

OS CHASELECTION

Pannarase

全能核酸酶使用说明书

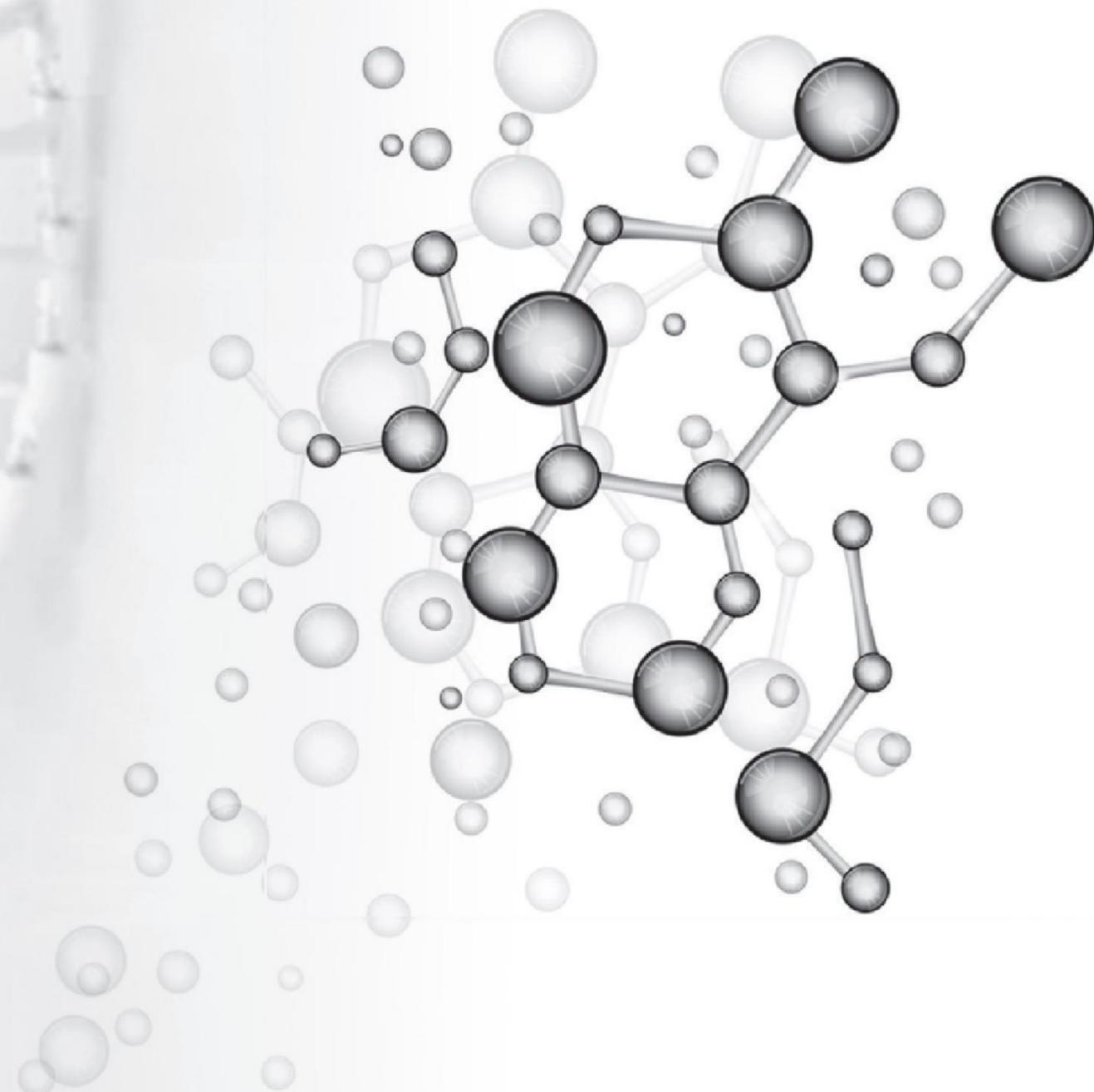
OS CHASELECTION

上海逐典生物科技有限公司

地址：上海市闵行区紫星路588号紫竹数字创意港2幢6层601A

电话：021-52238066

网址：www.chaselection.com



Pannarase 全能核酸酶简介

Pannarase (EC 3.1.30.2) 是一种来源于 *Serratia marcescens* 的非特异性核酸内切酶 (*Serratia marcescens* endonuclease)。酶是从大肠杆菌菌株 W3110 中表达纯化得到的，该菌株是 K12 菌株的突变株，含有 pET41 生产质粒。从结构上看，该蛋白酶是同源二聚体，单亚基分子量为 26.8 kDa，由 246 个氨基酸组成，两对活性必需的二硫键， Mg^{2+} 是其激活剂。该酶可以将任何形式的 DNA 和 RNA（线性、环形、超螺旋）降解成 3-5bp 的寡核苷酸，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 >99% (SEC-HPLC) Pannarase 全能核酸酶，活性高达 2×10^6 U/mg 的比活性，内毒素 <1 EU/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
CYG002F0010	Pannarase 全能核酸酶，适合于生物制药生产	100,000U/tube
CYG002F0050	Pannarase 全能核酸酶，适合于生物制药生产	500,000U/tube
CYG002F0500	Pannarase 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 全能核酸酶活力定义为在 37°C pH 8.0 反应条件下 30 分钟内导致 A260nm 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 8.0, 20mM NaCl, 2mM MgCl₂, 50% Glycerol, 在 -20°C 可稳定保存，避免反复冻融。

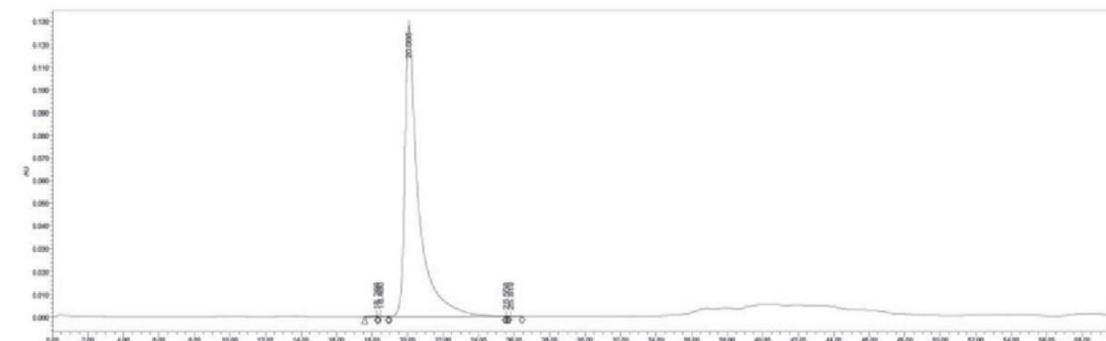
Pannarase 全能核酸酶表征

SDS-PAGE:



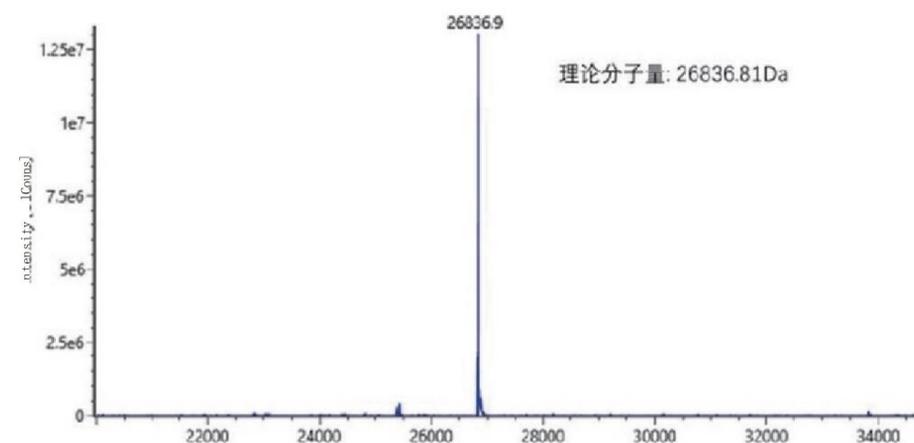
非还原及还原的 SDS-PAGE 显示蛋白分子量约 27kDa，未见杂蛋白。

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 全能核酸酶主要用途

1. 疫苗和病毒样品制备中 DNA 污染的去；
2. 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；
3. 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；
4. 少存放的外周血单细胞 (PBMC) 的结块现象；
5. 降解核酸，利于不可溶性蛋白复性前高质量包涵体制备；
6. 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 ²⁺	1-2mM	1-10mM
pH	8.0-9.2	6.0-10.0
Na ⁺ /K ⁺ 浓度	0-20 mM	0-150 mM
温度	37°C	4-42°C
(Dithiothreitol)DTT	0-100 mM	0-300 mM
2-mercaptoethanol	0-100 mM	0-300 mM
PO ₃ ³⁻	0-10 mM	0-100 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

2, 在低盐(0-20 mM NaCl)时活性最佳, 如需高盐使用可适当加大酶量或延长孵育时间, 超过300 mM 可导致Pannarase 酶活性完全丧失;

3, Pannarase 核酸酶可与蛋白酶抑制剂兼容, 但对于含有 EDTA 配方的蛋白酶抑制剂需谨慎使用, EDTA 浓度大于1mM 时会抑制其活性;

4, 在有变性剂存在的条件下(如4M 尿素)仍有活性, 可以直接加入蛋白裂解液中;

5, Pannarase 核酸酶最适温度为37°C, 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);

6, 如需抑制 Pannarase 核酸酶的活性, 可通过添加高盐、EDTA 等抑制剂的方式来实现, 其中 EDTA 的抑制作用是可逆的, 可以通过添加大量的 MgCl₂ 来解除抑制作用。

Pannarase 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, 对于真核细胞裂解液, 可以按照10⁶-10⁷个细胞加入500单位核酸酶, 起始添加量可以按照1:1000的比例添加。

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1:10000-5:10000的比例加入。

注意事项:

1, 酶的最佳作用条件为pH 8.0-9.2, 37°C, 30min;

2, 镁离子对酶的活性是必需的, 推荐使用的浓度为2 mM, 如果样品中有 EDTA 等金属螯合剂, 需要去除, 或者加入过量的镁离子来中和EDTA;

3, 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, 由于保护液中含有50%甘油, 所以酶液不会冻结。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;

4, 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: 如果 Pannarase 核酸酶用完忘记收回-20°C而遗忘在桌上了, 在室温放置过周末还可以用吗?

A: 没问题, Pannarase 核酸酶非常稳定, 即使在25°C放置数月仍有>90%的酶活力。

问题二: 我的蛋白不溶, 需要在变性条件下进行纯化, Pannarase 核酸酶可以在尿素环境中消化核酸吗?

A: Pannarase 核酸酶在尿素浓度为6M 时活性先增加, 随着时间延长活性又有降低; 在尿素为7M 时, Pannarase 核酸酶15分钟后出现变性并失活。但是在酶失活前多数核酸已经降解了。可通过提高核酸酶使用浓度补偿7M 尿素的影响。

问题三: 当反应温度低于37°C时, 如何保证 Pannarase 核酸酶的消化效果?

A: 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其消化效果。

问题四: 怎样灭活 Pannarase 核酸酶?如何去除?

A: 采用 EDTA 螯合金属离子会可逆地抑制核酸酶活性, 极端条件会造成不可逆失活, 例如100mM NaOH, 70°C处理30min 等。核酸酶可采用阴离子交换柱从目的产物中分离出去。

问题五: 产品应如何稀释?

A: 正常建议稀释比例(终浓度)为1:1000-1:20000, 原储存液中含有50%甘油, 酶液不会在-20°C冻结, 但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。

问题六: 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。

问题七： 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℃消化 DNA 添加量比室温消化DNA 添加比例高，因为室温下 Pannarase 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。

问题八： 反应缓冲液有哪些？

A: 常用生物缓冲液，如TBS、MOPS (pH6-8) 等。

Pannarase 全能核酸酶的去除

Pannarase 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 Sepharose6FF) 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 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 全能核酸酶。

Pannarase 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 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 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内切酶。因Pannarase 核酸酶pI为6.85, 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 全能核酸酶去除。

阳离子交换层析 (CEX) 也对去除 Pannarase 全能核酸酶有效，但操作范围可能较小。表2提供了一些阳离子交换层析介质和适用于去除 Pannarase 全能核酸酶的条件参考清单。

表1: 去除Pannarase全能核酸酶的阴离子交换层析填料

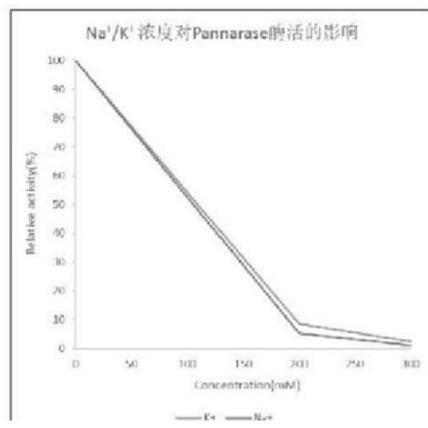
阴离子交换色谱	pH	样品和平衡缓冲液	Pannarase全能核酸酶	BSA
QSepharose	7.0	50 mM Tris/200 mM NaCl	未结合	未结合
Q Sepharose	7.0	50 mM Tris /50 mM NaCl	未结合	结合
QSepharose	8.0	50mM Tris/250mM NaCl	未结合	未结合
QSepharose	8.0	50 mM Tris/100mM NaCl	未结合	结合
QSepharose	9.0	50mM Tris/200 mM NaCl	未结合	部分结合
Q Sepharose	9.0	50mM Tris/100 mM NaCl	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	8.0	50mM 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	9.0	50 mM Tris/250mM 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 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全能核酸酶
SP Sepharose	6.0	20 mM Phosphate /100 mM NaCl	结合
SP Sepharose	6.0	20 mM Phosphate /200 mM NaCl	未结合
SP Sepharose	5.0	20 mM NaAc /200 mM NaCl	结合
SP Sepharose	5.0	20 mM NaAc/700mM NaCl	未结合
SP Sepharose	4.0	20 mM NaAc /300 mM NaCl	结合
SP Sepharose	4.0	20 mM NaAc/700 mM NaCl	未结合
CM Sepharose	6.0	20 mM Phosphate	未结合
CM Sepharose	5.0	20mM NaAc 40mM NaCl	结合
CM Sepharose	5.0	20mM NaAc100mM NaCl	未结合
CM Sepharose	4.0	20mM NaAc150mM NaCl	部分结合
DEAE Sepharose	4.0	20mM NaAc 400mM	未结合

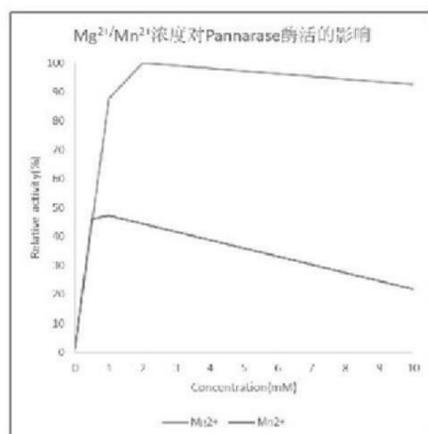
Pannarase 产品性能

1. 单价阳离子对 Pannarase 酶活性的影响



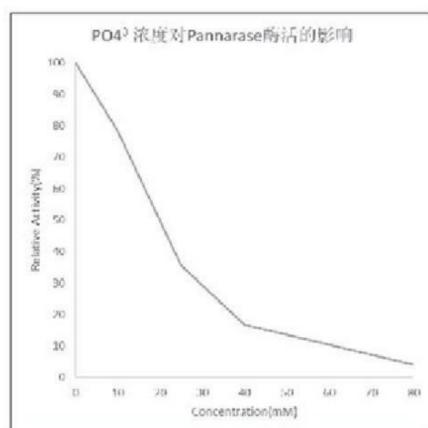
Na⁺/K⁺ 强烈抑制 Pannarase 的核酸内切酶活性，浓度超过300mM 时酶活性完全丧失。

2. 二价阳离子对 Pannarase 酶活性的影响



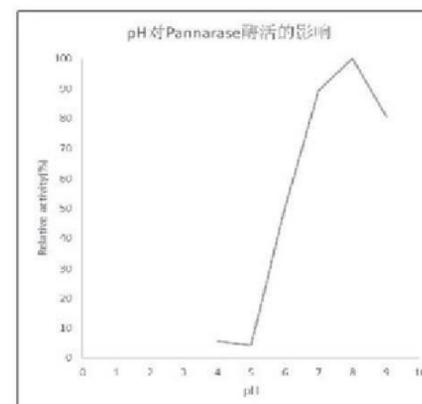
1-2mM Mg²⁺/Mn²⁺ 对于 Pannarase 内切酶活性是必需的，Mg²⁺ 是首选因其可以使酶达到最适活性。

3. PO4³⁻ 浓度对 Pannarase 酶活性的影响



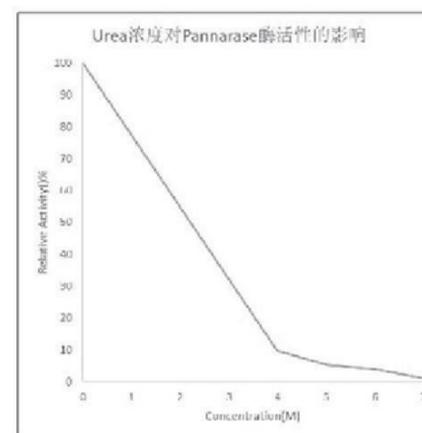
PO₄³⁻ 强烈抑制 Pannarase 酶的活性，80mM 左右即可使 Pannarase 酶完全失活。（此实验孵育缓冲液为 Tris-PO₄³⁻ 缓冲液）

4. 不同 pH 条件下 Pannarase 酶活性比较



Pannarase 酶活性最适 pH 为 8.0-9.2。

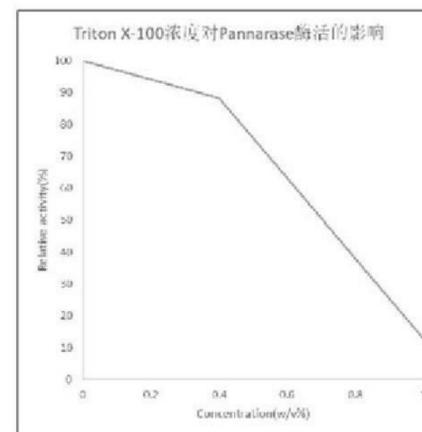
5. Urea 浓度对 Pannarase 酶活性的影响



在低浓度的 Urea 条件下 Pannarase 酶仍可保持较高的活性，同时在较高浓度 Urea 时也可以使用

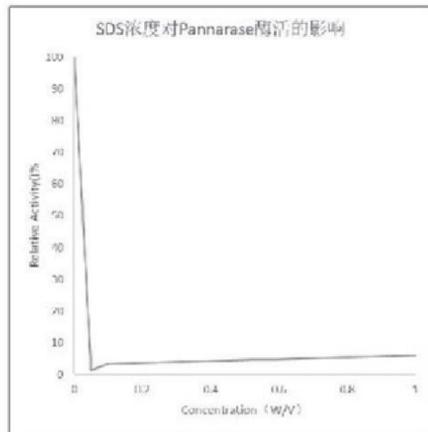
Pannarase 酶去除核酸，此时可以通过加大酶量来补偿酶活力较低情况的影响。

6. Triton X-100 浓度对 Pannarase 酶活性的影响



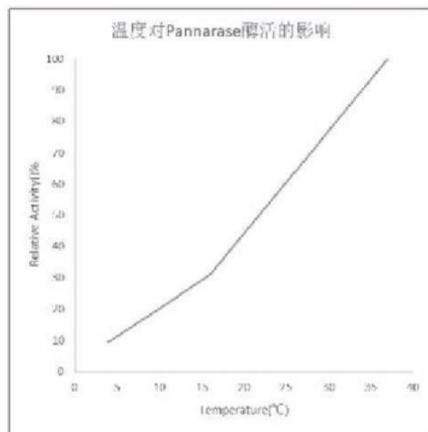
在标准酶活测定反应体系中添加相应的待测去污剂来评估去污剂对 Pannarase 酶活性的影响。当 TritonX-100 浓度小于 0.4% 时对 Pannarase 酶活性无影响。

7. SDS 浓度对 Pannarase 酶活的影响



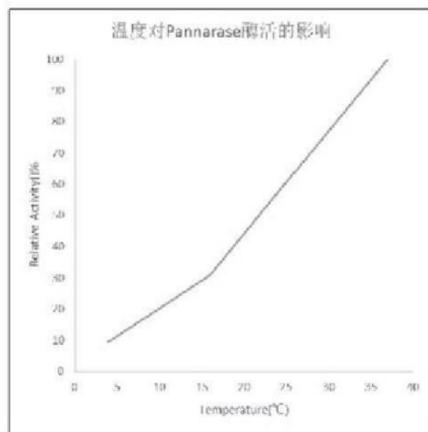
SDS 对 Pannarase 核酸酶活性有很强的抑制作用，即使在0.05%的浓度下也会导致酶活性完全失活。

8. 温度对 Pannarase 酶活的影响



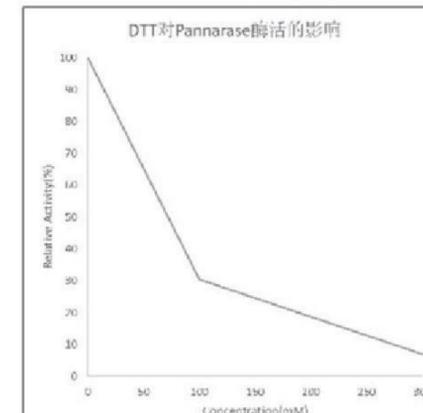
37°C为Pannarase 酶最适温度，酶活力会随温度下降而下降，如需低温使用该酶，可适当延长孵育时间。会涉及酶去除处理的问题不推荐加大酶量的处理方式。

9. 不同浓度 β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol, β-ME)对 Pannarase 酶活性的影响



Pannarase 酶能耐受较高浓度的 β-巯基乙醇，0-100mM β-ME 存在的情况下，Pannarase 酶可保持90%以上的活性，而当 β-ME 浓度大于100mM 时，Pannarase 酶依然是有活性的。

10. 不同浓度二硫苏糖醇(DTT) 对 Pannarase 酶活性的影响



Pannarase 酶能耐受较高浓度的 DTT, 0-100mM DTT存在的情况下，Pannarase 酶仍保持90%以上的活性，而当DTT 浓度低于300mM 时，Pannarase 酶依然保持有活性的。

11. 质粒 DNA 切割实验

Plasmid DNA cleavage assay

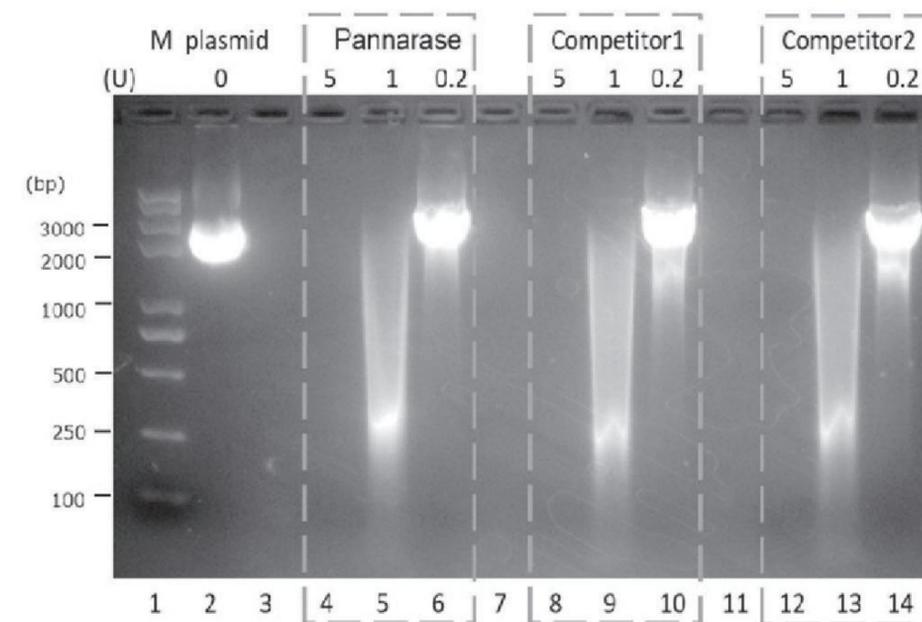


Fig. Comparison of the Pannarase and other nucleases in different amount of nuclease by plasmid DNA cleavage assay.

将底物质粒用测定缓冲液(50 mM Tris-HClpH8.0, 1mM MgCl₂, 0.1mg/mLBSA) 稀释至1mg/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。