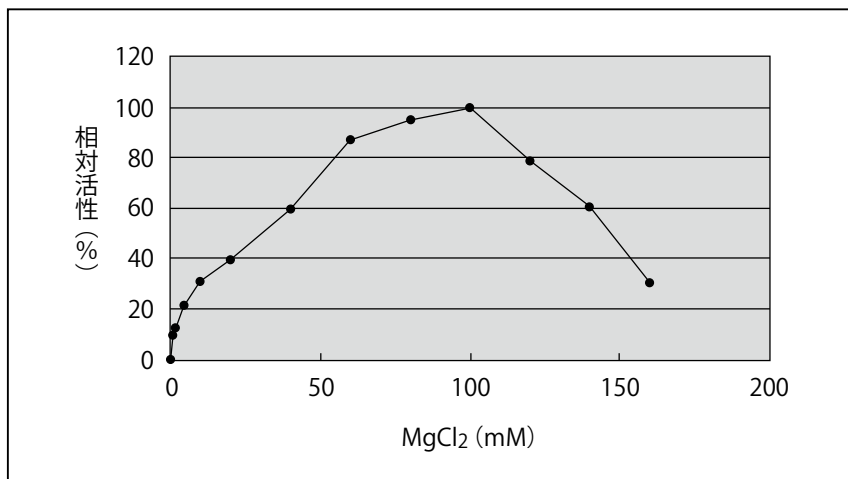
■ pH の影響

至適 pH 域 : 7.0 ~ 9.0

有効 pH 域 : 6.0 ~ 10.0

■ Mg²⁺ 各濃度での相対活性 (pH7.5、37°C)

至適濃度域 : 60 ~ 120 mM



XI. 関連製品

xTractor™ Buffer Kit (製品コード 635623)
Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B)
pCold™ Vector Set (製品コード 3360)
pCold™ I DNA (製品コード 3361)
pCold™ II DNA (製品コード 3362)
pCold™ III DNA (製品コード 3363)
pCold™ IV DNA (製品コード 3364)
pCold™ TF DNA (製品コード 3365)
pCold™ ProS2 DNA (製品コード 3371)
pCold™ GST DNA (製品コード 3372)
SPP System™ I (製品コード 3367)
SPP System™ II (製品コード 3368)
SPP System™ III (製品コード 3369)
SPP System™ IV (製品コード 3370)
SPP System™ Set (製品コード 3366)

[*E. coli* コンピテントセル]

TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)
Chaperone Competent Cells BL21 シリーズ (製品コード 9120 ~ 9125)

[His タグ融合タンパク精製関連試薬]

Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit (製品コード 635710)
Capturem™ His-Tagged Purification Maxiprep Kit (製品コード 635713)
TALON® Metal Affinity Resin (製品コード 635501 ~ 635504)
HisTALON™ Superflow Cartridge Purification Kit (製品コード 635649)
HisTALON™ Buffer Set (製品コード 635651)
His60 Ni Superflow Resin (製品コード 635659 ~ 635664)
His60 Ni Gravity Columns (製品コード 635657)
His60 Ni Buffer Set (製品コード 635665)

XII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断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。
- ・TALON は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。Cryonase、pCold、SPP System はタカラバイオ株式会社の、xTractor、Capturem、HisTALON は Takara Bio USA, Inc. の商標です。その他、本説明書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。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社