

MmeI

Mme I

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2288-01	100 Einheiten
E2288-02	500 Einheiten

Reaktionstemperatur: **37°C**

Inaktivierungstemperatur (20 min): **80°C**

Prototyp: **Mmel**

Quelle: *Methylophilus methylotrophus*

Packungsinhalt:

- Mmel
- 10x Reaktionspuffer Mmel

Lagerungsbedingungen: Lagerung bei -20°C.
Store Reaktionspuffer (Reaction Buffer) in aliquots bei -70°C.

Doppelverdau – Pufferkompatibilität:

Puffer	% Relative Aktivität
Low	○ NE***
Medium	○ NE***
High	○ NE***
Acet	○ NE***

*** NE - Dieser Puffer wird nicht empfohlen.
Geeigneter Puffer: Mmel.

Empfohlener Puffer: Mmel

DNA Methylierung:

Keine Inhibition: dam, dcm, EcoKI
Inhibition (Blockiert): CpG

Standard-Protokoll für Restriktionsverdau:

Zusammenfügen folgender Reaktionskomponenten:

1-2 µg DNA oder 10 µl PCR-Produkt (≈0.1-2 µg DNA)
3 µl 10x Puffer Mmel

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

Tips: Enzym als letzte Komponente zufügen.

Komponenten vor Zugabe des Enzyms gut mischen.

Nach Enzymzugabe nicht vortexten, vorsichtig mischen.

@ 30 µl H₂O, DNA- und DNase frei

Inkubation für 1 h bei 37°C

Stoppen der Reaktion (Alternativen):

(a) 1.2 µl EDTA pH 8.0 (0.5 M) zufügen, Endkonz. 20 mM *oder*

(b) Hitzeinaktivierung
20 min bei 80°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* Ethanolfällung.

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 1 µg pUC19 DNA so zu schneiden, dass ein stabiles Restriktionsmuster erhalten wird. Die Inkubation wird bei 37°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 30 µl im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt.

Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

1 x Mmel Buffer: 6 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 25°C), 6 mM MgCl₂, 2 mM Dithiothreitol, + unterstützende Faktoren.

Der Reaktionspuffer (Reaction Buffer) sollte nicht öfter als drei Mal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Zum Auftauen sollen Temperaturen von 10 °C nicht überschritten werden. Es wird empfohlen, den mitgelieferten Reaktionspuffer zu aliquotieren und bei -70°C für Langzeitlagerung aufzubewahren. Eine Lagertemperatur von -20°C sollte nur für kurzfristige Aufbewahrung gewählt werden.

Hinweis 1: Ein Überschuss an Mmel inhibiert die Restriktion.

Hinweis 2: Wird durch überlappende CpG Methylierung inhibiert.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

10 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 25°C), 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM beta-Mercaptoethanol, 50 % [v/v] Glycerin.

Qualitätskontrolle:

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