

Gebrauchsanweisung



Proteinase K – Lösung

20 mg/ml

Isoliert aus *Tritirachium album*.

Proteinase K ist eine Serinprotease des Subtilisintyps mit starker proteolytischer Aktivität. Die Proteinase wird von differenzierten Kulturen des Schimmelpilzes *Tritirachium album* sekretiert, wobei das ‚K‘ im Namen den Verdau von Keratin zur Deckung des Kohlen- und Stickstoffhaushaltes des Pilzes anzeigt.

Proteinase K ist ein recht unspezifisches Enzym mit einer breiten Variabilität der geschnittenen Peptidbindungen, allerdings zeigt sie eine Vorliebe für Bindungen C-terminal von aromatischen und ungeladenen Aminosäuren. Das Enzym besitzt zwei Bindungsstellen für Ca^{2+} Ionen, die zwar nicht in die Katalyse eingreifen, aber zur strukturellen Stabilität des Proteins beitragen. Obwohl die Aktivität bei Abwesenheit von Ca^{2+} leicht vermindert ist, ist die Gesamtaktivität aber dennoch so hoch, dass ein Proteinase K Verdau meist unter Anwesenheit von EDTA durchgeführt wird. Da Proteinase K weiterhin native Proteine sehr effektiv schneidet, kann sie hervorragend zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Gewebe eingesetzt werden.

Dieses rekombinante Enzym wird in *Pichia pastoris* exprimiert und einer umfassenden Reinigung unterzogen, um ein Produkt höchster Qualität zu erhalten.

Spezifische Aktivität: ≥ 800 U/ml

Fremdaktivität: RNase und DNase nicht nachweisbar.

Temperatur-Optimum: +65 °C

Die Aktivität ist bei +65 °C ca. 12 x höher als bei +25 °C. Über +65 °C erfolgt Inaktivierung durch Denaturierung.

Stabilität: pH 4,0-12,5

pH-Optimum: 8,0

Stabil auch bei Anwesenheit von denaturierenden Agenzien wie SDS und Harnstoff. Ca^{2+} -Ionen (1-5 mM) verhindern Autolyse.

Aktivatoren: Denaturierende Agenzien wie SDS, Harnstoff. Aktivierung durch Selbst-Verdau nicht nötig.

Inhibitoren: Inhibition durch Hg^{2+} -Ionen, DFP, PMSF und Phenol. Keine nennenswerte Inhibition durch EDTA, Sulfhydryl-Reagenzien und Trypsin- bzw. Chymotrypsininhibitoren.

Inaktivierung: Hitzedenaturierung (20 min, 75°C)

Anwendungshinweise:

Arbeitskonzentration: 20 mg/ml

Lagertemperatur der Stammlösung: -20 °C

Reaktionspuffer:

50 mM Tris-HCl; pH 7,5; 5 mM $CaCl_2$; 0,5 % SDS

Anwendungen:

- Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen (3 h, 50°C). 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,5 % SDS, 20 µg/ml DNase freie RNase, 100 µg/ml Proteinase K
- Isolation genomischer DNA aus Mausschwänzen (über Nacht, 55°C) 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0), 400 mM NaCl, 1 % SDS, 400 µg/ml Proteinase K
- Schnelle Isolation von genomischer DNA als PCR-Template aus Zellkulturen (1 h, 37°C) 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 mM Ammoniumsulfat, 5 mM β -Mercaptoethanol, 6,7 mM $MgCl_2$, 6,7 µM EDTA (pH 8,0), 1,7 µM SDS, 50 µg/ml Proteinase K
- Präparation von DNA für die PFGE, Lyse im Agaroseblock (ca. 20 h, 50°C). 100 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 20 mM NaCl, 1 % Sarcosyl, 100 µg/ml Proteinase K
- Reinigung von mRNA vor der cDNA Synthese (führt oftmals zur Steigerung der cDNA Ausbeute) (1-2 h, 37°C). 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH

8,0), 50 mM NaCl, 0,1 % SDS, 5 µg/ml Proteinase K

- Aufreinigung von PCR-Ansätzen vor der Klonierung (über Nacht, 55°C). PCR-Ansätze + 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0), 400 mM NaCl, 1 % SDS, 400 µg/ml Proteinase K
- Aufreinigung von Plasmid-DNA vor *in vitro* Transkription (1 h, 37°C) Plasmid-DNA + 21 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,5 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K
- RNase Inaktivierung im Ribonuklease-*Protection*-Assay (30 min, 37°C) 30 µl RNA/RNA-Hybridisierungsmix + 300 µl RNase-Verdau Mix + 0,6 % SDS, 300 µg/ml Proteinase K
- Inaktivierung der DNase in Transkriptions-*Run-On*-Assays. (30 min, 42°C) Suspension der Zellkerne in 36 mM Tris-HCl (pH 7,4), 17 mM $MgCl_2$, 0,7 mM $CaCl_2$, 170 mM NaCl, 13 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % SDS mit DNase, 100 µg/ml Proteinase K
- Denaturierung der Alkalinen Phosphatase beim Dephosphorylieren von Vektor DNA (30 min, 56°C) 1 x Dephosphorylierungspuffer + 0,5 % SDS, 5 mM EDTA (pH 8,0), 100 µg/ml Proteinase K

Lagertemperatur der Stammlösung: -20 °C (Aliquots)

Gefahr H317- H334

P280 - P302 + P352 - P333 + P313

Proteinase K	1 ml	Glas	3719.1
	5 ml	Glas	3719.2

Instructions for use



Proteinase K – solution

20 mg/ml

Isolated from *Tritirachium album*.

Proteinase K is a serine protease of the subtilisin type with strong proteolytic activity. The proteinase is secreted from differentiated cultures of the mould fungus *Tritirachium album*. The 'K' in the name indicates the digestion of keratine to cover the carbon/nitrogen requirements of the fungus.

Proteinase K is a nonspecific enzyme with a wide variability of the cut peptide bonds. However, it has a preference to digest the C-terminal of aromatic and neutral amino acids. The enzyme has two binding sites for Ca²⁺ ions which do not really participate in the catalysis, but do contribute to the structural stability of the protein. Although activity is slightly reduced in the absence of Ca²⁺, the total activity is nevertheless so high that proteinase K digestion is usually performed in the presence of EDTA. Due to the high ability of proteinase K to cut native proteins, it is, also excellent for use in extraction of nucleic acids from tissues. This recombinant enzyme is expressed in *Pichia pastoris* and undergoes extensive purification to obtain a product of the highest quality.

Specific activity: ≥800 U/ml
Additional activity: RNase and DNase are not detectable.

Temperature optimum: +65 °C
Activity at +65 °C is approximately 12 x higher than at +25 °C.

Over +65 °C, inactivation due to denaturation.

Stability: pH 4.0 – 12.5

pH optimum: 8.0

Also stable when denaturing agents, e.g. SDS and urea are present. Ca²⁺-ions (1-5 mM) inhibit autolysis.

Activators: Denaturing agents such as SDS and urea.

Activation by autolysis is not required.

Inhibitors: Inhibition by Hg²⁺-ions, DFP, PMSF and phenol. No significant inhibition by EDTA, sulfhydryl-reagents and trypsin- or chymotrypsin inhibitors.

Inactivation: Heat-denaturation (20 min, 75 °C).

Application:

Stock solution: 20 mg/ml in water

Storage temperature (stock solution): -20 °C

Standard reaction buffer:

50 mM Tris-HCl; pH 7,5; 5 mM CaCl₂; 0,5 % SDS

Protocol:

- Isolation of genomic DNA from mammalian cells (3 h, 50 °C)
10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.5% SDS, 20 µg/ml DNase free RNase, 100 µg/ml proteinase K
- Isolation of genomic DNA from mice tails (overnight, 55 °C)
20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 400 mM NaCl, 1 % SDS, 400 µg/ml proteinase K
- Rapid isolation of genomic DNA as a PCR-template from cell cultures (1 h, 37 °C)
67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM ammonium sulfate, 5 mM β-mercaptoethanol, 6.7 mM MgCl₂, 6.7 µM EDTA (pH 8.0), 1.7 µM SDS, 50 µg/ml proteinase K
- Preparation of DNA for PFGE, lysis in agarose block (app. 20 h, 50 °C).
100 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 1 % sarcosyl, 100 µg/ml proteinase K

- Purification of mRNA prior to cDNA synthesis (often leads to an increase in cDNA yield) (1-2 h, 37 °C)
100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.1 % SDS, 5 µg/ml proteinase K
- Purification of PCR-reactions prior to cloning (overnight, 55 °C)
PCR-reaction + 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 400 mM NaCl, 1 % SDS, 400 µg/ml proteinase K
- Purification of plasmid-DNA prior to *in vitro* transcription (1 h, 37 °C)
Plasmid-DNA + 21 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.5 % SDS, 100 µg/ml proteinase K
- RNase inactivation in ribonuclease-protection-assays (30 min, 37 °C)
30 µl RNA/RNA-hybridisation mix + 300 µl RNase-digestion mix + 0.6 % SDS, 300 µg/ml proteinase K
- Inactivation of DNase in transcription-run-on-assays (30 min, 42 °C)
Suspension of nuclei in 36 mM Tris-HCl (pH 7.4), 17 mM MgCl₂, 0.7 mM CaCl₂, 170 mM NaCl, 13 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 % SDS with DNase, 100 µg/ml proteinase K
- Denaturation of alkaline phosphatase when dephosphorylating vector DNA (30 min, 56 °C)
1 x dephosphorylation buffer + 0.5 % SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0), 100 µg/ml proteinase K

Storage temperature of stock solution: -20 °C (aliquots)

 **Danger H317- H334**

P280 - P302 + P352 - P333 + P313

Proteinase K	1 ml	Glas	3719.1
	5 ml	Glas	3719.2

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe
Phone: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.com • www.carlroth.com ip 07/2021

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.