



SpeI

SpeI

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:

5'-A C T A G T-3'
3'-T G A T C A-5'

Best.Nr.	Größe
E2398-01	500 Einheiten
E2398-02	2 500 Einheiten

Reaktionstemperatur: **37°C**

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

Prototyp: **SpeI**

Quelle: *Sphaerotilus species*

Packungsinhalt:

- SpeI
- 10x Reaktionspuffer ONE
- 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.
- BSA [100x]
 - Wird als separate Komponente beigelegt, um Ausfällungen im Reaktionspuffer vorzubeugen.

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, CpG
Potentielle Inhibition: EcoKI

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 SpeI (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 Stunde 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 pUC19-MCS11 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 ONE Puffer.
Zu ergänzen mit 100 µg/ml Rinderserumalbumin.

Kompatibilität des Reaktionspuffers:

Dieses Enzym ist vollständig kompatibel zu Puffersystemen anderer Hersteller und kann in Doppelverdaus verwendet werden. Bitte beachten Sie auch die entsprechenden Bedienungsanleitungen von Drittanbietern.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 22°C), 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.2 % [v/v] Tergitol™ TMN, 500 µg/ml Rinderserumalbumin und 50 % [v/v] Glycerin.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, sowie auf unspezifische einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft.