蛋白酶 K 溶液

成为世界一流的特种酶产品与服务提供商
info@hzymes.com
www.hzymes.com

说明书版本号: V1.1

产品概述

蛋白酶 K 是一种丝氨酸蛋白酶，具有高效的酶活性和广泛的底物特异性，能优先分解与疏水性氨基酸、含硫氨基酸、芳香族氨基酸 C 末端邻接的酯键和肽键，常被用于降解蛋白生产短肽。它具有丝氨酸蛋白酶类所特有的典型催化三联体 Asp^{39}-His^{69}-Ser^{224}特征并且活性中心周围有两个 Ca^{2+}结合位点增加其稳定性，使其在更广泛的条件下保持较高的酶活力。

产品信息

产品名称	货号	规格
蛋白酶 K 溶液	HH4512-01	1 mL
	HH4512-02	5 mL
	HH4512-03	100 mL
	HH4512-04	1000 mL

技术指标

外观	无色至浅棕色液体
比活性	≥800 U/mL
蛋白浓度	≥20 mg/mL
脱氧核糖核酸酶活性	未检测到脱氧核糖核酸酶活性
核糖核酸酶活性	未检测到核糖核酸酶活性
切口酶活性	未检测到切口酶活性

酶学性质

来源	林伯氏白色念球菌(Tritirachium album)	
分类	EC 3.4.21.64	
分子量	29 kDa (SDS-PAGE)	
等电点	7.81	
最适 pH	7.0-12.0 都具有较高活性	图 1
最适温度	65 ℃	图 2
pH 稳定性	pH 4.5-12.5 (25 ℃, 16 h)	图 3
热稳定性	50 ℃以下稳定（pH 8.0, 30 min）	图 4
储存稳定性	25℃一年活力超过 90%	图 5
激活剂	SDS，尿素	
抑制剂	二异丙基氟磷酸(DFIP)，苯甲磺酰氟(PMSF)	
储存条件	2-8 ℃，有效期 12 个月	

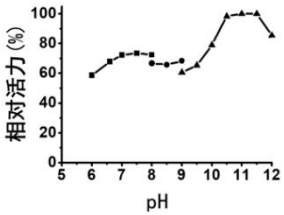

图 1 最适 pH

100 mM buffer solution: pH 6.0-8.0, Na-phosphate; pH 8.0-9.0, Tris-HCl; pH 9.0-12.5,

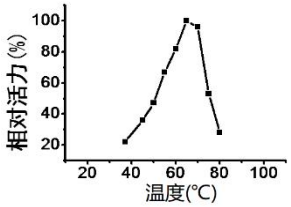

图 2 最适温度

Reaction in 20 mM K-phosphate buffer pH 8.0.

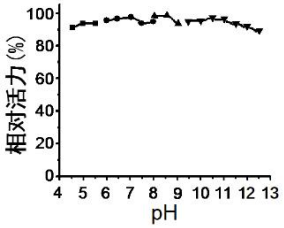

图 3 pH 稳定性

25 ℃ 16 h-treatment with 50 mM buffer solution: pH 4.5-5.5, Acetate; pH 6.0-8.0, Na-phosphate; pH 8.0-9.0, Tris-HCl; pH 9.5-12.5,

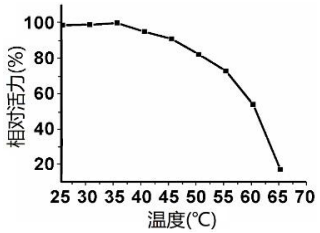

图 4 热稳定性

30 min-treatment with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0.

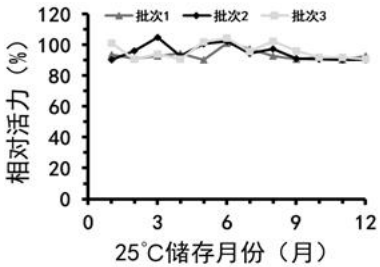

图 5 25˚C储存稳定性

用途

1.基因诊断试剂盒；2.RNA 和 DNA 提取试剂盒；3.提取组织中非蛋白成份，降解蛋白质类杂质，譬如 DNA 疫苗和肝素的制备；4.制备脉冲电泳的染色体 DNA；5.蛋白质印迹；6.用于体外诊断领域酶法糖化白蛋白试剂的研发和大量生产。

注意事项

使用时戴好防护手套和护目镜，使用后保存良好通风。该产品可能造成皮肤过敏反应。

活性测定方法

酶活定义

单位酶活定义为在规定条件下，每分钟水解酪蛋白生成 1 μmol L-酪氨酸所需的酶量。

试剂准备

试剂 I：底物：1%牛奶乳酪蛋白溶液：1 g 牛奶乳酪蛋白溶于 50 ml 0.1 M 磷酸钠盐溶液，pH 8.0，65-70 ℃水浴孵育 15 min 搅拌溶解，自来水冷却，氢氧化钠调节 pH 8.0，定容 100 ml。

试剂 II：TCA 溶液： 0.1 M 三氯乙酸，0.2 M 乙酸钠，0.3 M 乙酸(依次称取或量取 1.64g 三氯乙酸+1.64g 乙酸钠+1.724ml 乙酸，加入 50ml 纯水中，HCl 调节 pH 4.03，定容 100ml)。

试剂 III：0.4 M 碳酸钠溶液（称取 4.24g 无水碳酸钠溶解于 100ml 水中)。

试剂 IV：福林酚试剂：用纯水 5 倍稀释。

试剂 V：酶稀释液：0.1 M 磷酸钠盐溶液，pH 8.0。

试剂 VI：L-酪氨酸标准溶液：0、0.005、0.025、0.05、0.075、0.1、0.25 umol/ml 的 L-酪氨酸标准溶液，用 0.2 M HCl 溶解。

操作步骤

a 紫外可见分光光度计开机，选择光度测量。

b 参数设置波长为 660nm。

c 打开水浴锅，设置温度为 37℃，用温度计检测温度达到 37℃并维持 3-5min 不变。

d 将 2ml 离心管放置于离心管架上，做好标记，再向离心管中加入 0.5ml 底物，放入 37℃水浴锅预热 10min。

e 吸取 0.5ml 稀释好的酶液加入在水浴锅中预热的离心管中，计时反应 10min。空白组用酶稀释液替代酶液，其它步骤相同。

f 反应时间到，立即加入 1.0 mL TCA 试剂终止反应，加 TCA 的顺序与加酶液顺序相同，间隔时间也一致。拿出离心板架上下颠倒混匀后，放入水浴锅中继续孵育 30min，孵育结束后离心反应液。

g 从离心机中取出反应液，将离心管按离心前的顺序摆放好。在 5ml 离心管架上放上新的离心管，在管盖上做好标记。

h 在新的 5 mL 离心管中按顺序加入如下试剂：

离心上清液	0.5 mL
0.4M 碳酸钠溶液	2.5 mL
福林酚试剂	0.5 ml

i 将新的加入试剂的离心管颠倒混匀后，放置于 37℃水浴锅中孵育 30min。

j 分光光度计检测样品前用纯水在 660nm 处校零，样品孵育结束后，用紫外分光光度计在 660 nm 检测样品吸光度 OD_1，调节酶液稀释比例使吸光值保持在 0.13-0.25 的范围内。空白组用酶稀释液替代酶液，其它步骤相同，测定 OD_2，则样品实际读数$\triangle OD=OD_1-OD_2$。

k L-酪氨酸标准曲线：分别取 0.5 ml 不同浓度的 L-酪氨酸（0、0.005、0.025、0.05、0.075、0.1、0.25umol/ml）溶液，2.5ml 0.4M 碳酸钠，0.5 ml 福林酚试剂，加入 5mL 离心管中，混匀后 37℃孵育 30 min，测定不同 L-酪氨酸浓度对应的 OD_{660} 值（各测三个平行，浓度为 0uM 的作为空白对照）；根据酪氨酸浓度（Y）和对应的 OD_{660}（X）值绘制 L-酪氨酸对 OD_{660} 的标准曲线 $Y=kX+b$。

活力计算

按照以下公式计算酶液和蛋白比活力

$$\text{Volume activity } (U/ml) = \frac{(k \triangle \text{OD}+\text{b}) \times \text{df} \times 2}{10\times0.5\times0.5}$$

2：反应液总体积（mL）；

0.5：酶液体积（mL）；

0.5：显色测定中使用的反应液体积（mL）；

10：反应时间（min）；

df：稀释倍数；

C：酶浓度(mg/mL)。