



Uracil-N-Glykosylase

(UNG, *nicht thermolabil*)

Uracil-N-Glykosylase (*nicht thermolabil*)

Artikel Nr. **Größe**
E1250-01 200 Einheiten

Definition der Einheit: Eine Einheit des Enzyms katalysiert die Freisetzung von 1 Nanomol Uracil aus Uracil-markierter DNA innerhalb von 60 Minuten bei 37°C.

Inaktivierungstemperatur (10 min):
95°C

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C

Zum selektiven Abbau Uracil-markierter DNA Fragmente.

Beschreibung:

- Uracil-N-Glykosylase (UNG), rekombinant hergestellt aus *E. coli*, besitzt ein Molekulargewicht von 26 kDa.
- Das Enzym entfernt selektiv Uracil-Basen aus DNA. Es wird in PCR-Reaktionen eingesetzt, um Uracil-gelabelte, kontaminierende PCR-Fragmente aus vorherigen Reaktionen zu entfernen.
- Nach Entfernung von Uracil-Basen aus dU-gelabelten PCR Fragmenten verbleiben hitzelabile, depyrimidinierete Reste ("abasic sites"). Nach Erhitzung können DNA-Stränge entlang dieser labilen Stellen hydrolysieren.
- Um PCR-Fragmente entsprechend zu markieren, wird vor der Amplifikation dTTP ganz oder teilweise durch dUTP ersetzt. Nach erfolgter dU-Markierung ist sichergestellt, dass versehentlich in die Reaktionen verschleppte PCR-Produkte aus vorherigen PCR-Amplifikationen (etwa durch Aerosole oder kontaminierte Pipettenspitzen) selektiv durch UNG-Behandlung abgebaut werden können. Die eigentlich zu analysierende Vorlagen-DNA ("template DNA") wird durch UNG nicht angegriffen, da sie keine Uracil-Reste enthält.
- Die UNG-Behandlung beinhaltet einen einzigen Reaktionsschritt: Vor Beginn der eigentlichen PCR-Reaktion wird ein Inkubationsschritt für 2 Minuten bei 50°C durchgeführt.
- Da thermostabile DNA-Polymerasen bei 55°C deutliche Aktivität besitzen, muss sichergestellt werden, dass die Polymerase während der UNG Behandlung, also vor dem ersten Denaturierungsschritt, inaktiv ist. Die Verwendung einer "HotStart" DNA Polymerase ist zwingend notwendig. Ein geeignetes Enzym ist die "Perpetual Taq DNA Polymerase" (Best. Nr. E2700), deren aktives Zentrum vor der einleitenden Denaturierung durch einen spezifischen AntiTaq-Antikörper reversibel blockiert ist.
- Uracil-N-Glykosylase wird thermisch inaktiviert durch Inkubation bei 95°C innerhalb von 10 Minuten.

Lagerungspuffer:

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 20°C), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 50% [v/v] Glycerin.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, 3'-Exonuklease-, sowie auf unspezifische einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind, PAGE-Analysen zufolge, zu mehr als 95% rein.

UNG-Verdau, Protokoll:

1. Je 25 µl Reaktionsvolumen werden 0.25 Einheiten UNG zugefügt. Beispielsweise werden 0.25 U UNG für 25 µl Reaktionsvolumen benötigt, 0.5 U für 50 µl.
2. Uracil-Basen werden zu Beginn des PCR-Programms aus dUTP-markierten DNA-Fragmenten mittels Inkubation bei 50°C für 2 min entfernt.
3. Während des einleitenden Denaturierungsschrittes bei 95°C wird UNG durch Hitze inaktiviert. Eine Inkubation für mindestens 10 min bei 95°C ist erforderlich zur vollständigen Inaktivierung. Unmittelbar anschließend werden die weiteren Schritte des PCR Programmes durchgeführt.
4. UNG Aktivität kann durch partielle Zurückfaltung des Proteins teilweise wiederhergestellt werden. Sofern dUTP-supplementierte dNTP Mixe für die PCR-Reaktionen eingesetzt werden, sollten alle PCR-Schritte - einschließlich der Primerbindung ("Annealing") bei Temperaturen gleich oder höher als 55°C durchgeführt werden, um einem Abbau neu synthetisierter, UNG gelabelter PCR-Produkte entgegenzuwirken. Nach Beendigung der PCR-Amplifikation sollten die Proben entweder bei 4°C gekühlt und sofort auf ein Gel aufgetragen oder aber gefroren bei -20°C gelagert werden.