

# NotI

## NotI

### Restriktions-Endonuklease

#### Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2295-01	500 Einheiten
E2295-02	2 500 Einheiten

Reaktionstemperatur: **37°C**

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

Prototyp: **NotI**

Quelle: *Nocardia otitidis-caviarum*

#### Packungsinhalt:

- NotI
  - 10x Reaktionspuffer High
  - BSA [100x]
- Wird als separate Komponente beigegefügt, um Ausfällungen im Reaktionspuffer vorzubeugen.
- Dilution Buffer # 3
- 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	% Relative Aktivität
Low	0
Medium	75
High	<u>100</u>
Acet	25

**Empfohlener Puffer: High**  
(oder kompatible Puffer anderer Hersteller)

#### DNA Methylierung:

Keine Inhibition: dam, dcm, EcoKI  
Inhibition (Blockiert): 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 High
  - 0.5 μl BSA [100x]
  - 1-2 U NotI (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 Ethanolgefällung.

#### 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 Ad-2 DNA vollständig zu schneiden. Die Inkubation wird bei 37°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 50 μl im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt.

#### Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

**1 x High Buffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 37°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol.

Zu ergänzen mit 100 μg/ml Rinderserumalbumin.

#### Kompatibilität des Reaktionspuffers:

Dieses Enzym ist vollständig kompatibel zu Puffersystemen anderer Hersteller. Bitte beachten Sie auch die entsprechenden Bedienungsanleitungen von Drittanbietern.

#### Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 22°C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.01 % [v/v] Triton™X-100, 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. Die Enzymspezifität wurde durch Ligation und erneute Restriktion bestätigt.