



NcoI

Nco I

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2292-01	1 000 Einheiten
E2292-02	5 000 Einheiten

Reaktionstemperatur: 37°C

Inaktivierungstemperatur (20 min): 65°C

Prototyp: NcoI

Quelle: *Nocardia corallina*

Packungsinhalt:

- NcoI
- 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, EcoKI, 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 ONE
- 0.5 μl BSA [100x]
- 1-2 U NcoI (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 H₂O, 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):

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 4°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM beta-mercaptoethanol, 0.1% Tergitol™ TMN, 0,1 mM PMSF, 500 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.