

OMNI Nuklease

(Rekombinant)

OMNI Nuklease
(Rekombinant aus *E.coli* mit *nucA*
Gen aus *Serratia marcescens*)

Artikel Nr.	Größe
E1120-01	20 000 Einheiten
E1120-02	100 000 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Unit ist die Menge des Enzyms, die eine Abnahme der A260-Extinktion (delta A260) von 1.0 innerhalb von 30 Minuten bei 37°C bewirkt. Das entspricht dem kompletten Abbau von 37 µg Heringssperma-DNA.

Lagerbedingungen: Lagerung bei -20°C (nicht bei -80°C lagern)

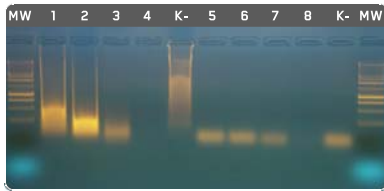


Abb. 1: Aktivitätstest OMNI Nuklease, 1% [w/v] Agarose Gel. Spuren 1-4: 37 µg Heringssperma-DNA; Spuren 5-8: Torula Hefe-RNA Typ VI, jeweils mit steigenden Mengen von OMNI Nuklease-Einheiten (U, units) in Spuren 1-4 und 5-8. K-: Kontrollspuren ohne Zugabe von OMNI Nuklease. MW: Molekulargewichts-Referenzen. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten.

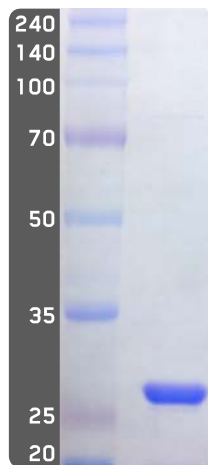


Abb. 2: Reinheitskontrolle OMNI Nuklease auf einem 12% PAGE-Protein-Gel. Rechte Spur: 5 µg OMNI Nuklease, rechte Spur: Molekulargewichts-Marker (Nummern sind Größenangaben in kDa).

Anwendungen:

- Reduktion der Viskosität in Zellextrakten aus Bakterien, Hefen und Säugerzellen.
- Probenvorbereitung für 2D-Protein-Gelelektrophorese.
- Entfernung von kontaminierenden Nucleinsäuren aus Proteinpräparationen.
- Aktiv in vielen unterschiedlichen Pufferbedingungen.

Beschreibung:

- OMNI Nuklease ist sehr stabil. Das Enzym kann verdünnt werden in 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 @ 25°C), 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und bleibt unter diesen Bedingungen bei +4°C ohne Aktivitätsverlust stabil für mehrere Tage.
- Besitzt eine breite pH-Toleranz (zwischen pH 6 und 10) und ist in einem weiten Temperaturspektrum aktiv (0- 44°C).
- OMNI Nuklease sollte nicht für die Reinigung von Proteinen verwendet werden, die komplett nuklease-frei sein sollen. Allerdings kann das Enzym mittels chromatographischer Methoden vom Zielprotein getrennt werden, beispielsweise durch Anionen- / Kationen- Austausch, durch Ausnutzung hydrophober Wechselwirkungen oder durch Größenausschluss. OMNI Nuklease bindet nicht an Ni-NTA Matrices.
- OMNI Nuklease wird teilweise inhibiert (ca. 50% Aktivitätsverlust) durch
 - hohe Konzentrationen monovalenter Kationen (Na⁺, K⁺, ...) > 50 mM
 - Phosphat-Konzentrationen > 20 mM
 - Ammoniumsulfat-Konzentrationen > 25 mM.

Benutzungsanleitung / Protokoll:

Entfernung von Nucleinsäuren:

Substrat DNA / RNA wird im Assay-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA) verdünnt auf eine Konzentration von 2 µg/µl). Mehrere Reaktionsansätze des Substrates werden mit jeweils unterschiedlichen Mengen an OMNI Nuklease bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Per Gelelektrophorese wird der Reaktionsverlauf analysiert. Um kleine Mengen an kontaminierender DNA / RNA zu entfernen, werden 2 U Nuklease zu 1 µg Nucleinsäure zugefügt und die Inkubationszeit auf 24 Stunden verlängert.

Verminderung der Viskosität:

Die empfohlene Menge an OMNI Nuklease beträgt 25 U je ml Lysat. Das Verhältnis sollte etwa 1:1 bis 1:10 [w/v] betragen, also etwa 1-10 ml Lysepuffer (ml) per 1 g Zellgewicht (Gramm).

1. 5 g *E. coli* (Nassgewicht) wird resuspendiert in 25 ml Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA (sowie, falls erforderlich, Lysozym, Protease Inhibitoren).
2. MgCl₂ zu einer finalen Konzentration von 5 mM zufügen.
3. 2 µl (500 U) OMNI Nuklease zufügen.
4. Zellaufschlussmethode der Wahl verwenden (z.B. Ultraschall, French press)
5. Nach Zentrifugation (~12.000 rpm, 11.000 x g) für 30 min bei 4°C sollte das Zellysate als klarer Überstand entnommen werden.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 50% Glycerin [v/v].

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

50 mM Tris-HCl (pH 8,0, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, 37 µg Heringssperma-DNA. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten in einem Reaktionsvolumen von 30 µl.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf kontaminierende Protease-Aktivität untersucht.

Literatur:

1. Nestle M., Roberts W.K., (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5219-5225
2. Friedhoff P., Gimadutdinow O., (1994) *Protein Expr.Purif.* 5, 37-43
3. Meiss G., Friedhoff P., (1995) *Biochemistry* 34, 11979-11988