

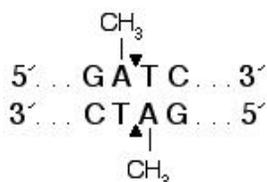


Dpn I

产品信息:

组分	CL304-01
Dpn I (10U/μl)	250U×2
10×Dpn I Buffer	500μl×2

识别序列:



储运温度: -20℃ 保存。

来源: dpnI质粒的重组大肠杆菌

单位定义: 在37℃条件下, 50μl 反应体系中, 一小时内消化 1 μg 的甲基化的 pBR322 DNA 。

失活条件: 80℃ 热处理 20 分钟, 可使酶失活。

一般酶切反应体系:

10×Dpn I Buffer	2μl
DpnI	1μl
DNA	≤1μg
灭菌水	up to 20μl

甲基化影响:

能够切断腺嘌呤甲基化的 GmATC 序列; 不能切断非甲基化的 GATC序列。能够切断来源于大肠杆菌E.coli (dam+)的 DNA; PCR 产物不受 dam 甲基化的影响。

酶存储缓冲液:

10 mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 500μg/ml BSA, 50% Glycerol, pH 7.4

10×DpnI缓冲液: 330mM TrisHAc, 10mM Mg(Ac)₂, 660mM KAC, 5mM DTT, pH7.9

限制性内切酶DpnI在定点突变中的应用:

限制性内切酶DpnI可识别GmATC序列并在甲基化的腺嘌呤处切割。大肠杆菌由于甲基化修饰限制系统, 内源性的dam甲基化酶可将质粒DNA甲基化。从大肠杆菌中提取出来的质粒DNA的GATC序列中的腺嘌呤已被甲基化, 因此可以被DpnI识别并切断。耐热DNA聚合酶扩增出来的DNA未被甲基化, 因此不能被DpnI识别。以甲基化质粒DNA为模板的PCR体系中, 可通过DpnI的消化特点将大肠杆菌来源的质粒DNA除掉, 消除原始模板对实验的影响。

(1)DpnI处理质粒DNA后的转化效率

从DH5α (dam+) 及JM110 (dam-) 中抽提的1μg 的pUC19 DNA (pUC19 (dam+), pUC19 (dam-)), 在50μl 反应体系中, 37℃ DpnI处理1小时, 标准方法测定细菌转化效率。用DpnI处理pUC19 (dam+) DNA时的转化效率。1 Unit处理1小时后降低到1/500, 20 Units处理后1小时转化效率降低到1/10000。用DpnI处理pUC19 (dam-) 时, 未发现转化效率明显下降。

(2)DpnI酶在多种高保真酶的缓冲液中活性检测

选取Pfu polymerase buffer, KOD polymerase buffer, Phusion polymerase buffer, Xerox polymerase buffer, UltraPfu polymerase

buffer, Q5 polymerase buffer, FastPfu polymerase buffer, PrimerStart polymerase buffer等多个高保真酶个缓冲液为DpnI的缓冲液, pUC19 (dam+) DNA为酶切底物, 经检测DpnI酶切DNA的成功率均为80%以上。

DpnI在定点突变中的消化步骤

- (1)将定点突变后的 PCR 扩增产物 10 μ l 进行 1%琼脂糖电泳。看到有预期大小的条带, 再进行 DpnI酶消化操作。
- (2)取 10-20 μ l PCR 产物置于一个 PCR 管中, 加入 1 μ l 的 DpnI酶, 置于 37 $^{\circ}$ C恒温箱中消化 1-2 小时。
- (3)消化完毕后, 取 1 μ l, 2 μ l 或 5 μ l 消化产物进行标准的大肠杆菌转化操作程序。一般用 2 μ l 的消化产物足够。
- (4)次日长出细菌克隆后, 挑取 3-4 个单克隆菌落摇菌用于测序分析。

BM190306