



# SphI

## Sph I

### Restriktions-Endonuklease

#### Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2400-01	250 Einheiten
E2400-02	1 250 Einheiten

**Reaktionstemperatur:** 37°C

**Inaktivierungstemperatur (20 min):** 65°C

**Prototyp:** SphI

**Quelle:** *Streptomyces phaeochromogenes*

#### Packungsinhalt:

- SphI
- 10x Reaktionspuffer ONE
- BSA [100x]

Wird als separate Komponente beigelegt, um Ausfällungen im Reaktionspuffer vorzubeugen.

- Dilution Buffer # 1

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.

#### Empfohlener Puffer: ONE

(oder kompatible Puffer anderer Hersteller)

#### DNA Methylierung:

Keine Inhibition: dam, dcm

Potentielle Inhibition: CpG, EcoKI

#### 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]

1-2 U SphI (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 H<sub>2</sub>O, 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 Ethanol-fällung.

##### 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 %).

##### 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):

10 mM Tris-HCl (pH 7.4 bei 22°C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 % [v/v] Tergitol™ TMN, 400 µg/ml Rinderserumalbumin und 50 % [v/v] Glycerin.

##### Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Einzelstrangsnick (Nicking-) Aktivität, Endonuklease-, Exonuklease-, sowie auf unspezifische einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft.