



DpnI

Dpn I

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2135-01	500 Einheiten
E2135-02	2 500 Einheiten

Reaktionstemperatur: 37°C

Inaktivierungstemperatur (20 min): 80°C

Prototyp: Dpnl

Quelle: *Diplococcus pneumoniae*
Rekombinant. Aufgereinigt aus einem *E.coli*-Stamm, der ein DpnI Gen aus *Diplococcus pneumoniae* trägt.

Packungsinhalt:
→ Dpnl
→ 10x Reaktionspuffer ONE

Hinweis 1: DpnI schneidet ausschließlich methylierte GATC Sequenzabschnitte.

Lagerungsbedingungen: Lagerung bei -20°C

Doppelverdau – Pufferkompatibilität:

Puffer ONE ist kompatibel mit den meisten EURx Restriktionsenzymen.

Die relative Aktivität des Enzyms DpnI in in DNA Polymerase Puffer der Enzyme Pfu (Best.Nr. E1114) und PfuPlus! (Best.Nr. E1118) beträgt etwa 50 %.

DpnI wird durch Zugabe von 100 µg/ml BSA weder beschleunigt noch gehemmt.

Empfohlener Puffer: ONE
(oder kompatible Puffer anderer Hersteller)

DNA Methylierung:
Keine Inhibition: Alle GATC Sequenzen mit N⁶-Methyladenin.

Standard-Protokoll für Restriktionsverdau:

Zusammenfügen folgender Reaktionskomponenten:

- 1-2 µg methylierte DNA
 - 3 µl 10x Puffer ONE
 - 1-2 U DpnI (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.
@ 30 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) 1.2 µl EDTA pH 8.0 [0.5 M] zufügen, Endkonz. 20 mM *oder*
- (b) Hitzeinaktivierung
20 min bei 80°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 %).

Hinweis 2: Wird ein anderer als der optimale Puffer (ONE Puffer) verwendet, ist es möglicherweise notwendig, erhöhte Enzymmengen einzusetzen, um einen vollständigen Verdau zu erzielen.

Hinweis 3: Um einen vollständigen Verdau der methylierten DNA-Vorlage (Template) bei zielgerichteter Mutagenese (site directed mutagenesis) sicherzustellen, wird empfohlen, 10 U des Enzyms in einem Reaktionsvolumen von 50 µl einzusetzen.

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 1 µg *dam* methylierte pBR322 Plasmid-DNA vollständig zu schneiden. Die Inkubation wird bei 37°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 30 µl im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt.

Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

1 x ONE Buffer

Restriktionsenzym - Kompatibilität:

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

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

10 mM Tris-HCl (pH 7.4 bei 4°C), 1 mM Dithiothreitol, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 200 µg/ml Rinderserumalbumin und 50 % [v/v] Glycerin.

Qualitätskontrolle:

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