



HpaII

Hpa II

Restriktions-Endonuklease

Erkennungssequenz:



Best.Nr.	Größe
E2260-01	2 000 Einheiten
E2260-02	10 000 Einheiten

Reaktionstemperatur: 37°C

Inaktivierungstemperatur (20 min): 65°C

Prototyp: HpaII

Quelle: *Haemophilus parainfluenzae*

Packungsinhalt:

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

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 (Blockiert): CpG

Hinweis: HpaII schneidet unmethylierte DNA nicht. Dagegen schneidet das Isoschizomer MspI (Best.Nr. E2290) sowohl methylierte als auch unmethylierte Schnittstellen. Deshalb kann mittels vergleichender Restriktionsverdau mit beiden Enzymen, HpaII und MspI, bestimmt werden, ob eine Erkennungsstelle methyliert ist oder nicht.

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 HpaII (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 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) 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 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 %).

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 1 μg Lambda DNA vollständig zu schneiden. Die Inkubation wird bei 37°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 50 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):

20 mM Tris-HCl (pH 7.4 bei 22°C), 0.5 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 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. Die Enzymspezifität wurde durch Ligation und erneute Restriktion bestätigt.