



## Proteinase K

lyophilisiert, ≥30 U/mg

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<sup>2+</sup> Ionen, die zwar nicht in die Katalyse eingreifen, aber zur strukturellen Stabilität des Proteins beitragen. Obwohl die Aktivität bei Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> 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.

**Aktivität:** 30 mAnson-U/mg (Hämoglobin, pH 7,5; 25 °C)

**Fremdaktivität:** RNase und DNase nicht nachweisbar.

**Übliche Arbeitstemperatur:** 37°C bis 56°C. (Temperatur-Optimum +65 °C).

**Stabilität:** pH 4,0-12,5, stabil auch bei Anwesenheit von denaturierenden Agenzien wie SDS und Harnstoff. Ca<sup>2+</sup>-Ionen (1-5 mM) verhindern Autolysis.

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

**Inhibitoren:** Inhibition durch Hg<sup>2+</sup>-Ionen, DFP, PMSF und Phenol. Keine nennenswerte Inhibition durch EDTA,

Sulfhydryl-Reagenzien und Trypsin- bzw. Chymotrypsininhibitoren.

**Inaktivierung:** Hitzedenaturierung (20 min, 75°C)

### Anwendungshinweise:

**Stammlösung:** 20 mg/ml in Wasser oder 50 mM Tris (pH 8,0), 1,5 mM Calciumacetat

**Arbeitskonzentration:** siehe Beispiele.

### Standardreaktionspuffer:

Zelllyse: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 % SDS

DNA-Reinigung: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM EDTA; 500 mM NaCl

### Anwendungen:

- Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen (3 h, 50°C). 10 mM Tris-Cl (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-Cl (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-Cl (pH 8,8), 16,6 mM Ammoniumsulfat, 5 mM β-Mercaptoethanol, 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 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-Cl (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-Cl (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-Cl (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-Cl (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-Cl (pH 7,4), 17 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 170 mM NaCl, 13 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % SDS mit DNase, 100 µg/ml Proteinase K
- Denaturierung der Alkalinen Phosphatase beim Cippen von Vektor DNA (30 min, 56°C) 1 x Dephosphorylierungspuffer + 0,5 % SDS, 5 mM EDTA (pH 8,0), 100 µg/ml Proteinase K

**Best.-Nr. 7528.3:** Durch Zugabe von 25 ml Puffer oder Wasser kann direkt eine Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mg/ml angesetzt werden. Lösung nach dem Ansetzen steril filtrieren und aliquotiert auf -20 °C lagern.

**Lagertemperatur der Stammlösung:** -20 °C (Aliquots)

**Gefahr** H315-H319-H334-H317-H335

P260-P280-P342+P311

<b>Proteinase K</b>	<b>100 mg</b>		<b>7528.1</b>
	<b>250 mg</b>	Glas	<b>7528.5</b>
	<b>500 mg</b>	Glas	<b>7528.2</b>
	<b>500 mg</b>	30 ml-Glasfläschchen	<b>7528.3</b>
	<b>1 g</b>	Glas	<b>7528.4</b>
	<b>5 g</b>	Glas	<b>7528.6</b>

# Proteinase K

lyophilized,  $\geq 30$  U/mg

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 an extremely nonspecific enzyme with a wide variability of cut peptide bonds. However, it has a preference to digest C-terminally of aromatic and neutral amino acids. The enzyme has two binding sites for  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ , the total activity is nevertheless so high that proteinase K digestion is usually performed under the presence of EDTA. Due to the high ability of proteinase K to cut native proteins, it is, furthermore, excellent for use in extraction of nucleic acids from tissue.

**Activity:** 30 mAnson-U/mg (haemoglobin, pH 7.5; 25 °C)

**Additional activity:** RNase and DNase are not detectable.

**Normal operating temperature:** 37 °C to 56 °C (temperature-optimum +65 °C).

**Activators:** Denaturing agents such as SDS and urea. Activation through autolysis is not required.

**Inhibitors:** Inhibition through  $\text{Hg}^{2+}$ -ions, DFP, PMSF and phenol. No significant inhibition through EDTA, sulfhydryl-reagents and trypsin- or chymotrypsin inhibitors.

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

## Application:

**Stock solution:** 20 mg/ml in water or 50 mM Tris (pH 8.0), 1.5 mM calcium acetate.

**Working concentration:** see examples.

## Standard reaction buffer:

Cell lysis: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0.5 % SDS

DNA-purification: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 50 mM EDTA; 500 mM NaCl

## Protocol:


- Isolation of genomic DNA from mammal cells (3 h, 50 °C)  
10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.5% SDS, 20  $\mu\text{g/ml}$  DNase free RNase, 100  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K
- Isolation of genomic DNA from mice tails (overnight, 55 °C)  
20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 400 mM NaCl, 1 % SDS, 400  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K
- Rapid isolation of genomic DNA as a PCR-template from cell cultures (1 h, 37 °C)  
67 mM Tris-Cl (pH 8.8), 16.6 mM ammonium sulfate, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 6.7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6.7  $\mu\text{M}$  EDTA (pH 8.0), 1.7  $\mu\text{M}$  SDS, 50  $\mu\text{g/ml}$  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-Cl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 1 % sarcosyl, 100  $\mu\text{g/ml}$  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-Cl (pH 7.5), 10 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.1 % SDS, 5  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K
- Purification of PCR-reactions prior to cloning (overnight, 55 °C)  
PCR-reaction + 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 400 mM NaCl, 1 % SDS, 400  $\mu\text{g/ml}$

proteinase K

- Purification of plasmid-DNA prior to *in vitro* transcription (1 h, 37 °C)  
Plasmid-DNA + 21 mM Tris-Cl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.5 % SDS, 100  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K
- RNase inactivation in ribonuclease-protection-assays (30 min, 37 °C)  
30  $\mu\text{l}$  RNA/RNA-hybridisation mix + 300  $\mu\text{l}$  RNase-digestion mix + 0.6 % SDS, 300  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K
- Inactivation of DNase in transcription-run-on-assays (30 min, 42 °C)  
Suspension of nuclei in 36 mM Tris-Cl (pH 7.4), 17 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.7 mM  $\text{CaCl}_2$ , 170 mM NaCl, 13 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 % SDS with DNase, 100  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K
- Denaturation of alkaline phosphatase when cipping vector DNA (30 min, 56 °C)  
1 x dephosphorylation buffer + 0.5 % SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0), 100  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K

**Art. No. 7528.3:** A stock solution with a concentration of 20 mg/ml can be directly prepared by adding 25 ml buffer or water to the flask. Filtrate through 0.2  $\mu\text{m}$  filters and store aliquoted at -20 °C.

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

 **Gefahr** H315-H319-H334-H317-H335

P260-P280-P342+P311

Proteinase K	100 mg		7528.1
	250 mg	glass	7528.5
	500 mg	glass	7528.2
	500 mg	30 ml glass flask	7528.3
	1 g	glass	7528.4
	5 g	glass	7528.6

## 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.

**Stability:** pH 4.0 – 12.5, also stable in the absence of denaturing agents such as SDS and urea.  $\text{Ca}^{2+}$ -ions (1-5 mM) inhibit autolysis.