

Duplex-specific nuclease

双链特异性核酸酶 (duplex-specific nuclease, DSN) 从红王 (堪察加) 蟹的肝胰脏中分离。高度选择性降解双链 DNA 和 DNA-RNA 杂交体中的 DNA, 对单链核酸分子和双链 RNA 几乎没有活性, 且能很好区分单碱基错配。

广泛用于全长 cDNA 富集后均一化操作、基于二代测序 (NGS) 的转录组文库构建等, DSN 还用于基因组 DNA 均一化、cDNA 缺失和核糖体 cDNA 缺失、cDNA 差减、SNP 检测、repeat-free FISH 探针, miRNA 的多重荧光检测, 端粒末端定量检测等。

| 产品 | 货号 | 规格 |
|--|-------|-----------|
| Duplex-specific nuclease (lyophilized) | EA001 | 50 Units |
| | EA002 | 100 Units |
| | EA003 | 10 Units |

参考 Modified Kunitz Assay (Kunitz, 1950) 测定 DNA 酶活力, 1 个酶活单位 (1U) 定义为: 在 50 ug/ml 小牛胸腺 DNA 中, 每分钟增加 0.001 吸光度单位的 DSN 为一个酶活单位。实验条件为 25°C, 50 mM Tris-HCl, pH 7.15, 5 mM MgCl₂。

试剂盒组分列表:

| 组分 | 组成 | 数量 |
|--------------------|---|-----------------|
| DSN 酶 | 冻干粉 | 10/50/100 units |
| DSN 储存缓冲液 | 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 | 120µL |
| 10X DSN master 缓冲液 | 500 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM MgCl ₂ ; 10 mM DTT | 200µL |
| 2X DSN 终止液 | 10 mM EDTA | 1000µL |
| 对照模板 | plasmid DNA, 100ng/ l | 20µL |

试剂要求但不包括: 甘油, 100%; 无菌水; 琼脂糖凝胶电泳试剂。

运输及保存条件: 试剂盒的所有部件可以在环境温度下运输, 收货后必须放置 -20°C 存储。

购买须知:

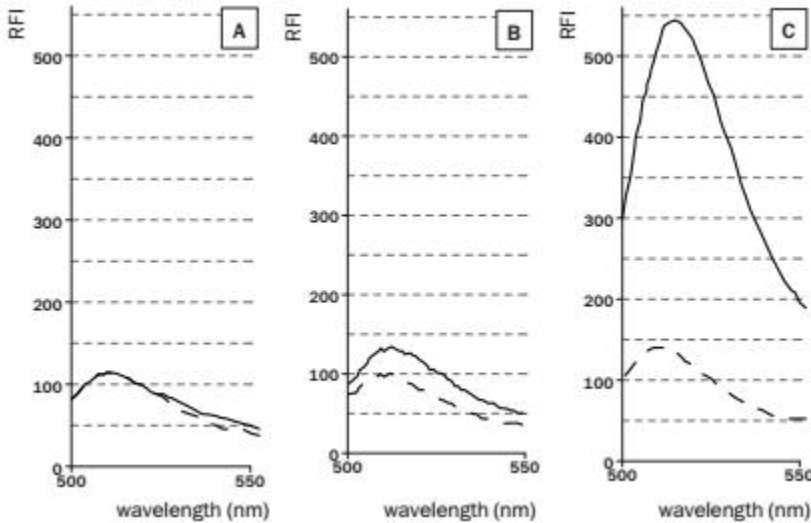
本产品仅用于研究用途。

DSN 相关产品由美国专利号 7435794 和 7803922 覆盖。您使用本类产品时, 视为您接受有限使用标签许可证号 #002 的条款和适用内容。

DSN 底物特异性

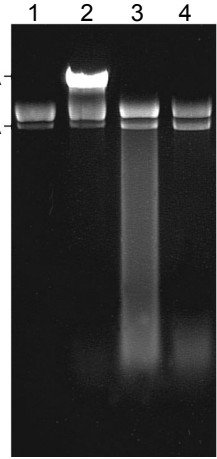
DSN 对双链 DNA 有高效的切割能力，当 DSN 和 ssDNA 浓度较高时，DSN 会对 ssDNA 产生轻微切割活性，当有 dsDNA 和 RNA 存在竞争时这种切割活性极弱，低于检测限。DSN 不切割 RNA，但可以有效切割 DNA-RNA 杂交复合物中的 DNA 链。

利用合成的寡核苷酸底物进行酶活分析表明，DSN 可以精确区分 10-12bp 的 DNA-DNA 双链的单核苷酸错配。dsDNA 大于 10bp、DNA-RNA 大于 15 bp 时 DSN 才能产生切割活性。



DSN 对 M13 噬菌体 ssDNA 和 λ 噬菌体 dsDNA 的作用
泳道 1，M13 DNA；
泳道 2，M13 DNA + λ 噬菌体 DNA；
泳道 3，DSN 切割 M13 DNA，70°C、1.5min；
泳道 4，DSN 切割 M13 DNA 和 λ 噬菌体 DNA，70°C、5min；

DSN 对单碱基错配 (A、B) 和无错配 (C) DNA 双链上的作用 5-FI-5'-gccctatagt-3'-TAMRA 信号探针和配对 DNA 链(A-5' -actcactataCggcgaat-3'；B-5'-actcactataggTcgaat-3'；C-5'-actcactatagggcgaat-3') 与 DSN 在 35°C 条件下孵育 15min，在 480nm 处观察激发光谱。虚线代表未添加 DSN 的底物荧光，实线代表 DSN 共孵育时的底物荧光。



生化特性

DSN 需要二价阳离子 (Mn^{2+} , Co^{2+} , or Mg^{2+}) 维持酶活， Mg^{2+} 浓度不低于 5 mM，EDTA 可以抑制酶活。

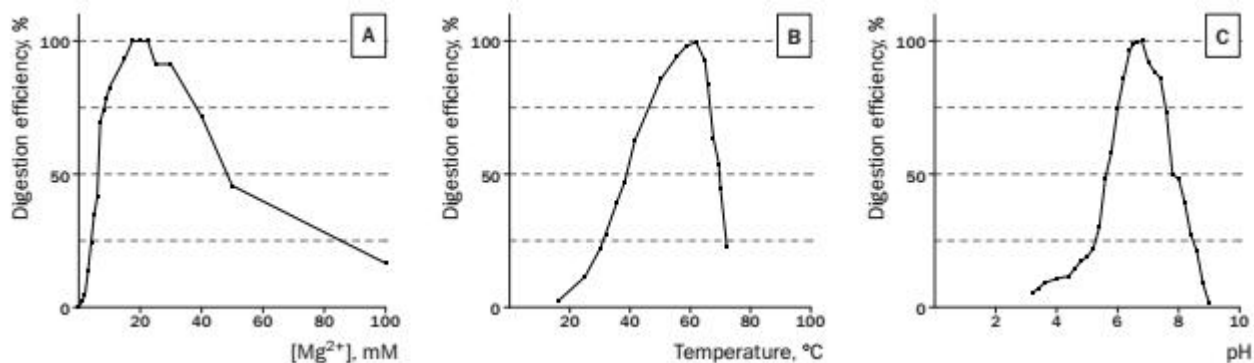
DSN 的最适温度是 60°C，然而在 80°C 时其酶活下降至 10%，dsDNA 底物变性可能是酶活急剧下降的原因之一。

DSN 的最适 pH 是 pH6.6，pH3-pH5 时 DSN 酶活为最大酶活的 10%，这种核酸酶在 pH4-pH13、低于 65°C 的环境条件下很稳定，在 70°C 条件下 30min 仍保持 60% 酶活，在 80°C 条件下 30min 仍保持 40% 酶活。

DSN 与腐蚀性化学品 (1%SDS、10mM β -ME、0.3%过氧化氢等) 在 37°C 条件下酶活略微下降，30min 后仍有 90% 活力。然而在 60°C 条件下，SDS 几乎完全抑制了 DSN 活性， β -ME 和过氧化氢分别使酶活降低 70% 和 80%。

DSN 对离子高度敏感 (0.2M NaCl 条件下其催化活性降低 10 倍)。反应体系中的离液剂和多胺也会抑制酶活。

DSN 对蛋白酶 K 耐受 (37°C 条件孵育 30min，仍显示较高活力)。



A. 镁离子浓度对 DSN 活性的影响。利用 Modified Kunitz Assay 检测不同 Mg^{2+} 浓度下 DNase 对 dsDNA 的切割效率。

B. DSN 活性对温度的依从性。利用 Modified Kunitz Assay 检测不同温度下 DNase 对 dsDNA 的切割效率。

C. pH 对 DSN 活性的影响。利用 Modified Kunitz Assay 检测不同 pH 条件下 DNase 对 dsDNA 的切割效率。

DSN 稀释流程:

冻干 DSN 酶稀释方法:

1. 将 DSN 储存缓冲液加入冻干 DSN 酶，on the basis of 5 l of the buffer for 每 10 单位加 5 μ L。
2. 轻弹管壁混匀，瞬离，避免产生泡沫。
3. 向管中加入等体积 100% 甘油，轻弹管壁混匀，瞬离，避免产生泡沫。
4. 将 DSN 放置 $-20^{\circ}C$ 条件保存。

DSN 活力检测:

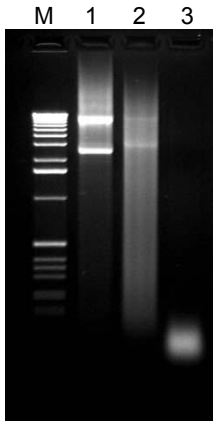
重要提示: 我们强烈建议在使用前完成检测试验。

1. 按以下顺序配制反应体系

| | |
|------------|-------------------|
| 12 μ L | 无菌水 (不包含) |
| 4 μ L | DSN 对照模板 |
| 2 μ L | 10XDSN master 缓冲液 |
| <hr/> | |
| 18 μ L | 总体积 |

2. 混匀并瞬离。
3. 分装 9 μ L 反应体系至两个无菌 PCR 管，分别标记为 C (对照)、E (试验)。
4. 加入 1 μ L DSN 储存缓冲液至 C 管，混匀并瞬离。
5. 加入 1 μ L DSN 溶液至 E 管，混匀并瞬离。
6. 每个试管中添加 1 滴石蜡油覆盖，瞬离。
7. 将试管放入热循环仪中 $65^{\circ}C$ 反应 10 min。

- 将 DSN 酶失活，每管加入 5 μ L 2X DSN 终止液，混匀并瞬离，放置室温。
- 每管取 5 μ L 终止后的反应液，选用 1-kb DNA marker，在 1.5% agarose/EtBr 凝胶、1X TAE buffer 中电泳。



DSN 活力检测.

C、E 两管各包含 200 ng 质粒 DNA，在 65°C 条件下孵育 7 min。用 EDTA 终止反应。泳道 1 - 对照 DNA (不包含 DSN)。泳道 2 - DNA 与失活的 DSN 共孵育。Lane 3 - 被 DSN 成功消化的 DNA。泳道 M - 1 kb DNA marker。

DSN 处理: 反应条件

- 按以下顺序配制反应体系

| | |
|------------|--------------------|
| Y μ L | 500 ng DNA (无菌水溶解) |
| X μ L | 无菌水 |
| 1 μ L | 10X DSN master 缓冲液 |
| 1 μ L | DSN 溶液 |
| <hr/> | |
| 10 μ L | 总体积 |

- 混匀并瞬离。
- 如果需要，每个试管中添加 1 滴石蜡油覆盖，瞬离。

将试管放入热循环仪中 65°C 反应 7-20 min。

注意: 孵育时间视具体情况而定，孵育温度从 35 °C- 70°C，这些条件参数都应该通过优化获得。

- 将 DSN 酶失活，每管加入 5 μ L 2X DSN 终止液，混匀并瞬离。
- 在热循环仪上 5 室温孵育 5 min。

参考文献

- [1] D.A. Shagin et al. (2002) *Genome Res*, 12 (12): 1935–1942 / pmid: 12466298
- [2] P.A. Zhulidov et al. (2004) *Nucleic Acids Res*, 32 (3): e37 / pmid: 14973331
- [3] EA. Bogdanova et al. (2011) *Methods Mol Biol*, 729: 85–98 / pmid: 21365485
- [4] D. Christodoulou et al. (2011) *Curr Protoc Mol Biol*, chapter 4: unit 4.12 / pmid: 21472699
- [5] I. Shagina et al. (2010) *Biotechniques*, 48 (6): 455–459 / pmid: 20569220
- [6] E.A. Bogdanova et al. (2009) *Mol Biotechnol*, 41 (3): 247–253 / pmid: 19127453
- [7] EA. Bogdanova et al. (2011) *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37 (6): 775–778
- [8] H. Yi et al. (2011) *Nucleic Acids Res*, 39 (20): e140 / pmid: 21880599
- [9] RH. Peng et al. (2008) *Anal Biochem*, 372 (2): 148–155 / pmid: 17905189
- [10] M. Liu et al. (2011) *Biosens Bioelectron*, 26 (11): 4294–4300 / pmid: 21605966
- [11] JF. Swennenhuis et al. (2012) *Nucleic Acids Res*, 40 (3): e20 / pmid: 22123742
- [12] BC. Yin et al. (2012) *J Am Chem Soc*, 134 (11): 5064–5067 / pmid: 22394262
- [13] Y. Zhao et al. (2008) *Nucleic Acids Res*, 36 (3): e14 / pmid: 18073199
- [14] Y. Zhao et al. (2011) *Methods Mol Biol*, 735: 47–54 / pmid: 21461810
- [15] M. Kunitz. (1950) *J Gen Physiol*, 33: 363–377 / pmid: 15406374

4

联系方式:

深圳市纽邦生物科技有限公司

地址: 深圳市南山区西丽街道阳光一路阳光工业区 1 栋 105

联系电话: 0755-82056900

00852-6649 2644 (Hong Kong)

邮箱: info@newbornco.com

邮编: 518100