

# Дуплекс-специфическая нуклеаза (DSN)

Кат. ## EA001, EA002, EA003

Версия 1 от 4 декабря 2023 г.

Дуплекс-специфическая нуклеаза (DSN) — фермент, выделенный из гепатопанкреаса камчатского краба [1]. DSN применяют для расщепления двухцепочечной ДНК (дцДНК) и ДНК в составе гибридного гетеродуплекса ДНК-РНК. Фермент способен различать короткие ДНК-дуплексы с полной и частичной комплементарностью. Однако он не активен в отношении одноцепочечной ДНК (оцДНК), оцРНК и дцРНК.

**Только для применения в научно-исследовательских целях.**

Продукты на основе DSN компании Евроген защищены патентами США №7,435,794 и 7,803,922. При использовании DSN вы принимаете условия Ограниченной лицензии #002:

<https://evrogen.ru/support/license-statements/evrogen-dsn-license>

## Состав

| Компонент                      | EA001   | EA002    | EA003   |
|--------------------------------|---------|----------|---------|
| Duplex-specific nuclease (DSN) | 50 е.а. | 100 е.а. | 10 е.а. |
| DSN storage buffer             | 120 µl  | 120 µl   | 120 µl  |
| 10X DSN Master Buffer          | 200 µl  | 200 µl   | 200 µl  |
| 2X DSN stop solution           | 1 ml    | 1 ml     | 1 ml    |
| DSN control template           | 20 µl   | 20 µl    | 20 µl   |

ДНКазную активность измеряют с помощью модифицированного метода Кунитца (Kunitz). За единицу активности принимают количество DSN, которое приводит к увеличению поглощения в препарате ДНК при 260 нм на 0.001 ед. за 1 минуту. Условия определения: 50 мкг/мл ДНК из тимуса теленка в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7.15, содержащем 5 мМ MgCl<sub>2</sub>; температура 25 °С.

## Условия хранения и транспортировки

**Хранение:** –20 °С.

**Транспортировка:** при комнатной температуре.

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

## Область применения

- Нормализация полноразмерных библиотек кДНК, в том числе для высокопроизводительного секвенирования (NGS) [2, 3, 4].
- Нормализация геномной ДНК [5].
- Деpletion кДНК, в том числе рибосомной [6, 7, 8].
- Вычитающая гибридизация кДНК [9].
- Детекция однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) [1, 10].
- Получение проб без повторов для FISH [11].
- Мультиплексная флуоресцентная детекция микроРНК [12].
- Определение длины теломерных выступов [13, 14].

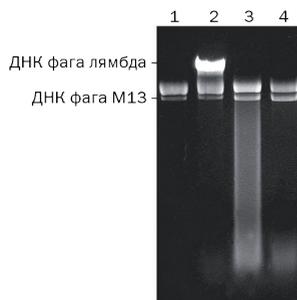
Примеры применения DSN приведены в списке литературы в конце инструкции.

## Основные характеристики

### Субстратная специфичность

DSN расщепляет ДНК в составе дцДНК или гетеродуплекса ДНК-РНК.

DSN не расщепляет оцДНК (см. Рисунок 1) и оцРНК, а также дцРНК. Возможна слабая нуклеазная активность в отношении оцДНК при очень высоких концентрациях субстрата и фермента, но только при отсутствии в растворе дцДНК или гетеродуплексов ДНК-РНК.

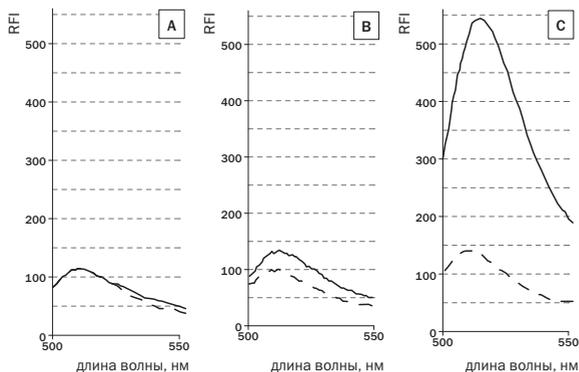


**Рисунок 1 — эффективность расщепления DSN смеси оцДНК фага M13 и дцДНК фага лямбда.**

Дорожки 1, 2 — отрицательные контроли: инкубированная ДНК фага M13 (1) и смеси ДНК фагов M13 и лямбды (2) без добавления DSN.

Дорожки 3, 4 — смеси ДНК фагов M13 и лямбда, обработанные ферментом DSN при 70 °C: инкубация в течение 1.5 минут (3); 5 минут (4).

Фермент чувствителен к наличию неспаренных оснований в коротких фрагментах дцДНК (см. Рисунок 2). Для эффективного расщепления необходимо, чтобы полностью комплементарные участки имели длину не менее 10 п.о. для ДНК гомодуплексов и 15 п.о. для ДНК-РНК гетеродуплексов.



**Рисунок 2** — активность DSN в случае одного некомплементарного основания в DSN дуплексах (A, B) и полностью комплементарном дуплексе (C).

В качестве пробы использовали меченый олигонуклеотид 5-карбофлуоресцеин (FI)-5'-gccctatagt-3'-TAMRA и комплементарные олигонуклеотиды следующего состава:

A — 5'-actcactataCggcggaat-3';

B — 5'-actcactataggTcgaat-3';

C — 5'-actcactataggcggaat-3'.

Дуплексы инкубировали с DSN 15 минут при 35 °С. На рисунке приведены спектры флуоресценции при возбуждении на 480 нм. Пунктирная линия соответствует спектру излучения дуплексов без добавления фермента, сплошная линия — после инкубации с DSN.

Исходный сигнал флуоресценции карбофлуоресцеина невысок (около 100–150 ед.) из-за безызлучательного переноса энергии с карбофлуоресцеина на близко находящийся краситель TAMRA. В случае расщепления зонда DSN, которое эффективно происходит только в случае полностью комплементарного дуплекса, яркость флуоресценции карбофлуоресцеина существенно повышается (до 550 ед., Рисунок 2С).

### Биохимические свойства

- Для активности DSN необходимы катионы  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , или  $Mg^{2+}$ . Концентрация ионов  $Mg^{2+}$  для большинства реакций должна быть не менее 5 мМ (см. Рисунок 3). Вещества, связывающие двухвалентные катионы (например, ЭДТА), ингибируют реакцию.
- DSN крайне чувствительна к ионной силе (например, в присутствии 0.2 М NaCl активность падает в 10 раз). Хаотропные агенты или полиамины также ингибируют реакцию.
- Оптимальная температура работы фермента: 60 °С (см. Рисунок 3). При 80 °С активность DSN составляет всего 10% от исходной (частично может быть вызвано денатурацией дцДНК).
- pH оптимум — в области 6.6 (см. Рисунок 3). При значении pH в диапазоне от 3 до 5 активность фермента составляет всего 10% от максимальной. При этом DSN стабильна в широком диапазоне pH (4–12) при температуре ниже 65 °С.
- Инкубация DSN в течение 30 минут при температуре 70 °С приводит к падению активности фермента на 40%, при температуре 80 °С — на 60%.
- Инкубация DSN с агрессивными химическими агентами, такими как 1% SDS, 10 мМ β-меркаптоэтанол или 0.3% перекись водорода при 37 °С в течение 30 минут приводит лишь к небольшой потере активности фермента (не более 10%). Однако инкубация с теми же химическими веществами при 60 °С приводит к резкому падению активности. В таких условиях SDS полностью ингибирует реакцию, а β-меркаптоэтанол и перекись водорода снижают активность на 70% и 80%, соответственно.
- DSN не расщепляется протеиназой К при инкубации в течение 30 минут при 37 °С.

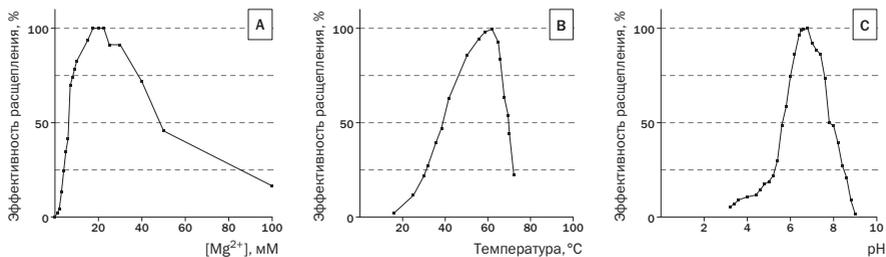


Рисунок 3 — влияние концентрации ионов  $Mg^{2+}$  (А), температуры (Б), pH (В) на активность DSN.

Измерение ДНКазной активности в отношении дцДНК проводили с помощью модифицированного метода Кунитца [15].

## Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Амплификатор.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы на 2, 10, 20, 200 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Пробирки для ПЦР, подходящие для используемого амплификатора.
- Оборудование и реагенты для проведения электрофореза в агарозном геле.
- Глицерин 100%.
- Вода деионизированная, свободная от нуклеаз.

## Протокол

### 1. Приготовление рабочего раствора DSN

1.1. Добавьте «DSN storage buffer» к лиофилизированной DSN в количестве:

EA001 — 25 мкл;

EA002 — 50 мкл;

EA003 — 5 мкл.

1.2. Перемешайте содержимое пробирки легким постукиванием. Сбросьте капли кратким центрифугированием. Избегайте вспенивания раствора.

1.3. Инкубируйте пробирку в течение 5 минут при комнатной температуре.

1.4. Добавьте в пробирку равный объем 100% глицерина (конечная концентрация глицерина должна быть 50%). Перемешайте содержимое пробирки аккуратным пипетированием. Сбросьте капли коротким центрифугированием. Избегайте вспенивания раствора.

**Внимание!** При работе со 100% глицерином используйте наконечник с обрезанным кончиком для корректного забора и выпуска вязкого глицерина!

1.5. Концентрация полученного препарата — 1 ед./мкл. Храните раствор DSN при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Тестирование активности фермента DSN

► *Рекомендуется проверить активность DSN перед использованием.*

2.1. Разморозьте компоненты набора при комнатной температуре (кроме раствора DSN) и поместите в лед.

2.2. Приготовьте реакционную смесь:

|        |  |
|--------|--|
| 12 мкл | Вода деионизированная, свободная от нуклеаз; |
| 4 мкл  | DSN control template;                        |
| 2 мкл  | 10X DSN Master Buffer.                       |
| 18 мкл | Общий объем.                                 |

2.3. Перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли кратким центрифугированием.

2.4. Перенесите по 9 мкл реакционной смеси в две пробирки для ПЦР, пометьте пробирки буквами «К» (контрольная) и «О» (опытная).

2.5. Добавьте 1 мкл «DSN storage buffer» в пробирку «К». Перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли кратким центрифугированием.

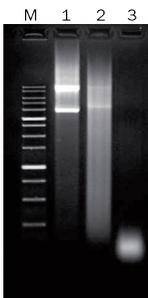
2.6. Добавьте 1 мкл раствора DSN в пробирку «О». Перемешайте содержимое пробирки легким постукиванием и сбросьте капли кратким центрифугированием.

► *Если у амплификатора нет «горячей крышки», наслоите каплю минерального масла и сбросьте капли кратким центрифугированием.*

2.7. Инкубируйте пробирки в амплификаторе в течение 10 минут при  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

2.8. Добавьте 5 мкл «2X DSN stop solution», перемешайте раствор и сбросьте капли коротким центрифугированием. Перенесите пробирки на комнатную температуру.

2.9. Нанесите на 1.5% агарозный гель 5 мкл из пробирок «О» и «К» и 100 нг маркера длин ДНК (1 kb). На основании полученных результатов оцените, насколько хорошо работает фермент. Для сравнения используйте приведенную ниже фотоафию геля:



**Рисунок 4 — тестирование активности фермента DSN.**

Дорожка 1 — контрольная реакция: инкубация без добавления DSN.

Дорожка 2 — инкубация с частично инактивированным ферментом.

Дорожка 3 — инкубация с активным ферментом.

Дорожка М — DNA Ladder 1 kb (кат. # NL001, Евrogen).

### 3. Проведение протокола

► *Перед проведением анализа исследуемых образцов следует подобрать условия реакции: оптимизировать время инкубации и количество фермента на матрице подобной исследуемым образцам. Для этого рекомендуется приготовить последовательные разведения DSN (используйте для разведения «DSN storage buffer»). Затем проведите реакцию по протоколу, описанному ниже, и используйте несколько вариантов времени инкубации. Оцените результат на гель-электрофорезе (1.5% агароза), нанесите образцы по 5 мкл на дорожку и используйте 100 нг маркера длин ДНК (1 kb).*

3.1. Разморозьте реактивы при комнатной температуре (кроме раствора DSN). Поместите реактивы в лед.

3.1. Рассчитайте необходимый объем компонентов, исходя из числа образцов. На 1 образец понадобится:

|        |  |
|--------|--|
| X мкл  | Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;   |
| 1 мкл  | 10X DSN Master Buffer;   |
| 1 мкл  | Раствор DSN;   |
| Y мкл  | 50–500 нг ДНК (растворенной в воде деионизированной, свободной от нуклеаз) — добавляется отдельно. |
| 10 мкл | Общий объем.   |

3.2. На льду приготовьте реакционную смесь, используя все компоненты, кроме исследуемых образцов. Тщательно перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли в минисцентрифуге.

3.3. Подготовьте пробирки для ПЦР, промаркируйте их.

3.4. Разнесите реакционную смесь в равных объемах в пробирки.

3.5. Внесите в пробирки исследуемые образцы. Перемешайте содержимое пипетированием.

► *Если у амплификатора нет «горячей крышки», наложите каплю минерального масла. Сбросьте капли кратким центрифугированием.*

3.6. Инкубируйте пробирки в амплификаторе в течение 3–20 минут при 65 °С.

3.7. Для инактивации DSN добавьте 5 мкл «2X DSN stop solution». Перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли кратким центрифугированием.

3.8. Уберите пробирку в лед или инкубируйте в амплификаторе в течение 5 минут при 65 °С.

### Возможно приобрести дополнительно

| Кат. # | Продукт                                     | Количество          |
|--------|---|---------------------|
| NL001  | Маркер длин ДНК DNA Ladder 1 kb             | 40 мкг              |
| PB207S | Вода деионизированная, свободная от нуклеаз | 7.5 мл (5 x 1.5 мл) |

## Список литературы

- [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

## Наборы и сервисы Евроген

**Н** >>> – ссылка на страницу  
НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н** >>>

**С** >>> – ссылка на страницу  
СЕРВИСА

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н** >>>

Синтез и амплификация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Клонирование ДНК **Н** >>> **С** >>>

Выявление контаминации микоплазмой **Н** >>>

Оценка ДНК **Н** >>>

Нормализация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Практикум по геной инженерии **Н** >>>

Генотипирование **Н** >>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С** >>>

Секвенирование по Сэнгеру **С** >>>

Синтез генов **С** >>>

Сайт-направленный мутагенез **С** >>>

Консультация по продуктам: [support@evrogen.ru](mailto:support@evrogen.ru)

Подробную информацию о наших наборах и сервисах  
можно получить на сайте [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)

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