

Uso exclusivo para pesquisa.

Proteinase K

No. Catálogo	Especificação	Armazenamento/Validade
CV-9016	1mL	-20°C/2 anos

Introdução

A Proteinase K é uma protease de serina que pertence à família das subtilisinas. Ela possui atividade enzimática extremamente alta e ampla especificidade de substrato. Pode decompor preferencialmente as ligações éster e peptídicas adjacentes ao C-terminal de aminoácidos hidrofóbicos, aminoácidos contendo enxofre e aminoácidos aromáticos. É frequentemente utilizada para degradar proteínas e produzir peptídeos curtos. Apresenta a tríade catalítica típica Asp39-His69-Ser224, característica exclusiva das proteases de serina, e possui dois sítios de ligação de Ca^{2+} ao redor do centro ativo, o que aumenta sua estabilidade, permitindo manter alta atividade enzimática sob condições mais amplas.

Propriedades Enzimáticas

Fonte:	Limbert Candida albicans
Classificação:	EC 3.4.21.64
Peso molecular:	29 kDa (SDS-PAGE)
Ponto isoelétrico:	7.81
pH ótimo:	7.0-12.0, todos com alta atividade
Temperatura ótima:	65°C
Estabilidade de pH:	pH 4.5-12.5 (25°C, 16 h)
Estabilidade térmica:	Abaixo de 50°C (pH 8.0, 30min)
Ativador:	SDS, Ureia
Inibidor:	DFIP, PMSF

Uso exclusivo para pesquisa.

Condições de Armazenamento

No estado de pó seco pode ser armazenado a -20°C por longo tempo; após dissolução, deve ser dividido em volumes apropriados, armazenado a curto prazo a 2-8°C e a longo prazo a -20°C.

Método de definição da atividade

A atividade enzimática unitária é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar caseína e produzir 1 µmol de tirosina por minuto nas seguintes condições.

Aplicação

1. Kit de diagnóstico genético;
2. Kit de extração de RNA e DNA;
3. Extração de componentes não proteicos de tecidos e degradação de impurezas proteicas, como preparação de vacinas de DNA e heparina;
4. Preparação de DNA cromossômico para eletroforese de pulso;
5. Western Blot;
6. Para o desenvolvimento e produção em massa de reagentes de albumina glicosilada enzimática na área de diagnóstico in vitro.

Preparação do Reagente

- **Reagente I:** Substrato: solução de caseína de leite a 1%: dissolver 1 g de caseína de leite em 50 ml de solução de fosfato de sódio 0,1 M, pH 8.0, incubar em banho-maria a 65-70°C por 15 min, mexer para dissolver, resfriar em água corrente, ajustar o pH para 8.0 com hidróxido de sódio e completar o volume para 100 ml.
- **Reagente II:** Solução de TCA: ácido tricloroacético 0,1 M, acetato de sódio 0,2 M, ácido acético 0,3 M, ajustar o pH para 4.03 com HCl, volume 100 ml.
- **Reagente III:** Solução de carbonato de sódio 0,4 M.
- **Reagente IV:** Reagente de Folin: diluir 5 vezes com água.
- **Reagente V:** Diluidor de enzima: solução de fosfato de sódio 0,1 M, pH 8.0.
- **Reagente VI:** Solução de tirosina: 1 µg/ml de tirosina, dissolver em HCl 0,2 M.

Passos

1. Incubar 0,5 ml do reagente I a 37°C por 10 min, adicionar 0,5 ml da solução enzimática, misturar bem e reagir a 37°C por 10 min;
2. Adicionar 1 ml do reagente II para interromper a reação, misturar bem e incubar por 30 min;
3. Centrifugar a solução de reação;

4. Tomar 0,5 ml do sobrenadante e adicionar 2,5 ml do reagente III, 0,5 ml do reagente IV, misturar bem e incubar por 30 min a 37°C;
5. Medir OD1 a 660 nm; grupo de controle em branco: usar 0,5 ml do reagente V em vez da solução enzimática, medir OD2;
6. Adicionar 0,5 ml do reagente VI, 2,5 ml do reagente III, 0,5 ml do reagente IV, misturar bem e incubar por 30 min a 37°C. Medir OD3 a 660 nm; grupo de controle em branco: usar 0,5 ml de HCl 0,2 M em vez do reagente VI, medir OD4.

Cálculo de Vitalidade

Atividade volumétrica (U/mL)

- $(OD1-OD2) \times df \times 2 / (OD3-OD4) \times 10 \times 181.2 \times 0.5$

Atividade em peso (U/mg)

- Atividade volumétrica $\times 1/C$
- 2: Volume total da solução de reação (mL);
- 0,5: Volume da solução enzimática (mL);
- 10: Tempo de reação (min);
- df: Fator de diluição;
- 181.2: Peso molecular da tirosina;
- C: Concentração da enzima (mg/mL).

Uso exclusivo para pesquisa.