



EcoRI

EcoRI

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:



| Best.Nr. | Größe |
|----------|-------------------|
| E2150-01 | 10 000 Einheiten |
| E2150-02 | 50 000 Einheiten |
| E2150-03 | 250 000 Einheiten |

Reaktionstemperatur: 37°C

Inaktivierungstemperatur (20 min): 65°C

Prototyp: EcoRI

Quelle: *Escherichia coli* RY 13

Packungsinhalt:

- EcoRI
- 10x Reaktionspuffer ONE
- BSA [100x] + Detergenzien
Wird als separate Komponente beigelegt, um Ausfällungen im Reaktionspuffer vorzubeugen.
- Dilution Buffer # 3
Nur für Enzyme in höheren Konzentrationen als 10 U/μl. Hohe Proteinkonzentrationen gewährleisten Stabilität für langfristige Lagerung. Mittels Dilution Buffer können Arbeitsverdünnungen in gebräuchlichen Konzentrationen (5-10 U/μl) erstellt werden, die bei -20°C nicht durchfrieren.

Lagerungsbedingungen: Lagerung bei -20°C

Doppelverdau – Pufferkompatibilität: Puffer ONE ist kompatibel mit den meisten EURx Restriktionsenzymen.

* - Das Enzym besitzt unter gewissen Bedingungen unspezifische („Star“-)Aktivität.

Empfohlener Puffer: ONE
(oder kompatible Puffer anderer Hersteller)

DNA Methylierung:

Keine Inhibition: dam, dcm, EcoKI
Potentielle Inhibition : CpG

Standard-Protokoll für Restriktionsverdau:

Zusammenfügen folgender Reaktionskomponenten:

- 1-2 μg DNA oder 10 μl PCR-Produkt (= -0.1-2 μg DNA)
- 5 μl 10x Puffer ONE
- 0.5 μl BSA [100x] + Triton™X-100
- 1-2 U EcoRI (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.
Hohe Enzymmengen (Überschuss) können den Reaktionsablauf deutlich beschleunigen.

@ 50 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) 2.1 μl EDTA pH 8.0 [0.5 M] zufügen, Endkonz. 20 mM *oder*
- (b) Hitzeinaktivierung
20 min bei 65°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 Ethanolgefällung.

Nicht optimale Pufferbedingungen:

Um verminderter Enzymaktivität entgegenzuwirken, kann die Enzymmenge und / oder die Reaktionszeit erhöht werden. Als Orientierungshilfe dienen folgende Werte:

- *Enzymmenge:* Anstelle von 1 U Enzym werden ~4 U Enzym in Puffern mit 25 % rel. Aktivität, ~2 U in 50 %, ~1.5 U in 75 % oder ~1 U in 100 % eingesetzt.
- *Reaktionszeit:* Erhöhung um das ~1.3-fache (75 % Rel. Aktivität), ~2-fache (50 %) oder ~4 fache (25 %).

Hinweis: Die Zugabe von 0,025% detergenten und BSA ist erforderlich für einen optimalen Verdau.

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 1 μg Lambda DNA vollständig zu schneiden. Die Inkubation wird bei 37°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 50 μl im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt.

Kompatibilität des Reaktionspuffers:

Dieses Enzym ist vollständig kompatibel zu Puffersystemen anderer Hersteller. Bitte beachten Sie auch die entsprechenden Bedienungsanleitungen von Drittanbietern.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

50 mM Tris-HCL (pH 7.2), 300 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM beta-Mercaptoethanol, 0.2 % [v/v] Tergitol™ TMN, 500 μg/ml Rinderserumalbumin, 5 μg/ml PLL, 50 % [v/v] Glycerin.

Qualitätskontrolle:

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