



# Exonuklease I

*Escherichia coli*

## **Exonuklease I**

Exo I, *Escherichia coli*

Artikel Nr.	Größe
E1150-01	4.000 Einheiten
E1150-02	20.000 Einheiten

### **Definition der Einheit:**

Eine Einheit ist die Menge an Enzym, die in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl innerhalb von 30 Minuten bei 37°C die Freisetzung von 10 nmol säurelöslicher Nukleotide katalysiert.

### **Lagerbedingungen:**

Lagerung bei -20°

### **Inaktivierung des Enzyms:**

15 min @ 80°C

### **Qualitätskontrolle:**

Alle Chargen werden auf kontaminierende RNase, Endonuklease-, sowie auf unspezifische doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft.

**Katalysiert den Abbau von Nukleotiden aus einzelsträngiger DNA (ssDNA) in 3' → 5'- Richtung.**

### **Anwendungsgebiete:**

- Entfernung einzelsträngiger DNA (ssDNA), auch von Oligonukleotiden, aus Reaktionsansätzen.
- Greift weder doppelsträngige DNA noch RNA an.
- Erfordert Magnesiumionen und frei zugängliche 3'-Enden von ssDNA (3'-Hydroxyltermini).
- Breite Aktivität unter einer Vielzahl verschiedenartiger Pufferbedingungen. In der Regel kann das Enzym direkt zu Reaktionsmischungen zugefügt werden.

### **PCR-Aufreinigungsprotokoll (Exonuklease I - Aufreinigung von PCR-Produkten vor Sequenzierung)**

Die folgenden Reaktionskomponenten werden gemischt:

25-50 µl PCR-Produkt (direkt nach PCR-Amplifikation)  
0.5 µl (10 U) Exonuklease I  
1 µl 5 U Polar BAP (Best. Nr. E1027)

Inkubation für 15 min bei 37°C  
Hitzeinaktivierung für 15 min bei 80°C

Bis zu 5 µl des Oligonukleotid-befreiten PCR-Produktes kann direkt, ohne weitere Aufreinigung, zur Sequenzierung eingesetzt werden. Die Benutzung von PCR-Produkten ohne jegliche unspezifische Nebenprodukte wird dringend empfohlen. Für die Durchführung dieses Protokolls sind keine speziellen Puffer erforderlich.

### **10x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):**

670 mM Glyzin-KOH (pH 9.5 @ 25°C), 100 mM 2-Mercaptoethanol, 67 mM MgCl<sub>2</sub>.

### **Lagerungspuffer (Storage Buffer):**

10 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 25°C), 5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerol.

### **Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:**

67 mM Glyzin-KOH (pH 9.5 @ 25°C), 10 mM 2-mercaptoethanol, 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.17 mg/ml einzelsträngige, [<sup>3</sup>H]-gelabelte DNA. Inkubation bei 37°C für 10 min in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

### **Literatur:**

1. Lehman und Nussbaum (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2628.
2. Kushner, S.R. et al. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 824.
3. Kushner, S.R. et al. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1366.
4. Goldmark und Linn (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 184.
5. Rosamond et al. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 8646
6. Werle et al. (1994) *Nuc. Acids Research* 22(20): 4354-4355