

Lambda Exonuklease

Lambda-Bakteriophage von *Escherichia coli*)

Lambda Exonuclease

(Lambda-Bakteriophage von *E. coli*)

Artikel Nr.	Größe
E1180-01	1000 Einheiten
E1180-02	5000 Einheiten

Definition der Einheit: Eine Einheit produziert 10 mol säurelösliche Desoxyribonucleotide aus doppelsträngiger DNA in 30 Minuten bei 37°C.

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C

Für die eindeutige PCR Sequenzierung:

1. 1pmol gereinigter DNA wird mit rekombinanter Lambda-Exonuklease verdaut.
2. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms kann die DNA-Sequenzierung vorgenommen werden.

Der Sequenzierungsprimer muss die gleiche Orientierung besitzen wie der 5'-phosphorylierte Primer, also komplementär sein zum unverdauten DNA Strang.

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

67 mM Glycin-KOH (pH 9.4), 50 µg/ml Rinderserum-Albumin, 2.5 mM MgCl₂, 20 µg/ml ultraschallbehandelte markierte Lambda-DNA und Lambda-Exonuklease. Das Reaktionsvolumen ist 50 µl, Inkubation bei 37°C für 30 Minuten

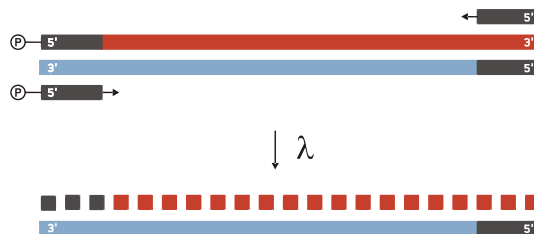
Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase-Aktivitäten geprüft. Die Präparationen werden auf die Anwesenheit linearisierter DNA untersucht.

Doppelsträngige spezifische DNase, produziert durch *Escherichia coli* nach Lambda-Bakteriophagen-Infektion, Lambda Exonuklease verdaut einen DNA Strang vom 5'-Terminus beginnend, sofern am 5'-Ende eine Phosphatgruppe vorhanden ist.

Beschreibung:

- Doppelstrangspezifische DNase mit starker Präferenz für 5'-Phosphat gegenüber 5'-OH-Gruppen. Greift DNA ausschließlich vom 5'-Ende an (1).
- Nicht aktiv gegenüber DNA-Kerben (nicks), DNA-Lücken (gaps) und überstehenden 5'-Enden. Stark verminderte Aktivität (mehr als 100-fach) gegenüber langen ssDNA-Fragmenten. Aktiv gegenüber kurzer ssDNA, stumpfen (blunt) oder 5'-zurückgesetzten DNA-Enden (1).
- Sobald das Enzym an ein DNA-Molekül bindet, baut es den DNA-Strang vollständig ab. Es dissoziiert nicht vorzeitig, um einen anderen DNA-Molekül anzugreifen (1).
- PCR-Produkte, amplifiziert mit jeweils einem am 5'-Ende phosphorylierten PCR-Primer und mit einem zweiten, nicht phosphorylierten Primer, werden durch den Verdau mit Lambda Exonuclease in einzelsträngige DNA umgewandelt. Der unphosphorylierte DNA-Strang, bleibt erhalten, während der 5'-phosphorylierte DNA-Strang zu Monomeren abgebaut wird (5'-pA-OH, 5'-pC-OH, 5'-pG-OH, 5'-pT-OH).
- Für die Vorbereitung von ssDNA-Substraten für Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT). TdT nutzt ssDNA effizienter gegenüber dsDNA (2).
- Bei DNA-Sequenzierung können durch den einzelsträngigen Verdau saubere lesbare Sequenzen ohne "Geisterbanden" (die oft in direkt sequenzierten PCR-Produkten vorhanden sind) erhalten werden. Auch zur sauberen Sequenzierung von DNA mit hohem GC-Gehalt (3).
- Zur Mutationsdetektion mittels SSCP (4): Einzelsträngige DNA-Moleküle gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz werden durch nicht denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese sequenzspezifisch aufgetrennt.
- Zur Effizienzsteigerung und zur deutlichen Signalverstärkung bei DNA-Mikropunkt-Hybridisierungen (Microarrays) (5).



Protokoll DNA-Verdau mit Lambda Exonuklease:

Das Protokoll beschreibt den Verdau von 0,1 – 2 µg DNA oder von 3 – 6 µl PCR-Produkt (etwa 0,1 – 1 µg DNA). Einer der DNA-Stränge trägt eine 5'-Phosphatgruppe (wird abgebaut), der zweite DNA-Strang eine 5'-Hydroxylgruppe (bleibt erhalten).

Zusammenfügen:

DNA	0.1 – 1 µg
10x Puffer	1.25 µl
Lambda Exonuklease	5 U
H ₂ O, DNase frei	@ 12.5 µl

Für 15 – 30 min bei 37°C inkubieren.

Enzym durch Hitze inaktivieren (10 min, 75°C) oder DNA mittels Säulenreinigung (z.B. EURx PCR/DNA CleanUp Kit, Best.Nr. E3520) oder Ethanol-fällung sammeln.

Literatur:

1. Little, John W. (1981) *Gene Amplification and Analysis* 2, 135-145.
2. Chang, A.C.Y. et al. (1978), *Nature* 275, 617-624
3. Higuchi, R.G., Ochman, H. (1989) *Nucl. Acids Res.* 25, 17(14): 5865
4. Schwieger, F. und Tebbe C.C. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4870-4876
5. Brinker et al. (2010) *Biosens Bioelectron.* 26 (2): 898-902