



Thermolabile Uracil-N-Glykosylase

Uracil-N-Glykosylase (UNG, *thermolabil*)

Artikel Nr.	Größe
E1251-01	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 (5 min):
50°C

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, 3'-Exonuklease-, sowie auf unspezifische einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind, SDS-PAGE-Analysen zufolge, zu mehr als 98% rein.

Zum selektiven Abbau Uracil-markierter DNA Fragmente.

Beschreibung:

- Thermolabile Uracil-N-Glykosylase (UNG), rekombinant hergestellt aus *E.coli*, besitzt ein Molekulargewicht von 27 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, genauer vor dem einleitenden Denaturierungsschritt, wird ein Inkubationsschritt für 2 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 37°C durchgeführt.
- Da *Taq* DNA Polymerase bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C deutliche Aktivität besitzt, 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 Anti*Taq*-Antikörper reversibel blockiert ist. Es ist nicht möglich, den UNG-Verdau auf Eis unter Verwendung einer Nicht-"HotStart" *Taq* Enzymformulierung durchzuführen.
- Thermolabile Uracil-N-Glykosylase wird thermisch irreversibel inaktiviert durch Inkubation bei 37°C innerhalb von 5 Minuten. Im Gegensatz zu nicht-thermolabiler UNG (Best. Nr. E1250) wird keine UNG-Aktivität durch teilweise Zurückfaltung bei niedrigen Temperaturen rekonstituiert.

Lagerungspuffer:

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

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 während eines Inkubationsschrittes bei Raumtemperatur entfernt. Ein dedizierter Inkubationsschritt für 2 Minuten bei 37°C kann vor dem einleitenden Denaturierungsschritt durchgeführt werden. Meistens reicht aber die Zeitspanne während des Zusammenfügens der PCR-Reaktion schon aus, um den UNG-Verdau vollständig abzuschließen.
3. Während des einleitenden Denaturierungsschrittes bei 95°C wird UNG vollständig und irreversibel durch Hitze inaktiviert.
4. Unmittelbar anschließend werden die weiteren Schritte des PCR-Programms durchgeführt.