



NheI

Nhe I

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:

5'-GCTAGC-3'
3'-CGATCG-5'

Best.Nr.	Größe
E2294-01	500 Einheiten
E2294-02	2 500 Einheiten

Reaktionstemperatur: 37°C

Inaktivierungstemperatur (20 min): 65°C

Prototyp: NheI

Quelle: *Neisseria mucosa heidelbergensis*

Hinweis 1: Recombinant. Aufgereinigt aus einem *E.coli* Stamm, der das NheI Gen aus *Neisseria mucosa heidelbergensis* trägt.

Packungsinhalt:

- NheI
- 10x Reaktionspuffer ONE
- BSA [100x]
 - Wird als separate Komponente beigelegt, um Ausfällungen im Reaktionspuffer vorzubeugen.
- Dilution Buffer # NheI
 - 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
Inhibition: CpG

Standard-Protokoll für Restriktionsverdau:

Zusammenfügen folgender Reaktionskomponenten:

- 1-2 µg DNA oder 10 µl PCR-Produkt (=~0.1-2 µg DNA)
- 2 µl 10x Puffer ONE
- 0.2 µl BSA [100x]
- 1-2 U NheI (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.
- @ 20 µl H₂O, DNA- und DNase frei

Inkubation für 1 h bei 37°C

Stoppen der Reaktion (Alternativen):

- (a) 0.8 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.

Hinweis 2: Um unspezifische Schnittmuster (Star Aktivität) zu vermeiden, empfiehlt es sich:

- nicht mehr als 100 Einheiten pro Reaktion einzusetzen;
- nicht länger als vier Stunden zu inkubieren.

Hinweis 3: Höhere Salzkonzentrationen als 50 mM inhibieren NheI Aktivität.

Nicht optimale Pufferbedingungen:

Um verminderter Enzymaktivität entgegenzuwirken, kann die Enzymmenge und / oder die Reaktionszeit erhöht werden (wenn die genannten Limitationen für Enzymeinheiten je µg DNA und für die Reaktionszeit nicht überschritten 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 20 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):

10 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 25°C), 1 mM Dithiothreitol, 250 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% [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.