



Exonuklease III

(*Escherichia coli*)

Exonuklease III (*Escherichia coli*)

Artikel Nr.	Größe
E1140-01	25 000 Einheiten
E1140-02	125 000 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Einheit wird als die Menge des Enzyms definiert, die erforderlich ist, um 1 nmol säurelösliches, radioaktives Material in 30 Minuten bei 37°C (6) zu erzeugen.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C

Exonuklease III ist eine in 3'→ 5' Richtung wirkende Exonuklease. Sie setzt 5'-Mononukleotide an 3'-Enden von DNA-Strängen frei.

Beschreibung:

- Die 3'→ 5' Exonuklease wirkt spezifisch auf doppelsträngige DNA.
- Enthält eine am 3'- Ende doppelsträngiger DNA wirkende Phosphatase, die am 3'-Terminus durch Hydrolyse Phosphomonoester freisetzt.
- Enthält eine AP Endonuklease, die Phosphodiester-Bindungen an depurinierten oder depyrimidinierten Positionen schneidet und dadurch basenfreie Deoxyribose-5'-Phosphat Termini erzeugt (1).
- Das Enzym besitzt Ribonuclease H Aktivität. Bevorzugt werden RNA-Stränge in DNA-RNA Hybridmolekülen abgebaut, vermutlich durch Exonuclease-Aktivität (1).
- Exonuklease III verdaut Duplex-DNA an Einschnitten (nicks), und erzeugt auf diese Weise einzelsträngige Aussparungen.
- Nicht abgebaut werden doppelsträngige DNA mit 3'-Überhängen einer Länge von mindestens 4 Basenpaaren, einzelsträngige DNA oder Nukleotide, die über Phosphorothioat-Bindungen verknüpft sind.
- Ultrareines rekombinantes Enzym.
- Anwendungen des Enzymes:
 - › Konstruktion von unidirektionalen "nested" Deletionen von DNA-Fragmenten (2)
 - › Erzeugung einzelsträngiger DNA für die Dideoxy-Sequenzierung (3)
 - › stellenspezifische punktgenaue Mutagenese (4)
 - › Klonen von PCR Produkten (5).

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

25 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 0.05 mM Dithiothreitol und 50% Glycerin [v/v]

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 bei 22°C), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol und 1.5 nM [³H] Duplex-Lambda-DNA. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten in einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf kontaminierende Endonuklease- Aktivität untersucht. Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann.

Literatur:

1. Rogers, S.G. und Weiss, B., *Exonuclease III of Escherichia coli K-12, an AP endonuclease, Methods Enzymol.*, 65, 201-211, 1980.
2. Henikoff, S., *Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing, Gene*, 28, 351-359, 1984.
3. Guo, Li-He., Wu, R., *New rapid methods for DNA sequencing based on exonuclease III digestion followed by repair synthesis, Nucleic Acids Res.*, 10, 2065-2084, 1982.
4. Vandeyar, M.A., et al., *A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants, Gene*, 65, 129-133, 1988.
5. Li, Ch., Evans, R.M., *Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility, Nucleic Acids Res.*, 25, 4165-4166, 1997.
6. Richardson, C. C., Lehman, I. R. und Kornberg, A. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 251-258.