

Endozyklase N15

Endozyklase N15

(*Protelomerase* *TelN*,
E. coli Phage N15)

Artikel Nr.	Größe
E4410-01	50 Einheiten
E4410-02	250 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 90% von 1 pmol Substrat-DNA vollständig zu schneiden. Die Inkubation wird bei 25°C für 1 Stunde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl im optimalen Reaktionspuffer durchgeführt.

Lagerung:

Lagerung bei -20°C.
Die Enzymaktivität ist für mindestens ein Jahr stabil.

Reaktionstemperatur:

25°C (empfohlen) – 30°C

Inaktivierung:

- DNA-Reinigung (EURx PCR / DNA Clean up Kit (E3520) oder 3 in 1 Basic DNA Kit (E3545))
- Hitzeinaktivierung + SDS

Das Enzym besitzt auch nach Ablauf der Reaktion hohe Affinität zu DNA. Gründliche Aufreinigung der DNA ist erforderlich.

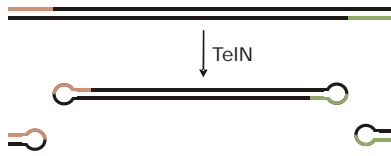


Abb. 1: TelN – Aktivität auf lineare DNA (e.g. PCR-Amplikons).

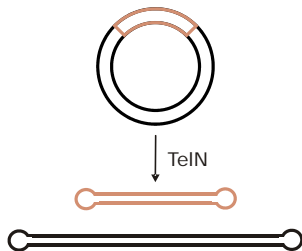


Fig. 2: TelN – Aktivität auf kovalent geschlossene DNA (z.B. Plasmid DNA).

Endozyklase N15 bildet an definierten Erkennungsstellen eines DNA Strangs Haarnadelschleifen und katalysiert die Bildung kovalenter Bindungen zwischen gegenüberliegenden 5'- und 3'-Enden.

Beschreibung:

- Endozyklase N15 (Protelomerase, "prokaryotische Telomerase", TelN) schneidet und religiert DNA Stränge an bestimmten Erkennungssequenzen und verbindet das 5'- und 3'- Ende komplementärer DNA-Stränge kovalent miteinander.
- Das Enzym arbeitet nach dem Prinzip einer Topoisomerase IB und einer Tyrosin-Rekombinase / Resolvase (Y-Rekombinase). Während typische Rekombinasen zwei unterschiedliche DNA-Abschnitte erkennen und miteinander verbinden, wirkt Endozyklase nur auf eine einzige Erkennungsstelle.
- Das Enzym schneidet eine 56 bp lange Telomer-Erkennungsstelle, ein nicht perfektes Palindrom, und fügt gegenüberliegende 5'- und 3'- DNA-Enden unter Ausbildung einer kovalent geschlossenen Haarnadelschleife zusammen (1). Kürzere Abschnitte der Erkennungssequenz (minimale Länge 36 bp) werden ebenfalls erkannt, aber die Reaktionseffizienz sinkt mit abnehmender Länge des Erkennungsabschnittes.
- Die kovalent über Haarnadelschleifen miteinander verbundenen 5'- und 3'- Enden von DNA Strängen sind resistent gegenüber dem Angriff von Exonukleasen, im Unterschied zu nukleasesensitiven DNA-Strängen mit offenen Enden, z.B. PCR-Produkten.
- Die Reaktion verläuft nicht vollständig, die Effizienz beträgt >90% (es verbleiben <10% nicht prozessierte DNA-Moleküle). Nicht-prozessierte DNA-Moleküle werden durch doppelstrangspezifische Exonukleasen abgebaut.
- Ermöglicht die Konversion von PCR-Produkten mit offenen Enden in kovalent geschlossene lineare Plasmide mit geschützten Enden (z.B. zur Erstellung linearer "bakterieller Chromosomen" (BACs).
- TelN-prozessierte lineare Plasmide sind funktionstüchtige genetische Elemente in Säugetierzellen. Solche linearen Plasmide eignen sich für die gezielte Einführung von Genen und Promotoren in Zellkulturen, während nicht zwingend benötigte - und möglicherweise problematische - genetische Elemente völlig ausgeklammert werden können (2). Lineare, exonuklease-resistente genetische Elemente können somit vollständig über in-vitro Technologien, wie z.B. PCR, bereitgestellt werden. Kultivierungsschritte in Bakterien entfallen - ein entscheidender Vorteil etwa für pharmazeutische Anwendungsprozesse, in denen jede Möglichkeit des Eintrages unerwünschten Materials aus lebenden Zellen von vorneherein ausgeschlossen werden soll.



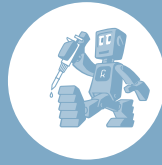
Fig. 3: Prozessierung eines 1 kb PCR-Amplikons in zwei 500 bp DNA-Tochterfragmente mit einseitig kovalent verbundenen Enden. Die Effizienz der Endozyklase N15 – Prozessierung ist stark abhängig von der Menge des eingesetzten Enzyms. Optimale Ergebnisse werden mit 1 U Endozyklase N15 je pmol Substrat erzielt.

Qualitätskontrolle:

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

Literatur:

1. Deneke J. et al. (2000) PNAS 97 (14): 7721–7726
2. Heinrich J. et al. (2002) J mol Med 80: 648–654
3. Ooi Y.-S. et al. (2008) Plasmid 59: 63–71



Endozyklase N15 PROTOKOLL

Protelomerase Protokoll zur Telomer-Prozessierung

Komponente	Finale Konzentration
DNA-Substrat	1 pmol
10x Endozyklase N15 Buffer	2 µl
Endozyklase N15	1 U
H ₂ O, nukleasefrei	auf 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

- Endozyklase als letzte Komponente zum Reaktionsmix zufügen.
- Für 30 min bis 1 Std. bei 25°C (empfohlen) oder bei 30°C inkubieren.
- DNA reinigen und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysieren.

Direkte Prozessierung in PCR-Puffer ohne Aufreinigung

Endozyklase ist kompatibel mit EURx PCR-Puffersystemen. Eine direkte Substratumsetzung im direkten Anschluss an PCR-Reaktionen ohne vorherige Aufreinigung ist bei Verwendung von EURx *Taq* DNA Polymerase (E2500) und Opti *Taq* DNA Polymerase (E2600) möglich. Nach Abschluss der PCR-Reaktion wird eine entsprechende Menge 10x Endozyklase-Puffer und anschließend 1 U Endozyklase zum PCR-Ansatz gegeben. Allerdings kann die Substratumsetzung unvollständig verlaufen, wenn auf eine DNA-Aufreinigung verzichtet wird. Beste Resultate werden erzielt, wenn DNA vor Endozyklase-Prozessierung aufgereinigt wird.

PCR-Primer ist kein Substrat für Endozyklase

Ein PCR-Primer mit Endozyklase-Erkennungssequenz ist kein Substrat für Endozyklase, da die palindromische Erkennungssequenz vor der Synthese des Gegenstranges während der PCR-Reaktion nicht als Doppelstrang vorliegt. Die Menge eingesetzten Primers spielt folglich keine Rolle bei der Berechnung der erforderlichen Enzymkonzentration pro Reaktion.

Formel zur Umrechnung von pmol nach µg dsDNA

$$dsDNA [pmol] = \frac{DNA\ Menge [\mu g]}{DNA\ Länge [bp] \cdot 616 [g\ mol^{-1}\ bp^{-1}]} \cdot \frac{10^{12} [pmol\ mol^{-1}]}{10^6 [\mu g\ g^{-1}]}$$

Formel zur Umrechnung von µg nach pmol dsDNA

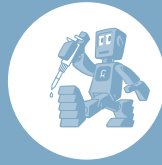
$$dsDNA\ Menge [\mu g] = dsDNA [pmol] \cdot 616 [g\ mol^{-1}\ bp^{-1}] \cdot dsDNA\ Länge [bp] \cdot \frac{10^6 [\mu g\ g^{-1}]}{10^{12} [pmol\ mol^{-1}]}$$

1 pmol dsDNA =	100 bp	61,6 ng
	500 bp	308 ng
	1000 bp	616 ng
	2500 bp	1,54 µg
	10000 bp	6,16 µg
	20000 bp	12,32 µg

Eine Erkennungssequenz per DNA-Molekül: 1 pmol DNA = 1 pmol DNA-Substrat,
Zwei Erkennungssequenzen per DNA-Molekül: 1 pmol DNA = 2 pmol DNA-Substrat (0.5 pmol DNA = 1 pmol DNA Substrat), etc.

Hinweise:

1. Endozyklase besitzt eine hohe Affinität gegenüber der Ziel-DNA, da zur natürlichen Funktion des Proteins der Schutz der Haarnadelschleifen durch nicht kovalente Bindung an die DNA-Erkennungsstelle nach erfolgter Reaktion gehört. Aus diesem Grund muss die DNA nach erfolgter Reaktion gründlich aufgereinigt werden. Hitze-Denaturierung langt nicht aus, um das Enzym von DNA zu trennen, die Zugabe von Detergenzien wie SDS ist zwingend erforderlich, ggf. mit nachfolgender Phenol-Chloroform Extraktion. Eine schnelle, bequeme, gründliche und zeitsparende Alternative zur Trennung von Ziel-DNA von Endozyklase N15 ist die Aufreinigung über das EURx PCR / DNA Clean Up Kit (Best. Nr. E3520) oder über das 3 in 1 Basic DNA Kit (Best. Nr. E3545).
2. Die Reaktion verläuft unter Standard-Reaktionsbedingungen schnell und ohne messbare Verzögerung ("lag"). >90 % des schneidfähigen Substrates wird innerhalb von 5 - 10 Minuten umgesetzt.
3. Wenn die Reaktion nicht mit dem beigefügten Puffer durchgeführt wird:
 - Telomerase-Resolvase Aktivität setzt die Anwesenheit bivalenter Kationen in einer Konzentration von 5 - 10 mM zwingend voraus, beispielsweise Ca²⁺, oder Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, oder Erdalkalimetall-Ionen, bevorzugt mit großem Ionen-Radius (1).
 - Die empfohlene Ionenkonzentration ist 20 mM. Hohe Konzentrationen bestimmter Anionen (Chlorid >200 mM, Phosphat >50 mM) inhibieren die enzymatische Aktivität komplett (1).
 - Das pH-Optimum ist 7.5. Gute Reaktionseffizienzen werden in einem Bereich zwischen pH 6 - 10 erhalten (1).



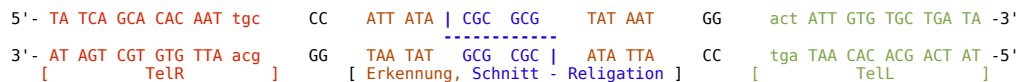
Endozyklase N15

PROZESSIERUNG UND PRIMER-DESIGN

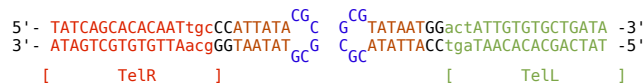
Endozyklase – Prozessierung von Plasmid- und von genomischer DNA

Endozyklase N15 arbeitet als Dimer. Das Enzym bindet an eine – zwingend erforderliche – 14 bp lange Erkennungssequenz und schneidet an beiden DNA-Strängen um 6 bp versetzt (1). Die Sequenzabschnitte TeIR und TeIL werden für die Endozyklase-Substrat-Bindung benötigt. Beide letztgenannten Abschnitte können, wenn erforderlich, verkürzt werden, wobei die minimale Länge des gesamten DNA-Abschnittes 36 bp nicht unterschreiten darf. Mit zunehmender Verkürzung der Abschnitte TeIR und TeIN nimmt die Effizienz der Reaktion allerdings graduell ab (1).

a) Situation vor Schnitt und Religation einer in genomischer / Plasmid DNA eingebetteten Zielsequenz (1):



b) Situation nach Schnitt und Religation der Zielsequenz (1):



PCR-Primer Design zur Einführung einer Endozyklase – Erkennungsstelle

Der genspezifische Primer wird am 5'-Ende um die folgend aufgeführte, nicht perfekt palindromische Sequenz erweitert, um eine Endozyklase-Erkennungsstelle in den PCR-Primer zu integrieren:



Gegenüber der nativen 56 bp langen Erkennungssequenz ist die vorliegende Sequenz auf 46 bp verkürzt. Dennoch wird diese Erkennungssequenz mit hoher Effizienz erkannt und prozessiert. Schnitt und Religation erfolgt zwischen der Endozyklase-Erkennungssequenz des Primers und dem neu synthetisierten, zum Primer komplementären gegenüberliegenden DNA-Strang. Während der Prozessierung durch Endozyklase wird die palindromische Sequenz innerhalb der Erkennungsstelle geschnitten und beide DNA-Stränge des PCR-Produktes werden unter Bildung geschlossener Haarnadelschleifen kovalent aneinander gebunden. Die 5' endständigen Basen 1 – 23 des Primers (vom 5'-Terminus aus gerechnet) – und damit auch eventuell vorhandene 5'-Markierungen – werden abgeschnitten und an das 3'-Ende dieses Abschnittes werden die 29 3'-terminalen Basen des gegenüberliegenden Stranges angehängt. Somit wird durch Endozyklase-Prozessierung ein 52 nt bzw. 26 bp langer DNA-Abschnitt entfernt.

Primer-Design, allgemeine Erwägungen

Nicht-paarende 5'- und 3'- Enden: Um der 5'-Exonuklease-Aktivität von *Taq* DNA Polymerase entgegenzuwirken, dürfen die Exonuklease-Erkennungssequenz flankierenden Nukleotide nicht paaren. Im aufgeführten Beispiel wurden die Abschnitte 5'-AAA... und ...AAA-3' gewählt, aber diese kurzen Abschnitte können beliebig gewählt werden, solange sie nicht paaren. Es könnte beispielsweise elegant sein, den Abschnitt ...AAA-3' durch einen genspezifischen Abschnitt zu ersetzen, um die Gesamtlänge des Primers möglichst kurz zu halten. In diesem Falle muss der 5'-Abschnitt des Primers entsprechend angepasst werden.

Eingebaute Unterbrechungen des Palindroms ("Mismatches"): Die vorgeschlagene, nicht-perfekt palindromische Primer-Erweiterung enthält einen kurzen, absichtlich fehlpaarenden Abschnitt. Dieser nicht perfekt paarende Abschnitt wird von Endozyklase toleriert. *Taq* DNA Polymerase besitzt eine nur gering ausgeprägte Fähigkeit, einen bereits bestehenden DNA-Strang zu verdrängen ("strand-displacement"). Deswegen kann *Taq* DNA Polymerase nur durch kurze haarnadelähnliche Sequenzabschnitte synthetisieren, längere, kontinuierlich paarende Abschnitte führen zu Schwierigkeiten bei der Amplifikation. Außerdem wirkt der nicht paarende Abschnitt weiteren PCR-Artefakten wie Primer-Dimeren / -Multimeren entgegen, die durch lange, selbst-komplementäre Sequenzabschnitte begünstigt werden.

5'-Markierungen: Der Verlauf der Reaktionen und der Erfolg der Prozessierung kann kontrolliert werden, indem eine Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende des Primers angebracht wird. Nach Schnitt und Religation durch Endozyklase wird die 5'-Markierung zusammen mit den 5'-terminalen Nukleotiden vom prozessierten Produkt abgetrennt. Das 5'-Label migriert in der Agarose-Gelelektrophorese in Nähe der Primer-Front. In der Praxis hat sich ein 5'-Fluoreszin-Label bewährt, da die Markierung PCR-stabil ist und durch Anregung bei 494 nm (blaues Licht oder UV-Illumination) bei 521 nm (grünes Licht) nachgewiesen werden kann.

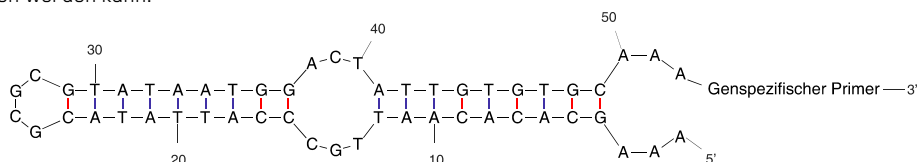


Abb. 4: Sekundärstruktur des Endozyklase-PCR-Primers (bei Raumtemperatur unter Reaktionsbedingungen).

Die Berechnung der Sekundärstruktur erfolgte mit dem Programm mfold (Markham N. R., Zuker, M. (2008) In: Keith, J. M., editor, Bioinformatics, Volume II; 453 Meth mol Biol, Ch 1, 3-31).