



CviJI*

CviJI*

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:

5'-G C-3' AUSSER 5'-Py G C Pu-3'
3'-C G-5' 3'-Pu C G Py-5'

Best.Nr.	Größe
E2126-01	100 Einheiten
E2126-02	400 Einheiten

Reaktionstemperatur: 37°C

Inaktivierungstemperatur (20 min): 50°C

Prototyp: CviJI

Quelle: Chlorella virus IL-3A

Hinweis 1: Gereinigt aus einer rekombinanten Quelle (Patent Nr. US005472872A)

Packungsinhalt:

- CviJI*
- 2x Reaktionspuffer CviJI*

Lagerungsbedingungen: Lagerung bei -20°C

Empfohlener Puffer: CviJI*

Literatur:

1. Xia, Y., Burbank, D., Uher, L., Rabussay, D. und Van Etten, J. *Nucleic Acids Res.* 15, 6075-6090.
2. Fitzgerald, M.C., Skowron, P., Van Etten, J.L., Smith, L.M. und Mead, D.A. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 3753-3762.
3. Skowron, P.M., Swaminathan, N., McMaster, K., George, D., Van Etten, J. und Mead, D. *Gene* 157 (1995) 37-41.
4. Mead, D., Swaminathan, N., Van Etten J. und Skowron, P.M.: *Recombinant CviJI restriction endonuklease.* (1995) *United States Patent no US005472872A.*
5. Swaminathan, N., McMaster, K., Skowron, P. und Mead, D.A. *Analytical Biochemistry* 255 (1998) 133-141.

Anmerkungen von Kunden:

(1) CviJI* wird durch Glycerin-Konzentrationen über 2.5 % gehemmt. Da der Lagerungspuffer (Storage Buffer) Glycerin enthält, empfiehlt es sich, im Zweifel die Reaktionszeit zu verlängern anstatt zusätzliche Einheiten von CviJI* einzusetzen. Alternativ kann DNA durch Ethanol-Fällung präzipitiert und nochmals geschnitten werden.

(2) Da die Restriktasen CviJI* und CviJI DNA extrem häufig schneiden, wird eine Interferenz nahe benachbarter Erkennungsstellen beobachtet. Solche Stellen werden langsamer geschnitten. Letztlich werden nur selten DNA-Fragmente beobachtet, die kürzer als 15 Basenpaare sind. Aus diesem Grund sind die erhaltenen DNA-Fragmente hervorragend geeignet für Applikationen mit anonymen Primern.

(3) Der CviJI* Reaktionspuffer enthält DMSO. Weitere enzymatische Manipulationen (Ligationen, Markierungen etc.) werden nicht gestört. Ist es beabsichtigt, die DNA mittels Elektrophorese zu analysieren, wird eine Ethanol-Fällung der Reaktionsmischung nach vollständigem Verdau der DNA dringend empfohlen. Durch Ethanol-Fällung wird die Ausbildung diffuser Banden auf Agarose- und Polyacrylamidgelen unterbunden.

Beschreibung: CviJI* ist ein einzigartiges Restriktionsenzym, das DNA an einer sehr kurzen Erkennungssequenz einer Länge von lediglich zwei oder drei Basen schneidet (1,2). Die unmodifizierte Restriktase CviJI (Artikel. No 2125) schneidet DNA normalerweise in der Basenabfolge 5'-Pu G C Py-3' zwischen G und C, und erzeugt stumpfe („blunt“) Enden.

- Unter weniger stringenten ("relaxed") Bedingungen (in Anwesenheit von Mg²⁺, ATP und weiteren unterstützenden Faktoren) schneidet CviJI* sämtliche Basenabfolgen 5'-G C-3' außer 5'-Py G C Py 3'.
- Spaltet einzel- und doppelsträngige DNA in kleine Bruchstücke einer Länge zwischen 20 und 200 bp.
- Wird verwendet, um zahlreiche Oligonukleotide einer unbekannt Probe zu erzeugen.

Anwendungsgebiete: CviJI und CviJI* schneiden DNA extrem häufig und eignen sich damit für eine Vielzahl neuartiger Anwendungen in der Molekularbiologie (2,3,4). Nach dem Verdau von DNA einer unbekannt Sequenz mit CviJI bzw. mit CviJI* kann nach thermischer Denaturierung eine große Anzahl von Oligonukleotiden erzeugt werden. Diese wiederum können als Ausgangsmaterial für Experimente genutzt werden, wie zum Beispiel: **1.** Lokalisierungs- ("mapping") und Sequenzierungsprojekte mit Primern anonymer Sequenz, **2.** hochauflösende Lokalisierung ("mapping") mit kurzen DNA-Stücken, **3.** das Markieren von Nukleinsäuren („Thermal Cycle Labelling“, 4, Abb. 1), **4.** Detektion (5); **5.** Amplifikation (5); **6.** Klonierung (2, 3) und **7.** Immobilisierung ("capture") von Nukleinsäuren. Die Restriktasen CviJI und CviJI* können auch in Anwendungen wie "shotgun cloning", "epitope mapping" oder "panning" eingesetzt werden.

Standard-Protokoll für Restriktionsverdau:

Zusammenfügen folgender Reaktionskomponenten:

1-2 µg DNA oder 10 µl PCR-Produkt (=0.1-2 µg DNA)
12,5 µl 2x Puffer CviJI*

1-2 U CviJI* (bzw. 1 U/µg DNA, < 10 % Reaktionsvolumen!)

Tips: Enzym als letzte Komponente zufügen.

Komponenten vor Zugabe des Enzyms gut mischen.

Nach Enzymzugabe nicht vortexen, vorsichtig mischen.

Mittels Partialverdau unter nicht optimalen Bedingungen

können zufällig geschnittene stumpfe (blunt)-DNA Fragmente für randomisierte Genbanken hergestellt werden.

@ 25 µl H₂O, DNA- und DNase frei

Inkubation für 1 h bei 37°C

Um DNA mit hohem Molekulargewicht (z.B. genomische DNA von Pflanzen) vollständig zu schneiden, sollte ein Überschuss an Enzym eingesetzt und die Reaktionszeit verlängert werden.

Stoppen der Reaktion (Alternativen):

- (a) 1.1 µl EDTA pH 8.0 [0.5 M] zufügen, Endkonz. 20 mM *oder*
- (b) Hitzeinaktivierung
20 min bei 50°C *oder*
- (c) DNA Reinigung mit Zentrifugationssäulen
(z.B. EURx PCR/DNA CleanUp Kit, Best.Nr. E3520) *oder*
- (d) Gelelektrophorese, Ausschneiden einzelner Banden
(z.B. EURx AgaroseOut DNA Kit, Best.Nr. E3540) *oder*
- (e) Phenol-Chloroform Extraktion oder Ethanol-Fällung.

Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

1 x CviJI* Buffer: 20 mM Glyzylglyzin-KOH (pH 8.5), 10 mM Magnesiumazetat, 50 mM Kaliumazetat, 0.1 mM ATP, 0.1 mM Dithiothreitol, 30% DMSO.

Hinweis 2: Der Reaktionspuffer liegt als 2x konzentrierte Stammlösung bei.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Trisazetat (pH 7.2 bei 22°C), 0.5 mM EDTA, 0.1 mM Dithiothreitol, 5 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Kaliumazetat, 50% (v/v) Glycerin.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, sowie auf unspezifische einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft.