

# Uracil-DNA Glycosylase, Hitze-labil

Aus dem marinen Bakterium BMTU 3346, rekombinant in *E. coli*

Best. Nr. 1 775 367 100 U

Best. Nr. 1 775 375 500 U

Version 3, Jan. 2003

Stabil bei -15 bis -25° C

## Produktbeschreibung

**Konzentration** 1 U/ $\mu$ l

**Definition der Einheit** Eine "unit" ist definiert als die Menge Uracil-DNA Glycosylase, die erforderlich ist, um 1  $\mu$ g gereinigte, Uracil-enthaltende Einzelstrang-DNA (Bakteriophage M13, gezüchtet in *E. coli* CJ236 dut<sup>-</sup>ung<sup>-</sup>) bei 37° C in 60 min vollständig abzubauen.

Eine Lindahl "unit" (1) ist die Menge Enzym, die erforderlich ist, um 1  $\mu$ mol Uracil bei 37° C in 1 Minute freizusetzen. Eine Lindahl "unit" ist vergleichbar zu 520 000 Einheiten basierend auf der oben angegebenen Definition.

**Lagerpuffer** 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (4°C), 0,1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 50% Glycerin (v/v), 0,5% Nonidet<sup>1</sup>(v/v), 0,5% Tween<sup>2</sup> 20 (v/v).

**Spezifität** Uracil-DNA Glycosylasen hydrolysieren Uracil-glycosidische Bindungen in Einzel- und Doppelstrang-DNA, wobei sie Uracil abspalten und dadurch Alkali-empfindliche Bindungen in der DNA (2) zurücklassen. Das Enzym ist aktiv an Einzel- und Doppelstrang-DNA, dagegen aber inaktiv an RNA und nativer, Uracil-freier DNA. Uracil-DNA Glycosylase benötigt keine Metall-Ionen und ist deshalb vollständig aktiv in der Gegenwart von EDTA.

**Stabilität** -15 bis -25°C stabil bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum.

**Hinweis:** In Pufferlösungen ohne Stabilisator (z.B. PCR Puffer: 10 mM Tris HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) wird das Enzym bei erhöhter Temperatur schnell inaktiviert (3).

## Anwendung

Uracil-DNA Glycosylase, Hitze-labil, wird verwendet, um DNA an Desoxyuridylat-Resten zu spalten. Die daraus resultierenden abasischen Stellen können dann durch Alkali-Behandlung oder hohe Temperaturen gespalten werden. Ebenso können Endonucleasen verwendet werden, die spezifisch an abasischen Stellen spalten, wie z.B. T4-Endonuclease.

Uracil enthaltende DNA kann durch *in vitro* Methoden erzeugt werden (2, 4). Je nachdem wie diese DNA erzeugt wurde, kann durch Uracil-DNA Glycosylase eine allgemeine, Strang-spezifische oder Basen-spezifische Spaltung erreicht werden.

Das Enzym wird außerdem verwendet, um die Effizienz von Methoden zur gerichteten Mutagenese zu erhöhen (5) oder, um hochmarkierte Oligonucleotid-Sonden herzustellen (6).

Uracil-DNA Glycosylase wird in Verbindung mit dUTP\* eingesetzt, um in der PCR Kontaminationen durch vorausgegangene Amplifikationen zu eliminieren (7, 8). Zu diesem Zweck muß dTTP im Amplifikationsansatz durch dUTP ersetzt werden, so daß die entstehenden Produkte gegenüber UNG (Uracil-DNA Glycosylase)-Behandlung empfindlich werden. Anschließende PCR Reaktionen werden vor dem Start der Reaktion mit UNG behandelt, um Uracil-enthaltende DNA abzubauen. Natürliche DNA enthält kein Uracil, so daß die eigentliche Probe vollständig intakt bleibt.

Normalerweise wird für diese Methode 1 U Uracil-DNA Glycosylase verwendet. Nach 10 minütiger Inkubation bei 20°C wird UNG vor dem Start der eigentlichen PCR durch eine 2 min Hitzebehandlung bei 95° C inaktiviert.

**Hinweis:** Im Gegensatz zu Uracil-DNA Glycosylase, Hitze-labil, wird das Enzym aus *E. coli* erst durch 10 min Erhitzen auf 95° C inaktiviert.

Uracil-DNA Glycosylase aus dem marinen Bakterium BMTU 3346 wird wesentlich schneller inaktiviert als das vergleichbare Enzym aus *E. coli* (3). Es wurde beschrieben, daß UNG aus *E. coli* partiell aktiv bleibt (oder nach der PCR reaktiviert wird), was zu einem Abbau der Uracil-enthaltenden PCR-Produkte während oder nach der PCR führen kann (9). Dies kann verhindert werden, indem die PCR-Produkte sofort analysiert oder bei Temperaturen von 70°C gelagert werden.

Im Gegensatz zu dem Enzym aus *E. coli* wird Hitze-labile UNG während der PCR schneller und stärker inaktiviert, so daß kein Abbau Uracil-enthaltender PCR-Produkte während einiger Stunden Lagerung bei 2-8°C zu beobachten ist (3). Deshalb ist es nicht notwendig, das PCR-Produkt unmittelbar nach der Amplifikation einzufrieren oder den Reaktionsansatz bei 70°C zu lagern. Diese Vorsichtsmaßnahmen sind aber empfehlenswert, wenn eine Lagerung des PCR-Produktes über einige Stunden hinaus erfolgen soll.

## Protokoll

In der folgenden Tabelle finden Sie ein Kurzprotokoll zur PCR-Kontaminationsvermeidung:

Schritt	Aktion
1	In allen Amplifikations-Reaktionen dTTP durch 200 $\mu$ M - 600 $\mu$ M dUTP ersetzen. <b>Hinweis:</b> Bei Verwendung von 600 $\mu$ M dUTP sollte die MgCl <sub>2</sub> Konzentration auf 2,5 mM erhöht werden
2	1 U Uracil-DNA Glycosylase vor dem Start der PCR in den Reaktionsmix pipettieren.
3	10 min bei 15-25°C inkubieren.
4	UNG bei 95°C 2 min inaktivieren
5	Nach der PCR das Produkt bis zu einigen Stunden bei 2-8°C lagern. Für längere Lagerung bei -15 bis -25°C einfrieren...

## Qualitätskontrolle

<b>Abwesenheit von Endonucleasen</b>	1 µg Uracil-freie M13mp18ss-DNA oder Uracil-freies Plasmid pBR322 wird in 50 µl SuRE/Cut Puffer L mit Uracil-DNA Glycosylase 16 h bei 37° C inkubiert. Die Menge Enzym, die keinen Abbau zeigt, ist im Einzelnen aufgeführt unter "Endo" oder "Nick".
<b>Abwesenheit von RNases</b>	5 µg MS2-RNA wird mit Uracil-DNA Glycosylase 1 Stunde bei 37°C in 50 µl SuRE/Cut Puffer L inkubiert. Die Menge Enzym, die keine RNase Aktivität zeigt, ist im Einzelnen aufgeführt unter "RNase".
<b>Abwesenheit von Exonucleasen</b>	1 µg [ <sup>3</sup> H] markierte DNA wird mit Uracil-DNA Glycosylase 4 h bei 37° C in 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Di-thioerythrit, pH 7,5 inkubiert. Die Menge Enzym, die weniger als < 0,1% Radioaktivität freisetzt, ist aufgeführt unter "Exo".
<b>PCR „carry-over“ Prevention</b>	"Carry-over" Aktivität wird getestet durch Zugabe von 10 <sup>5</sup> dUTP-enthaltende PCR-Produkte vor der Amplifikation. Nach 10 min Behandlung mit 1 U Uracil-DNA Glycosylase bei 20° C darf keine Reamplifikation mehr möglich sein.

## Verwandte Produkte

Produkt	Packungsgröße	Best. Nr.
PCR Core Kit <sup>PLUS</sup>	1 kit (50 PCR and UNG reactions)	1 585 541
PCR Nucleotide Mix <sup>PLUS</sup>	2 x 100 µl	1 888 412
Uracil-DNA Glycosylase	25 units 100 units	1 269 062 1 444 646
dATP, PCR-Grade	25 µmol 125 µmol	1 934 511 1 969 013
dCTP, PCR-Grade	25 µmol 125 µmol	1 934 520 1 969 021
dGTP, PCR-Grade	25 µmol 125 µmol	1 934 538 1 969 030
dTTP, PCR-Grade	25 µmol 125 µmol	1 934 546 1 969 048
dUTP, PCR-Grade	25 µmol 125 µmol	1 934 554 1 969 056
Thin-walled PCR Tubes, DNase and RNase free	200 µl 500 µl	1 667 041 1 667 050
Aerosol-resistant Pipette Tips	960 tips (0.1-10 µl) 1 000 tips (0.5-10 µl) 960 tips (2-20 µl) 960 tips (40-200 µl)	1 667 068 1 667 076 1 667 084 1 667 173

## Literatur

- 1 Lindahl, T. et al. (1978) *J. Biol. Chem.* **252**, 3286 - 3294.
- 2 Duncan, B. K. (1981) *iDNA glycosylases* in Boyer (ed.) *The enzymes*, Academic Press, N.Y. pp. 565 - 586.
- 3 Sobek, H. et al., (1996) *FEBS Letters* **388**, 1-4.
- 4 Stuart, G. R. & Chambers, R. W. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 7451 - 7462.
- 5 Kunkel, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488 - 492.
- 6 Craig, R.K. et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 4605 - 4610.
- 7 Kwok, S. & Higuchi, R. (1989) *Nature* **339**, 237.
- 8 Longo, M.C., Berninger, M.S. & Hartely, J.L. (1990) *Gene* **93**, 125.
- 9 Thornton, Ch.G. et al. (1992) *BioTechniques* **13(2)**, 180 - 183.
- 10 Jaeger, S. et al. (2000) *Extremophiles* **4(2)**, 115-122.

<sup>1)</sup>Nonidet ist ein Warenzeichen der Shell International Petroleum Company Limited, U.K.

<sup>2)</sup>Tween ist ein Warenzeichen der ICI Americas Inc., USA.

\* zu beziehen von Roche Applied Science

[www.roche-applied-science.com/pack-insert/1775367a.pdf](http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1775367a.pdf)

Please visit our new Online Technical Support Site/



Roche Diagnostics GmbH  
Roche Applied Science  
Nonnenwald 2  
82372 Penzberg  
Germany