

# 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].

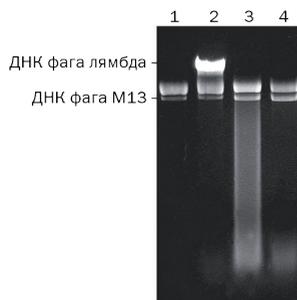
Примеры применения DSN приведены в списке литературы в конце инструкции.

## 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.

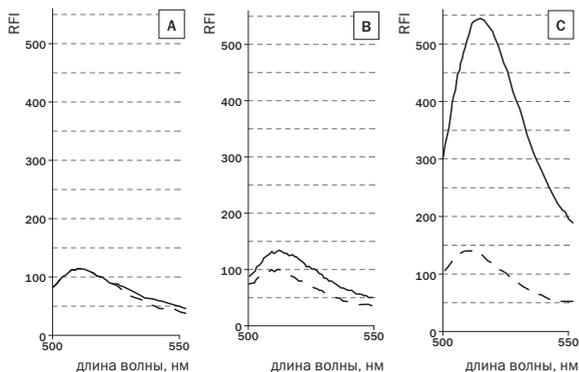


**Рисунок 1 — эффективность расщепления DSN смеси оцДНК фага M13 и дцДНК фага лямбда.**

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'-actcactataCggcgaaat-3';

B — 5'-actcactataggTcgaaat-3';

C — 5'-actcactataggcgaaat-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.

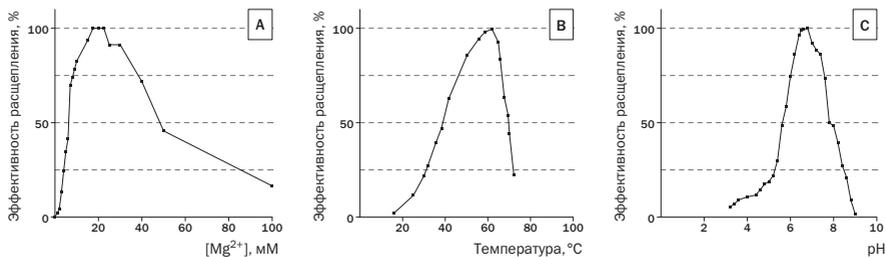


Рисунок 3 — влияние концентрации ионов  $Mg^{2+}$  (А), температуры (Б), pH (В) на активность DSN.

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.

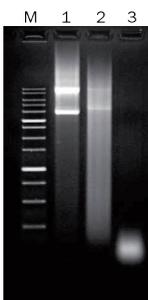
2.6. Добавьте 1 мкл раствора DSN в пробирку «О». Перемешайте содержимое пробирки легким постукиванием и сбросьте капли кратким центрифугированием.

► *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)