

产品说明: 重组肠激酶(rEK, recombinant EnteroKinase)为基因工程甲醇酵母(*Pichia pastoris*)表达的牛肠激酶催化亚基的高纯度制品。不同于大肠杆菌表达的基因工程牛肠激酶催化亚基,本产品中的重组牛肠激酶催化亚基的两对二硫键均完全正确形成以保证正确的三维结构,且具备对活性非常重要的糖基化修饰,因此与天然酶相同,具有极高的活性(较大肠杆菌表达的产物活性高2~3个数量级)和严谨的识别为点(DDDDK, AspAspAspAspLys),但rEK切割速率较全酶快。与一些天然牛肠激酶制品不同,美季生物的rEK纯度极高,不会发生任何杂蛋白酶引起的二级切割;与一些重组牛肠激酶制品不同,美季生物的rEK活性极高,使用相同活性的酶引入的蛋白量仅为使用大肠杆菌重组牛肠激酶的千分之一。

美季生物rEK专为切割重组表达融合蛋白之需要而设计,并可通过亲和层析的方法快速分离和去除。在两个版本的肠激酶rEK-B和rEK-H中,分别不含有和含有His-6重组标签,适合于Ni-亲和层析柱的不同分离纯化方式。

- 如果您不使用Ni-亲和层析,往往不用考虑如何选择肠激酶的类型,因为高活性的肠激酶用量极低,且不会发生非特异性的切割,对蛋白质实验基本无影响。
- 目标蛋白中不含有His-6标签:推荐选用rEK-H,当蛋白质酶切反应结束后,将您的样品快速过一遍Ni-亲和层析柱或与填料混合吸附去除极微量的rEK-H
- 目标蛋白中含有His-6标签:则推荐选用rEK-B,当蛋白质酶切反应结束后,您使用Ni-亲和层析填料纯化目标蛋白的过程中,极微量的rEK-B会自然去除

单位定义: 一单位定义为23℃和20mM Tris-HCl (pH7.4)、50mM NaCl、2.5mM CaCl₂缓冲液中,16小时切割50μg融合蛋白所需要的酶量。

影响因素: 温度、溶液pH值会对肠激酶的活性有不同程度的影响。

· 反应条件	· 对酶活影响
16℃~37℃	活性与温度正相关
pH 5-9	无影响
< 0.5% Triton X-100	无影响
< 0.5% TWEEN 20	无影响
< 100 mM DTT	无影响
> 250 mM NaCl	抑制
> 250 mM Imidazole	抑制
> 1 mM PMSF	抑制
> 2 M Urea	抑制
> 2 M Guanadine	抑制
0.0625% SDS	二次切割

试剂规格:

提供的酶量可处理大约5~20mg重组融合蛋白(依据融合蛋白分子量不同而有差异)。

· 重组肠激酶(rEK-H): 100 单位
20μl 重组肠激酶溶液,浓度为5单位/μl。

缓冲体系: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, 50% glycerol, pH 7.4

-20℃保存

· 酶切缓冲液(10x): 1ml

缓冲体系: 500 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂, pH 7.4

-20℃保存

使用方法: 重组肠激酶溶液每 μl 酶液含有 5 个单位的肠激酶。由于不同融合蛋白样品自身属性的差异, 不同蛋白质样品在酶切的时候表现出不同的酶切性质, 这样就需要优化反应条件和酶量来达到最好的酶切效果。

· 小量优化

一般来说 100 μl 酶切条件如下, 融合蛋白的量可高达数个 mg/ml。

pH	5-9
酶切缓冲液(10X)	10 μl
重组 EK 酶	1, 3, 10, 30 单位
目标蛋白	1~90 μl *
水	至 100 μl

4 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4~16 小时

· 一个典型的酶切体系

pH	7.4
酶切缓冲液(10X)	10 μl
重组 EK 酶	0.4 μl
目标蛋白(2mg/ml)	50 μl
水	39.5 μl

23 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 8 小时

· 大量酶切

选择优化的反应条件, 按如前所述酶切缓冲液(10X), 按小量酶切条件等比例放大, 并用 SDS-PAGE 检验酶切效果。

· 重组肠激酶的灭活

重组肠激酶对丝氨酸蛋白酶抑制剂如 APMSF、PMSF 等敏感, 如在目标蛋白或反应完毕的反应体系中加入 0.5mM 的 APMSF 即可灭活重组肠激酶。

*蛋白溶液中的盐离子等物质可能对酶活性有影响

参考文献:

1. Collins-Racie, L. A., McColgan, J. M., Grant, K. L., DiBlasio-Smith, E. A., McCoy, J. M., and LaVallie, E. R. (1995) Bio/Technology 13, 982-987.
2. Antonowicz, I., Hesford, F. J., Green, J. R., Grogg, P., and Hadorn, B. (1980) Clinica Chimica Acta 101, 69-76.