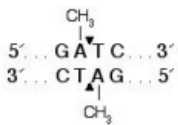


公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！

商品属性：

产品名称	规格	货号
Dpn I	250U*2	P-PR1234

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1μg的甲基化的pBR322 DNA。

失活条件：80℃热处理20分钟，可使酶失活。

般酶切反应体系：

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10μl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10-20μl PCR产物置于一个PCR管中，加入1μl的DpnI酶，置于37℃恒温箱中消化1-2小时。

(3)消化完毕后，取1μl, 2μl或5μl消化产物进行标准的大肠杆菌转化操作程序。一般用2μl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。