

# Pannarase 耐高盐全能核酸酶使用说明书

## Pannarase 耐高盐全能核酸酶简介

Pannarase 耐高盐全能核酸酶是一种非特异性核酸内切酶，该酶产品是从大肠杆菌菌株 BL21 中表达纯化得到。该蛋白酶是由 149 个氨基酸构成的单链多肽，分子量为 16.8 kDa，Ca<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 可以稳定其构象。该酶可以将任何形式的 DNA 和 RNA（线性、环形、超螺旋）降解成 3'-单核苷酸及二核苷酸，并可在一系列宽泛的操作条件下保持高效性。

本公司提供纯度>95% (SEC-HPLC) Pannarase 耐高盐全能核酸酶，活性高达  $1.98 \times 10^6$  U/mg 的比活性，内毒素<1EU/mg 且不含可检测的蛋白酶活性和病毒污染物。

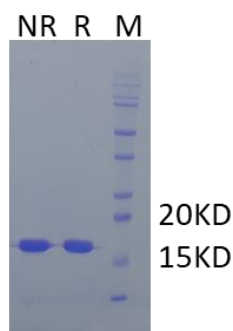
货号 Cat. No.	名称 Name	包装 Package
CYG006F0010	Pannarase 耐高盐全能核酸酶，适合于生物制药生产	100,000U/tube
CYG006F0050	Pannarase 耐高盐全能核酸酶，适合于生物制药生产	500,000U/tube
CYG006F0500	Pannarase 耐高盐全能核酸酶，适合于生物制药生产	5,000,000U/tube

酶活单位定义：通过测定其裂解鲱鱼精 DNA 底物的能力 (herring Sperm DNA, Sigma, 目录号 D7290)。一个单位 Pannarase 耐高盐全能核酸酶活力定义为在 37° C pH 10.0 反应条件下 30 分钟内导致 A<sub>260nm</sub> 降低 1.0 (相当于完全消化 37ug DNA)，比活度 >  $1.0 \times 10^6$  U/ mg。

储存条件: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 在 -20°C 可稳定保存，避免反复冻融。

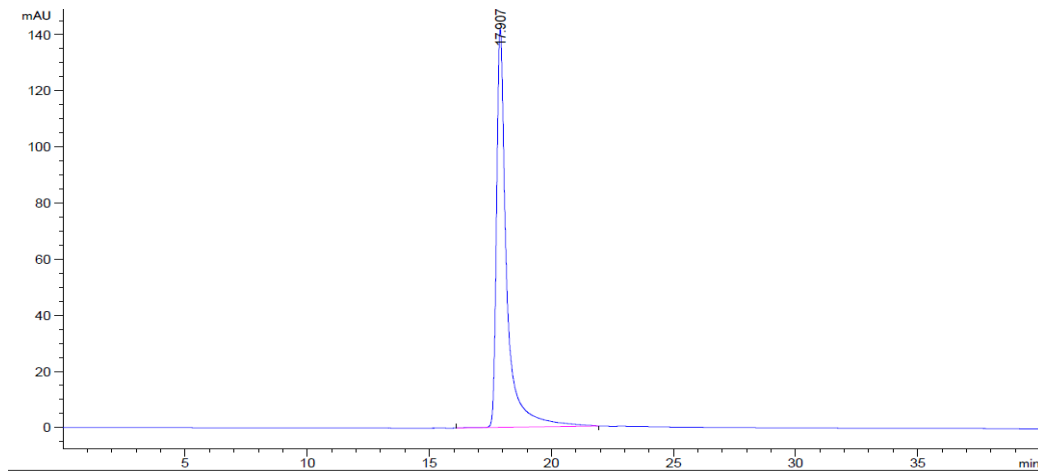
## Pannarase 耐高盐全能核酸酶表征

SDS-PAGE:



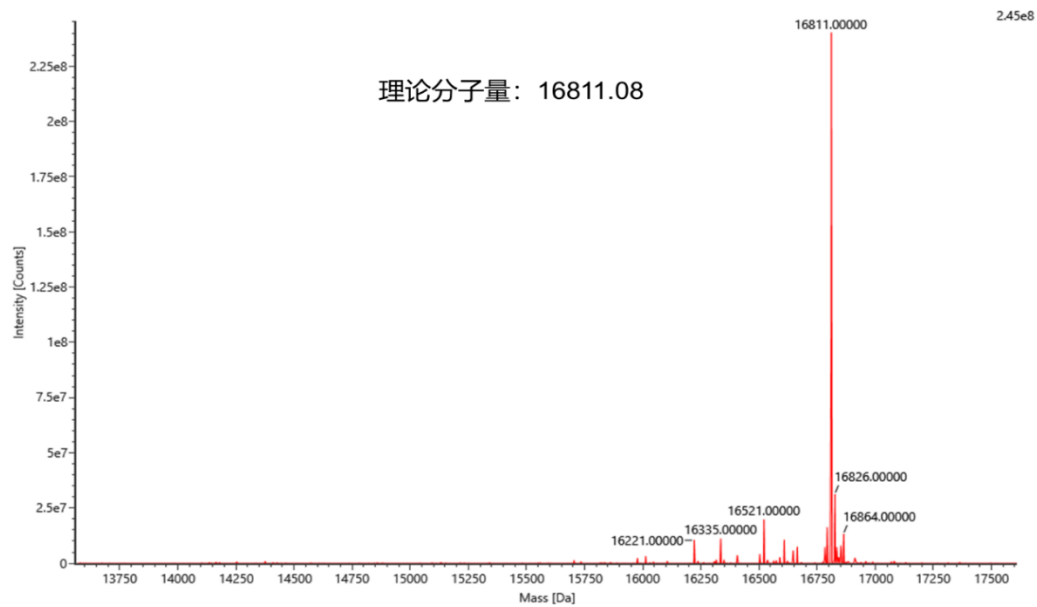
非还原及还原的 SDS-PAGE 显示蛋白分子量约 16kDa，未见杂蛋白。

### SEC-HPLC:



尺寸排阻色谱显示高纯度，无聚集体产生

### LC-MS:



液相色谱质谱完整蛋白分析，确认蛋白精确分子量与理论值一致

## Pannarase 耐高盐全能核酸酶主要用途

- 🚩 ，疫苗和病毒样品制备中高盐环境下 DNA 污染的去除。
- 🚩 蛋白提取时去除核酸污染：在重组蛋白纯化或组织细胞样品蛋白提取时，Pannarase 核酸酶可有效降低样品粘度，利于下游操作。
- 🚩 与细胞或细菌裂解液配合使用，去除粗提物中的核酸，降低溶液粘性，提高蛋白质产量

- ✦ 减少存放的外周血单细胞 (PBMC) 的结块现象。
- ✦ 降解核酸，利于不可溶性蛋白复性前高质量包涵体制备。
- ✦ 有效去除带负电荷的核酸对双向 SDS-PAGE 蛋白样品的影响，改善蛋白质的分离效果，增强 2-DE 分辨率。

## 注意事项

1. Pannarase 耐高盐全能核酸酶在以下反应条件均能保持活性：

条件	最适条件*	有效条件#
Mg <sup>2+</sup>	0.55-5 mM	0-10 mM
Ca <sup>2+</sup>	0.5-10 mM	0-10 mM
pH	8.5-10	7.0-11.0
Na <sup>+</sup>	0-150 mM	0- 500 mM

\* “最适条件”指的是在此条件下 Pannarase 核酸酶可保持>90%的活性

\*\* “有效条件”指的是在此条件下 Pannarase 核酸酶可保持>15%的活性

注：具体参数可参见 Pannarase 产品性能部分

- 在中等盐浓度 (0-150 mM NaCl) 时活性最佳，在 300 mM 时仍有 36.2%的活性，更高盐浓度条件可适当加大酶量或延长孵育时间，超过 600 mM 可导致 Pannarase 酶活性基本完全丧失。
- Pannarase 耐高盐全能核酸酶最适温度为 20 - 80 ℃，活性可保持在 60%以上，如需低温操作，可适当延长孵育时间补偿，无需加大酶量（在体系固定的情况下，Pannarase 核酸酶的消化效果主要取决于酶用量、反应温度以及反应时间，当反应温度较低时，为避免过多的 Pannarase 核酸酶引起的残留问题，更加推荐延长反应时间来保证消化效果）。

## Pannarase 耐高盐全能核酸酶使用说明

### 1、大肠杆菌破碎液

为了达到降低粘度的目的，加入核酸酶的用量须根据破碎液的菌体浓度来决定，如果菌体浓度在 50%，建议加入的核酸酶的量 为 1: 1000-5: 1000，即 50 万-250 万 U/L。如果菌体浓度在 5%，则可以按照 1: 10000-5: 10000 的比例加入。

2、对于细胞裂解液，可以按照 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>个细胞加入 500 单位核酸酶。

3、对于纯化后的腺病毒或者病毒疫苗，由于 DNA 含量相对较少，可以按照万分之一到万分之五也就是每毫升 5 个单位的最终浓度加入。

### 注意事项：

- 酶的最佳作用条件为 pH 8.0 - 11.0，37° C，30min。
- 酶的活性比较稳定，室温放置短期内不会有太大影响，长时间保存需放置在-20° C 冰箱内。酶用不含甘油缓冲液稀释后尽快使用，不推荐冻存后再使用。
- 对于仅为降低粘度为目的，可以直接加入核酸酶，室温缓慢搅拌 30 min。

### 常见问题 Q&A:

#### 问题一

Q: 当反应温度低于 37 °C 时, 如何保证 Pannarase 耐高盐全能核酸酶的消化效果?

在体系固定的情况下, 核酸酶的消化效果主要取决于酶用量、反应温度以及反应时间, 当反应温度较低时, 为避免过多的核酸酶引起的残留问题, 更加推荐延长反应时间来保证其消化效果。

#### 问题二

Q: 产品应如何稀释?

A: 正常建议稀释比例(终浓度)为 1:1000-1:20000, 使用不含甘油的缓冲液稀释后的酶则需尽快用掉, 不推荐冻存后再次使用。

#### 问题三

Q: 产品能否可以减少用量?

A: 如希望减少用量, 可酌情提高反应温度或延长时间。

#### 问题四

Q: 稀释后每次用多少量, 如何试梯度? 起始加多少?

A: 看不同的实验要求, 添加量可以按照 1:100-1:10000 之间。真核细胞需要量比原核细胞量高, 因为真核细胞中核酸含量高。真核细胞起始添加量可以按照 1:1000 的比例添加, 原核细胞可以按照 1:10000 的比例添加; 4 °C 消化 DNA 添加量比室温消化 DNA 添加比例高, 因为室温下核酸酶活力更高。普通 Co-IP 实验, 蛋白质表达实验可以适当稍加, 对 DNA 残留要求高的实验, 可以按照 1:100 的比例添加。

#### 问题五

Q: 反应缓冲液是什么?

A: 可使用常用的生物缓冲液, 如 TBS、MOPS 等, pH 8.0-11.0。推荐加入 1 mM CaCl<sub>2</sub> 及 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 可以显著提高 Pannarase 的酶活。

## Pannarase 耐高盐全能核酸酶的去除

Pannarase 耐高盐全能核酸酶也是一种蛋白质, 如果加入到细菌或者细胞裂解液中, 那么将会随着纯化步骤如其他杂蛋白一样被去除, 如果加入到病毒或者病毒类疫苗中, 由于核酸酶和病毒的分子量差异巨大, 可以采用凝胶过滤的方式(如 Sepharose 6 FF)去除, 核酸酶的残留量可以采用商品化的试剂盒进行检测。

在下游的纯化操作中, 可以通过多种方式(例如切向流过滤(TFF)或色谱法)从生产过程中去除 Pannarase 耐高盐全能核酸酶。通过 ELISA 检测总残留核酸内切酶(有活性和无活性), 来证明成功去除了 Pannarase 耐高盐全能核酸酶。

Pannarase 耐高盐全能核酸酶很容易从滤液中去除, 通过使用 TFF 和选择合适的膜截留物来去除 Pannarase 耐高盐全能核酸酶至低于可检测限的浓度从而从工艺中去除。

根据纯化的过程, 可以使用离子交换层析法代替 TFF 或与 TFF 附加使用, 来去除 Pannarase 耐高盐全能核酸酶。众所周知, 离子层析法可从药物产品中去除残留的核酸酶。因 Pannarase 核酸酶 pI 约为 9.91, 因此当含少量 Pannarase 酶的样品及结合缓冲液中含有适当浓度 NaCl 时, Pannarase 酶通常会以流穿模式流过阴离子交换层析(AEX)色谱柱, 而目的蛋白会结合到阴离子层析(AEX)色谱柱上, 因此分别洗脱。如表 1 中列举了适用各种样品和平衡缓冲液的几种阴离子交换树脂, 可用于 Pannarase 耐高盐全能核酸酶去除。

阳离子交换层析(CEX)也对去除 Pannarase 耐高盐全能核酸酶有效, 当核酸酶与目的蛋白的等电点相差较远时可选用阳离子层析进行去除。表 2 提供了一些阳离子交换层析介质和适用于去除 Pannarase 耐高盐全能核酸酶的条件参考清单。

表 1: 去除 Pannarase 耐高盐全能核酸酶的阴离子交换层析填料

阴离子交换色谱pH		样品和平衡缓冲液	Pannarase 耐高盐全能核酸酶	BSA
Q Sepharose	7.0	50 mM Tris/200 mM NaCl	未结合	未结合
Q Sepharose	7.0	50 mM Tris/50 mM NaCl	未结合	结合
Q Sepharose	7.0	50 mM Tris/10 mM NaCl	未结合	结合
Q Sepharose	8.0	50 mM Tris/250 mM NaCl	未结合	未结合
Q Sepharose	8.0	50 mM Tris/100 mM NaCl	未结合	结合
Q Sepharose	8.0	50 mM Tris/50 mM NaCl	未结合	结合
Q Sepharose	9.0	50 mM Tris/200 mM NaCl	未结合	部分结合
Q Sepharose	9.0	50 mM Tris/100 mM NaCl	未结合	结合
DEAE Sepharose	7.0	50 mM Tris/200 mM NaCl	未结合	未结合
DEAE Sepharose	7.0	50 mM Tris/50 mM NaCl	未结合	结合
DEAE Sepharose	7.0	50 mM Tris/10 mM NaCl	未结合	结合
DEAE Sepharose	8.0	50 mM Tris/250 mM NaCl	未结合	未结合
DEAE Sepharose	8.0	50 mM Tris/100 mM NaCl	未结合	结合
DEAE Sepharose	8.0	50 mM Tris/50 mM NaCl	未结合	结合
DEAE Sepharose	9.0	50 mM Tris/250 mM NaCl	未结合	未结合
DEAE Sepharose	9.0	50 mM Tris/50 mM NaCl	未结合	结合

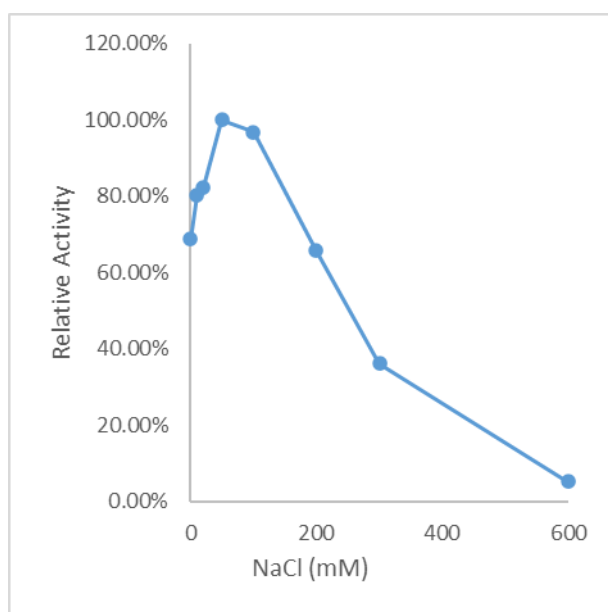
表 2: 去除Pannarase耐高盐全能核酸酶的阳离子交换层析填料

阳离子交换色谱 pH		样品和平衡缓冲液	Pannarase 耐高盐全能核酸酶
SP Sepharose	7.5	20 mM Phosphate	结合
SP Sepharose	6.0	20 mM Phosphate/100 mM NaCl	结合
SP Sepharose	5.0	20 mM NaAc/200 mM NaCl	结合
SP Sepharose	4.0	20 mM NaAc/300 mM NaCl	结合

CM Sepharose	6.0	20 mM Phosphate	结合
CM Sepharose	5.0	20mM NaAc 40mM NaCl	结合
CM Sepharose	5.0	20mM NaAc 100mM NaCl	结合
CM Sepharose	4.0	20mM NaAc 150mM NaCl	结合

## Pannarase耐高盐全能核酸酶产品性能

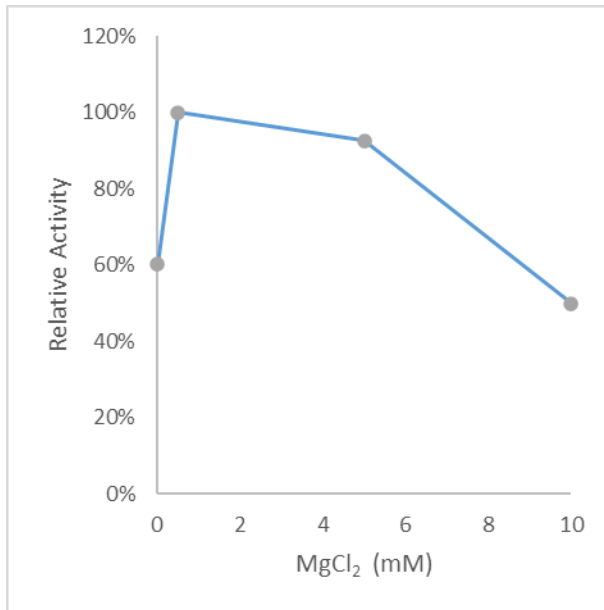
### 1. Na<sup>+</sup>离子对 Pannarase 酶活性的影响



Pannarase 在中等 Na<sup>+</sup>浓度条件下活性较高，300 mM 时仍有 36.2%的活性，但浓度超过 600mM 时酶活性基本完全丧失。

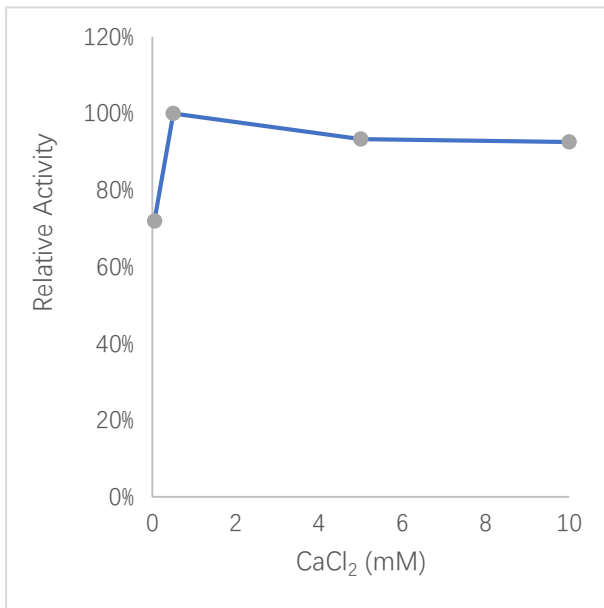
Pannarase presents high activity at medium salt concentrations. At 300 mM Na<sup>+</sup> Pannarase still retains 36.2% of the highest activity. But over 600 mM of Na<sup>+</sup> will lead to a complete depletion of activity.

### 2. Mg<sup>2+</sup>离子对 Pannarase 酶活的影响



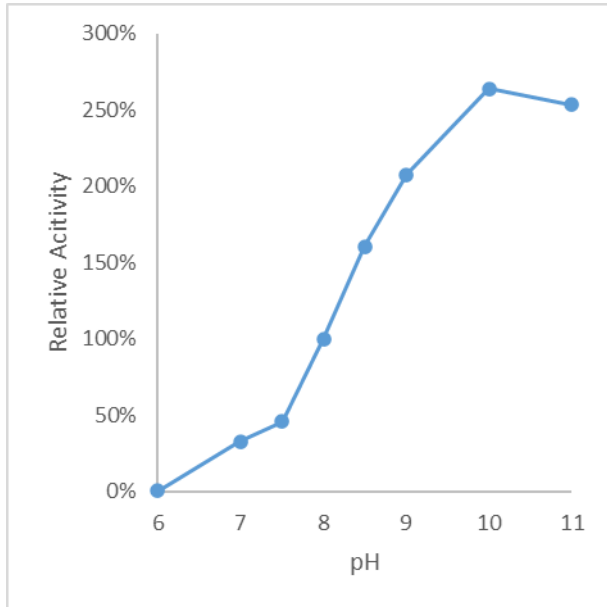
1 mM Mg<sup>2+</sup>可以提升 Pannarase 内切酶 40%左右的活性，但 Mg<sup>2+</sup>并不是必须的。  
 A concentration of 1 mM Mg<sup>2+</sup> can raise the activity of Pannarase endonuclease by about 40%.  
 But Mg<sup>2+</sup> is not necessarily needed.

### 3. Ca<sup>2+</sup>离子对 Pannarase 酶活的影响



1 mM Ca<sup>2+</sup>可以提升 Pannarase 内切酶 28%的活性，但 Ca<sup>2+</sup>并不是必须的。  
 A concentration of 1 mM Ca<sup>2+</sup> can raise the activity of Pannarase endonuclease by about 28%.  
 But Ca<sup>2+</sup> is not necessarily needed.

### 4. 不同 pH 条件下 Pannarase 酶活性比较



Pannarase 酶活性最适 pH 为 pH8.0 - 11.0。

The optimal enzyme activity of Pannarase endonucleas is between pH 8.0 to 11.0.

### 11. 基因组DNA酶切实验

将底物DNA (genomic DNA of *E. coli* strain BL21(DE3)) 用测定缓冲液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1mg/mL BSA) 稀释至1 mg/mL。将底物与不同单位的 Pannarase以及其他核酸酶在37 °C 孵育30分钟。通过琼脂糖凝胶电泳分析DNA片段, 并拍照。

The substrate DNA (genomic DNA of *E. coli* strain BL21(DE3)) was diluted with assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1mg/mL BSA) into 1 mg/mL. Incubate the substrate with different amount of Pannarase at 37°C for 30 min. The DNA fragment was analyzed by agarose gel electrophoresis and photographed.

