



TspDTI

TspDTI

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2502-01	50 Einheiten
E2502-02	250 Einheiten

Reaktionstemperatur: 70°C

Inaktivierungstemperatur (20 min): --

Prototyp: TspDTI

Quelle: *Thermus species* DT

Hinweis 1: Rekombinant hergestellt aus einem *E. coli* - Stamm, der das *tspDTRI* - Gen aus *Thermus sp.* DT trägt.

Packungsinhalt:

- TspDTI
- 10x Reaktionspuffer TspDTI

Lagerungsbedingungen: Lagerung bei -20°C. Langfristige Aufbewahrung von Puffer-Aliquots bei -70°C.

Empfohlener Puffer: TspDTI

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)
 - 3 µl 10x Puffer TspDTI
 - 1-2 U TspDTI (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.
(@ 30 µl H₂O, DNA- und DNase frei)

Inkubation für 3 Stunden bei 70°C

Stoppen der Reaktion (Alternativen):

- (a) 1.2 µl EDTA pH 8.0 [0.5 M] zufügen, Endkonz. 20 mM *oder*
- (b) Hitzeinaktivierung
20 min bei 89°C (nicht empfohlen) *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.

Hinweis 1: Es wird empfohlen, die DNA vor dem Verdau aufzureinigen. Empfohlene Kits: PCR / DNA Clean UP Kit (E3520) oder Agarose Out DNA Kit (E3540).

Hinweis 2: Es wird empfohlen, nicht mehr als 2 Einheiten des Enzyms pro 30 µl Reaktion einzusetzen. Hingegen wird empfohlen, den Reaktionsansatz für länger als 1 Stunde zu inkubieren.

Hinweis 3: Starke Protein-DNA-Wechselwirkungen und Bindung des Enzyms an bereits geschnittene DNA können zu einem veränderten Laufverhalten der DNA im Gel und zu unerwarteten Bandenmustern führen. Deshalb sollte die Reaktion mit Stop-Lösung (enthält u.a. 0,2 % [w/v] SDS) vermischt und für 20 min bei 89°C denaturiert werden.

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 1 µg pUC19 DNA so zu schneiden, dass ein stabiles Bandenmuster erhalten wird. Die Inkubation wird bei 70°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 30 µl im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt.

Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

1 x TspDTI Buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.5 bei 25°C), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol +unterstützende Faktoren (1).

Achtung: Der Reaktionspuffer (Reaction Buffer) ist sehr temperaturempfindlich! Es sollte unbedingt vermieden werden, den Reaktionspuffer wiederholt aufzutauen und wieder einzufrieren. Der Puffer sollte insgesamt **nicht öfter als 3 mal** aufgetaut werden. Deswegen wird empfohlen, den Reaktionspuffer nach Erhalt in kleine Portionen zu aliquotieren und diese für **langfristige Aufbewahrung bei -70 °C** zu lagern. Eine Lagerung bei -20 °C sollte nur der kurzzeitigen Aufbewahrung dienen. Zum Auftauen sollte der Puffer **keinen höheren Temperaturen als 10°C** ausgesetzt werden.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 8.3 bei 25°C), 25 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 0.02% [v/v] Tergitol™ TMN, 0.02 % Tween™20, 0.02 % Igepal, 50 % [v/v] Glycerin.

Qualitätskontrolle:

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

Literatur:

1. Skowron, P.M., Majewski, J., Żylicz-Stachula, A., Rutkowska, S.M., Jaworowska, I. und Harasimowicz-Słowińska, R.I. (2003). Nucleic Acids Research 31, 14 e 74.