

## 蛋白酶 K 溶液

### 产品简介

蛋白酶 K ( Proteinase K ) , 相对分子量约为 29.3 kDa, 是一种切割活性较广的丝氨酸蛋白酶。可切割脂族氨基酸和芳香族氨基酸的羧基端肽键, 应用广泛, 可用于制备脉冲电泳的染色体 DNA, 蛋白质印迹以及去除 DNA 和 RNA 制备中的核酸酶等实验, 蛋白酶 K 的一般工作浓度是 50—100 $\mu$ g /ml。因蛋白酶 K 在变性剂如 SDS ( 1% ) 中可提高其活性, 所以在使用中, 常根据所用缓冲液是否含有 SDS、尿素、pH、温度等因素确定具体的工作浓度。蛋白酶 K 在较广的 pH 范围内 ( pH 4-12.5 ) 均有活性。

蛋白酶 K 有两个  $Ca^{2+}$  结合位点, 它们离酶的活性中心有一定距离, 与催化机理并无直接关系。然而, 如果从该酶中除去  $Ca^{2+}$ , 由于出现远程的结构变化, 催化活性将丧失 80% 左右, 但其剩余活性通常已足以降解在一般情况下污染核酸制品的蛋白质。所以, 蛋白酶 k 消化过程中通常也加入 EDTA ( 以抑制依赖于  $Mg^{2+}$  的核酸酶的作用 )。但是, 如果要消化对蛋白酶 k 具有较强耐性的蛋白, 如角蛋白一类, 则可能需要使用含有 1mmol/l  $Ca^{2+}$  而不含 EDTA 的缓冲液。在消化完毕后、纯化核酸前要加入 EGTA ( pH8.0 ) 至终浓度为 2mmol/l, 以螯合  $Ca^{2+}$ 。

### 运输和储存

冰袋运输, -20  $^{\circ}C$  保存, 可以保存 12 个月。避免反复冻融。

### 使用方法

1. 配制蛋白酶 K 溶液: 一般以 20mg/ml 浓度配制蛋白酶 K 溶液。将 200mg 的蛋白酶 K 加入到 9.5ml dd 水中, 轻轻摇动, 直至蛋白酶 K 完全溶解。不要涡旋混合。加水定容到 10ml, 然后分装成小份贮存于 -20 $^{\circ}C$ 。

2. 根据终浓度 50—100 $\mu$ g /ml, 吸取适量蛋白酶 K 溶液, 到待消化样品中, 孵育温度为 55 至 65 $^{\circ}C$ , 理想孵育温度为 58 $^{\circ}C$ , 孵育时间为 15 分钟至 48 小时; 理想孵育时间为 2 小时。推荐反应缓冲液: 50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM  $CaCl_2$ 。

### 注意事项

蛋白酶 K 在原位杂交技术中通常用于杂交前的样品处理, 它具有消化包围靶 DNA 蛋白质的作用, 能增加探针与靶核酸结合的机会, 提高杂交信号。但蛋白酶 K 的浓度过高、消化时间过长或孵育温度过高时, 都会对细胞的结构有一定的破坏, 导致组织切片的脱落, 细胞核的消失, 从而影响杂交结果。EDTA 缓冲液可以替代蛋白酶 K 的作用, 解决上述出现的问题, 并能达到理想的染色效果。