

1. ОПИСАНИЕ

DpnI – эндонуклеаза рестрикции из *Diplococcus pneumoniae G41*, экспрессированная в клетках *Escherichia coli*. Изошизомер: **Mall**

2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Удаление матрицы после ПЦР

1. Добавьте 1 мкл DpnI напрямую в ПЦР-смесь (20–50 мкл) по завершении реакции.
2. Инкубируйте при 37°C в течение 15 минут.

Стандартная рестрикция

1. Смешайте: ДНК 1000 нг, 5 мкл 10X CutFast Buffer, воды до 49 мкл.
2. Добавьте 1 мкл рестриктазы.
3. Инкубируйте при 37°C 30–60 минут.

3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- На эффективность рестрикции сильно влияет чистота выделенной плазмиды. Наличие этанола, изопропанола, фенола или хлороформа, сорбента для выделения ДНК сильно снижают активность рестриктазы.
- Во избежание появления неспецифической активности не рекомендуется добавлять фермент больше чем 10% от объема реакционной смеси
- Для препаративной рестрикции при количестве ДНК более 1 мкг необходимо подобрать общий объем реакции так, чтобы итоговая концентрация ДНК была 100-150 нг/мкл. На 100 мкл реакционной смеси следует добавлять не менее 2 мкл DpnI.
- Избегайте многократных циклов замораживания-размораживания для реакционного буфера (рекомендуется аликвотирование).

4. ЧАСТЫЕ ВОПРОСЫ (FAQ)

В: Могу ли я использовать DpnI, если моя плазида выделена из штамма JM110?

О: Нет. Штаммы типа JM110 или SCS110 являются dam-. ДНК в них не метилируется, и DpnI не найдет свой сайт. Используйте стандартные лабораторные штаммы (DH5α, XL1-Blue, Top10).

В: Влияет ли CpG метилирование на работу фермента?

О: Да, CpG-метилирование может блокировать расщепление, если оно перекрывается с сайтом узнавания. Если вы работаете с геномной ДНК млекопитающих, учитывайте этот факт.

5. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

50 РЕАКЦИЙ

- 1 пробирка: 50 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 0.5 мл 10x реакционного буфера
- 1 пробирка : 1.5 мл 6x буфер для нанесения ДНК Нуар

150 РЕАКЦИЙ

- 3 пробирки по 50 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 1.5 мл 10x реакционного буфера
- 1 пробирка : 1.5 мл 6x буфер для нанесения ДНК Нуар

250 РЕАКЦИЙ

- 5 пробирок по 50 мкл фермента в буфере для хранения
- 1 пробирка : 1.5 мл 10x реакционного буфера

6. ХАРАКТЕРИСТИКИ

АКТИВНОСТЬ

2 ед./мкл

ИНАКТИВАЦИЯ

Полная инактивация при 80 °С, 20 мин

7. СОСТАВ РАСТВОРОВ

Буфер для хранения: 25 мМ HEPES, 250 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мМ EDTA, 50% Глицерин, pH 7.4

Буфер CutFast (10×): 500 мМ KOAc, 200 мМ Tris-OAc, 100 мМ Mg(OAc)₂, 1 мг/мл БСА, pH 7.9

8. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За одну единицу активности принято такое количество фермента, которое полностью гидролизует 1 мкг контрольной плазмиды при 37°С за 1 час в объеме реакции 50 мкл.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Фермент и реакционный буфер необходимо хранить при температуре -20°С