

ДНКаза E

Кат. ## EK007S, EK007M

Версия 2 от 3 июля 2023 г.

ДНКаза E — термостойкая эндонуклеаза, разрушающая ДНК до одноцепочечных олигонуклеотидов. Ферментативная активность проявляется в присутствии катионов кальция и магния, а ее оптимум достигается при слабокислом pH и повышенной температуре.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Состав

Компонент	EK007S	EK007M
ДНКаза E (лиофилизированная)	100 е.а.*	500 е.а.*
Буфер для хранения ДНКазы	100 мкл	500 мкл
10X Реакционный буфер для ДНКазы	100 мкл	500 мкл
3М Ацетат натрия	1 мл	5 мл (5 x 1 мл)

* 1 единица активности ДНКазы E соответствует такому количеству фермента (мкг), которое увеличивает оптическую плотность раствора, содержащего 25 мкг общей ДНК тимуса теленка, на 0.01 условную единицу в минуту при 260 нм, 25 °С.

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Растворенная «ДНКаза Е» может храниться при –20 °С не более 6 месяцев.

Количество реакций

Набор ЕК007S рассчитан на 50 реакций удаления геномной ДНК из препаратов РНК или 100 реакций удаления ДНК матрицы после *in vitro* транскрипции.

Набор ЕК007М рассчитан на 250 реакций удаления геномной ДНК из препаратов РНК или 500 реакций удаления ДНК матрицы после *in vitro* транскрипции.

Область применения

- Удаление геномной ДНК из препаратов РНК.
- Удаление ДНК-матрицы после *in vitro* транскрипции.

Основные характеристики

- Оптимальная температура работы: 65 °С.
- Оптимальное количество ДНК на 1 е.а. ДНКазы Е: 500 нг.
- Разрушает ДНК до одноцепочечных олигонуклеотидов.
- Не содержит РНКаз.
- Время реакции: 10 минут.

Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением 13 000 g.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы от 1 до 1 000 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Этанол 80% и 96%.

Протокол

Общее время работы: 1 час.

1. Подготовка растворов

Внимание! Вследствие электростатических эффектов, лиофилизированный осадок «ДНКазы Е» может отделиться от дна пробирки и оказаться на крышке. При вскрытии пробирки проследите, что осадок остался внутри пробирки.

1.1. Добавьте «Буфер для хранения ДНКазы» в пробирку с лиофилизированной «ДНКазой Е» в количестве:

ЕК007S — 100 мкл;

ЕК007М — 500 мкл.

1.2. Аккуратно перемешайте пипетированием, инкубируйте 1 мин при комнатной температуре. Затем перемешайте встряхиванием, сбросьте капли центрифугированием.

Напишите на этикетке дату растворения «ДНКазы Е». Растворенная «ДНКазы Е» может храниться при температуре -20°C не более 6 месяцев.

2. Удаление геномной ДНК из препаратов РНК

2.1. Смешайте в пробирке следующие компоненты:

РНК: до 1 мкг;

10X Реакционный буфер для ДНКазы: 1 мкл;

Растворенная ДНКазы Е: 1 мкл;

Вода*: до 10 мкл.

** Используйте воду для ПЦР (например, «Вода деионизированная, свободная от нуклеаз», кат. ## РВ207S/М/Л, Евроген).

► Рекомендуется использовать РНК высокого качества (не деградированную).

► Для дополнительной защиты РНК от деградации РНКазами рекомендуется добавить в реакционную смесь 0.5 мкл ингибитора РНКаз (например, Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## ЕК005S/М, Евроген).

2.2. Реакционную смесь тщательно перемешайте пипетированием и инкубируйте в течение 10 минут при 65°C .

2.3. Инактивируйте фермент переосаждением этанолом (см. п. 4).

3. Удаление ДНК матрицы после *in vitro* транскрипции

3.1. После завершения реакции *in vitro* транскрипции в реакционную смесь добавьте растворенную «ДНКазу Е» из расчета: 2 мкл на 1 мкг ДНК матрицы.

3.2. Реакционную смесь тщательно перемешайте пипетированием и инкубируйте в течение 10 минут при 65 °С.

3.3. Инактивируйте фермент переосаждением этанолом (см. п. 4).

4. Протокол переосаждения реакционной смеси этанолом

4.1. Доведите объем реакционной смеси водой без РНКаз до 100 мкл.

4.2. Добавьте 10 мкл «3М Ацетата натрия» и 300 мкл 96% этанола. Перемешайте смесь на вортексе.

4.3. Центрифугируйте пробирку в течение 15 минут на максимальных оборотах (13 000 g).

В процессе центрифугирования на дне пробирки формируется полупрозрачный белый осадок РНК.

4.4. Аккуратно удалите надосадочную жидкость, не задевая осадок дозатором.

4.5. Аккуратно по стенке пробирки добавьте 0.5 мл 80% этанола.

4.6. Центрифугируйте в течение 5 минут на максимальных оборотах (13 000 g).

4.7. Повторите п.п. 4.4.–4.6.

4.8. Аккуратно удалите надосадочную жидкость, не задевая осадок дозатором, и подсушите осадок в течение 2 минут при 37 °С или при комнатной температуре в течение 5–10 минут. Осадок должен стать полностью прозрачным (бесцветным).

4.9. Растворите осадок в необходимом объеме воды без РНКаз.

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru