

TurboNuclease

重组 *Serratia marcescens* (粘质沙雷氏菌) 的细胞外内切核酸酶。(与 Benzonase 由同一基因编码, Benzonase 是 Merck 的商标, TurboNuclease 是 Accelagen 的商标)

描述

TurboNuclease 是用 E.coli 表达、通过专利纯化过程制得超纯级的重组粘质沙雷氏菌的细胞外内切核酸酶。TurboNuclease 是高纯度的同源二聚体, 由 2 个 27kDa 亚基组成, 具有非常高的比活力, 且无蛋白酶活性。它能把单链及双链核酸 (DNA 或 RNA) 非特异地水解成 1 到 4 个碱基的 5'-单磷酸末端寡核苷酸。

应用

1. 在蛋白纯化及样品制备过程中, 能够有效降低粘稠度;
2. 在病毒疫苗、病毒载体 (如腺病毒、AAV 等) 及溶瘤病毒等制备过程中, 去除核酸污染;
3. 在蛋白电泳 (SDS-PAGE)、2D 电泳过程中, 能减少条带拖尾现象;
4. 在 PBMC 解冻、类器官处理中, 能减少或阻止细胞聚团;
5. 在绝大多数应用中, TurboNuclease 能够替代粗提的 DNase I。

优势

1. 与竞品的重组粘质沙雷氏菌的细胞外内切核酸酶相比, TurboNuclease 能耐受更高的盐浓度、具有更宽的最适 pH 范围;
2. 与 Benzonase 相比, TurboNuclease 有更宽的适合 pH 范围;
3. 昆虫表达系统中, pH 低于 6.5, 与其他核酸酶相比, TurboNuclease 酶活更高;
4. 能耐受 500mM 盐浓度, ——在 500 mM NaCl 条件下起作用, 但酶活会有所降低。

酶活定义

在 37°C, pH 8.0, 50 mM Tris-HCl 及 1 mM MgCl₂ 反应体系中, 一个单位的 TurboNuclease 酶在 30 分钟内可将鲑鱼精子 DNA 消化成 1.0 OD₂₆₀ 的酸可溶寡核苷酸; 等同于将 50μg 的鲑鱼精子 DNA 完全消化成寡核苷酸。

酶活性和特异性

TurboNuclease 比活力为 >1.3x10⁶ units/mg, 相当于 >3x10⁶ Kunitz units/mg, 是高纯度牛 DNase I 比活力 (约为 25,000 Kunitz units/mg) 的 100 倍以上。

TurboNuclease 和 Benzonase 有相似的比活力。TurboNuclease 无可检测的蛋白酶活性。

组分及参数

TurboNuclease 保存液是 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 及 50% Glycerol。

通过 Accelagen 的专利纯化工艺制得，纯度达到 99%以上；
内毒素<0.1 EU/1000units，由 Charles River 的 Endosafe PTS LAL 检测得到。

储存条件

建议储存在-20℃，稳定保存 2 年以上。37℃条件下在保存液中至少稳定 3 周，而不影响活性。

使用建议

1. 为了降低细胞裂解液粘稠度，建议加入 10-100 U/g 细胞量，4℃孵育 10-30 分钟；
 2. 在 AAV 纯化过程中，推荐 5 – 50 U/ml 的酶用量，37℃孵育 1-2 小时。
- 缓冲体系、细胞类型及细胞裂解方法等，都会影响最终的消化效果。TurboNuclease 比活力极高，细胞裂解液中低于 1μl/ml 的用量，并不影响任何下游实验。

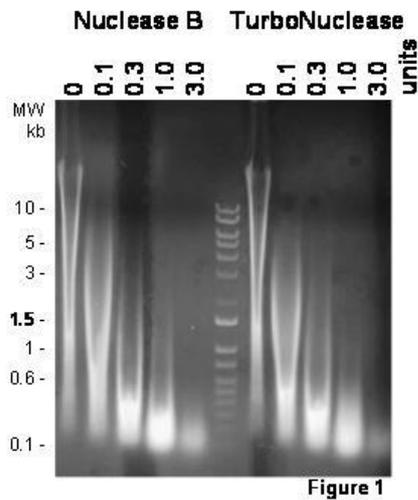


Figure 1. 37℃条件下，50 μg 的鲑鱼精子 DNA 与指定量的 TurboNuclease 和竞品的粘质沙雷氏菌内切酶孵育 30 分钟，EtBr 染色。孵育体系是 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM MgCl₂。

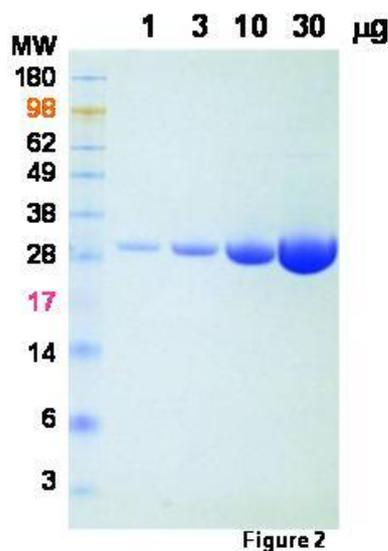


Figure 2. 通过 Accelagen 的专利纯化工艺制的 TurboNuclease，纯度达到 99%以上。

货号	描述	规格	储存条件	运输条件
N0103M	TurboNuclease, 250units/ul	50,000 units	-20℃	2-8℃
N0103L	TurboNuclease, 250units/ul	250,000 units	-20℃	2-8℃

Q&A:

【Q1】 怎么灭活 TurboNuclease? 如何去除 TurboNuclease?

【A1】 TurboNuclease 活性状态需要 Mg 离子, EDTA 及其他能去除 Mg 或 Mn 的金属螯合剂都能抑制 TurboNuclease。TurboNuclease 能耐受苛刻条件, 比大多数蛋白都要稳定。目前, 没有特异的方法去除 TurboNuclease。AAV 或蛋白下游纯化用的大部分色谱柱都不会吸附 TurboNuclease。

【Q2】 需要更换缓冲体系时, 为了保持 TurboNuclease 的活性, 必需哪些条件?

【A2】 TurboNuclease 活性状态需要 Mg 离子。TurboNuclease 保存液中的 Mg 足以保持酶活, 额外添加 1-2mM Mg 离子会增强酶活。

【Q3】 TurboNuclease 能跟蛋白酶抑制剂联用吗?

【A3】 可以, 蛋白酶抑制剂一般不影响 TurboNuclease 的活性。由于很多蛋白酶抑制剂中含有 EDTA, 会影响 TurboNuclease 活性。

【Q4】 目标蛋白不可溶, 需要在变性条件下做纯化。那么, TurboNuclease 能够在尿素或盐酸胍环境下起作用吗?

【A4】 在高浓度的尿素或盐酸胍条件下, TurboNuclease 会变性, 并不起作用。

【Q5】 TurboNuclease 跟其他核酸酶相比, 有哪些优势?

【A5】 与 Benzonase 及许多核酸酶等一样, TurboNuclease 也偏好低离子浓度、有最适 pH 范围。相比其他竞品的重组粘质沙雷氏菌的细胞外内切核酸酶产品, TurboNuclease 能耐受更高的盐浓度、具有更宽的最适 pH 范围。与 Benzonase 相比, TurboNuclease 有更宽的适合 pH 范围。同时, TurboNuclease 能在 500 mM NaCl 条件下起作用, 但酶活会有所降低。

AAV 纯化相关文献——

Karina Kawka et al, (2021) Integrated development of enzymatic DNA digestion and membrane chromatography processes for the purification of therapeutic adenoviruses. Separation and Purification Technology. 254

Neil G.Rumachik et al, (2020) Methods Matter: Standard Production Platforms for Recombinant AAV Produce Chemically and Functionally Distinct Vectors. Molecular Therapy. 18: 98-118

April R.Giles et al, (2018) Deamidation of Amino Acids on the Surface of Adeno-Associated Virus Capsids Leads to Charge Heterogeneity and Altered Vector Function. Molecular Therapy 26: 2848-2862

Wang Q et al, (2015) Identification of an adeno-associated virus binding epitope for AVB sepharose affinity resin. Mol Ther. 2: 15040

Cecchini S et al, (2011) Reproducible High Yields of Recombinant Adeno-Associated Virus Produced Using Invertebrate Cells in 0.02- to 200-Liter Cultures. Human Gene Therapy 22:1021-1030

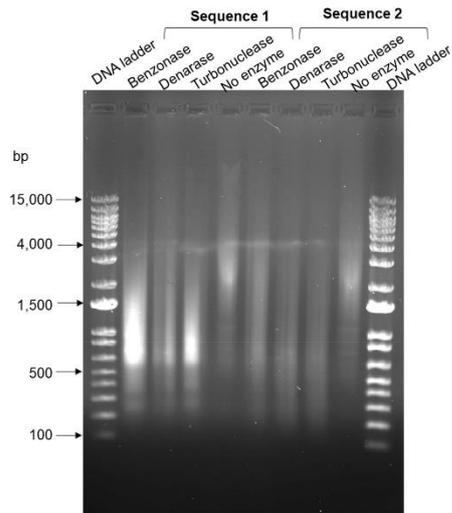


Figure 3. 三种全能核酸酶效果对比。在 Sequence 1（先离心后 DNA 消化）和 Sequence 2（先 DNA 消化后离心）两种处理方式中，Benzonase、Denarase 及 TurboNuclease 等三种全能核酸酶处理后的样品，琼脂糖凝胶电泳分析。线性 DNA ladder 是 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen)。

摘自：Integrated development of enzymatic DNA digestion and membrane chromatography processes for the purification of therapeutic adenoviruses

Protocol——

大规模细胞裂解

1. 制备新鲜、预冷的裂解 Buffer

裂解 Buffer 必须能够溶解目标蛋白，并且裂解 Buffer 必须兼容下游纯化过程。比如，下游用到 Ni 柱，则需要减少 EDTA 或 DTT 的用量。

裂解液配方

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

500 mM NaCl

14 mM beta-巯基乙醇

对于难溶或溶解性未知的蛋白，可以适当加去垢剂。1%的 Triton X-100 不影响 TurboNuclease 活性。

在 150 mM NaCl 或 500 mM NaCl 及 400 mM 咪唑条件下，TurboNuclease 都具有很高酶活。

2. 用裂解 Buffer 重悬解冻的细胞

一般来说，用 2-10 ml 裂解 Buffer 重悬 1g 的细胞量。TurboNuclease 能够减少裂解液的粘稠度，从而减少裂解 Buffer 的使用量。

我们建议——每 1g 细胞量用 2ml 裂解 Buffer 重悬。

3. 加入 **TurboNuclease** 到 **25U/ml**

可以同时加入蛋白酶抑制剂。如果裂解 Buffer 中含有 EDTA 或 EGTA, 建议加入 10 倍量的 TurboNuclease。

If the lysis buffer contains EDTA or EGTA, add 10-fold more TurboNuclease.

4. 在冰上或室温条件下, 通过机械方式或化学方式裂解细胞

TurboNuclease 也能够减少高压微射流均质机处理得到的裂解液的粘稠度。

5. 离心上柱澄清裂解液

对于低粘稠度的裂解液, 在离心转速稍低条件下, 如 35000g (~16000 rpm), 可以得到上清裂解液。

细胞裂解液可以不经澄清直接加入。

高通量处理多个昆虫细胞样品

1. 用干冰冷冻 5-10ml 培养液离心得到的沉淀

2. 用 1ml 含 TurboNuclease 的裂解液重悬细胞沉淀

3. 将细胞裂解液转移到 ep 管, 把 ep 管放在浮漂上

4. 在冰水浴中, 用超声清洗机裂解细胞 10 分钟

与超声破碎仪相比, 超声波清洗机有如下优点:

- 样品是单独密封的, 杜绝交叉污染;
- 冰水混合物水浴, 能够保持样品温度恒定;
- 同时处理的样本数量无限制。

细胞裂解液能用来做全细胞蛋白表达分析、细胞上清蛋白表达分析及亲和 pull-down。

Accelagen 推荐裂解 Buffer

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

500 mM NaCl

20 mM Imidazole, pH 8.0

14 mM beta-mercaptoethanol

0.5% Triton X-100

25 units/ml TurboNuclease

更多产品相关咨询或订购事宜, 联系 infor@bestobio.com, 详见 www.bestobio.com。

郭经理 18616526532, 梅经理 15601919566。