



TspGWI

TspGWI

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2501-01	50 Einheiten
E2501-02	250 Einheiten

Reaktionstemperatur: **70°C**

Inaktivierungstemperatur (20 min): **--**

Prototyp: **TspGWI**

Quelle: *Thermus species* GW

Hinweis 1: Rekombinant hergestellt aus einem *E. coli* - Stamm, der das *tspGWRI* - Gen aus *Thermus sp.* *GW* trägt.

Packungsinhalt:

- TspGWI
- 10x Reaktionspuffer TspGWI

Lagerungsbedingungen: Lagerung bei -20°C
Langfristige Aufbewahrung von Puffer-Aliquots bei -70°C.

Empfohlener Puffer: TspGWI

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 TspGWI
 - 1-2 U TspGWI (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.
@ 50 µl H₂O, DNA- und DNase frei

Inkubation für länger als 2 Stunden bei 70°C

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 89°C (nicht empfohlen) *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.

Hinweis 1: Es wird empfohlen, die DNA vor dem Verdau aufzureinigen. **Empfohlene Kits: PCR / DNA Clean UP Kit (E3520) oder Agarose Out DNA Kit (E3540)..**

Hinweis 2: Es wird nicht empfohlen, mehr als 2 Einheiten TspGWI pro 50 µl Reaktionsvolumen einzusetzen. Da das Enzym DNA mit hoher Affinität bindet, kann überschüssiges TspGWI zu Retardationen im DNA-Laufverhalten auf Gelen führen, sogar in Gegenwart denaturierender Agenzien.

Hinweis 3: TspGWI wird sehr stark stimuliert, wenn zwei Restriktions-Erkennungsstellen in gegenläufiger Orientierung auf der zu schneidenden DNA vorhanden sind. Sowohl die Distanz zwischen den Erkennungssequenzen als auch die Sequenz in deren unmittelbarer Nachbarschaft beeinflussen die Effizienz der Restriktion. DNA wird langsam verdaut, wenn lediglich eine einzige Erkennungssequenz vorhanden ist.

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 1 µg pBR322 DNA so zu schneiden, dass ein stabiles Bandenmuster erhalten wird. Die Inkubation wird bei 70°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt.

Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

1x TspGWI Buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.5 bei 25°C), 1 mM Dithiothreitol, 10 mM MgCl₂ +unterstützende Faktoren (1).

Hinweis 4: Achtung: Der Reaktionspuffer (Reaction Buffer) ist sehr temperaturempfindlich! Es sollte unbedingt vermieden werden, den Reaktionspuffer wiederholt aufzutauen und wieder einzufrieren. Der Puffer sollte insgesamt **nicht öfter als 3 mal** aufgetaut werden. Deswegen wird empfohlen, den Reaktionspuffer nach Erhalt in kleine Portionen zu aliquotieren und diese für **langfristige Aufbewahrung bei -70 °C** zu lagern. Eine Lagerung bei -20 °C sollte nur der kurzzeitigen Aufbewahrung dienen. Zum Auftauen sollte der Puffer **keinen höheren Temperaturen als 10°C** ausgesetzt werden.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 25 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM Dithiothreitol, 0,02% [v/v] Tergitol™ TMN, 0.02 % Tween20, 0.02%Igepal, 50 % [v/v] Glycerin.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, sowie auf unspezifische einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. Die Enzymspezifität wurde durch Ligation und erneute Restriktion bestätigt.

Literatur:

1. Żylicz-Stachula, A., Harasimowicz-Stońska, R. Sobolewski, I. und Skowron, P., (2002). Nucleic Acids Research 30, 7 e 33.