

PROTEINASE K – FRAGEN UND ANTWORTEN

FRAGE

ANTWORT

	FRAGE	ANTWORT
	Was sind die spezifischen Eigenschaften von Proteinase K?	<p>Proteinase K ist eine unspezifische Serinprotease mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität. Sie ist in An- und Abwesenheit von SDS and EDTA aktiv. Das Enzym wird verwendet für</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) Verdauung von unerwünschten Proteinen in molekularbiologischen Anwendungen; (2) Entfernung von Endotoxinen, die an kationische Proteine wie Lysozym und RNase A gebunden sind; (3) Entfernung von Nukleasen für die In-situ-Hybridisierung; (4) Prionen-Forschung bezüglich TSE (Transmissible Spongiforme Enzephalopathien); (5) Protease-Footprinting; (6) Isolierung von Mitochondrien; (7) Isolierung von genomischer DNA; (8) Isolierung von zytoplasmatischer RNA; (9) Isolierung von hochnativer DNA oder RNA.
Allgemein	Wie kann Proteinase K inaktiviert werden?	Proteinase K wird durch 10-minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Allerdings verbleibt dabei immer eine gewisse Restaktivität. – Protease-Inhibitoren wie PMSF und AEBSF können verwendet werden, um Proteinase K permanent zu inaktivieren.
	Welches ist die optimale Temperatur für die Aktivierung der Proteinase K?	Die Aktivität der Proteinase K nimmt mit steigender Temperatur zu, bis ein optimaler Bereich zwischen 50 und 65°C erreicht ist. Bei höheren Temperaturen erfolgt eine Entfaltung der Zielproteinen, was deren Degradation durch Proteinase K erleichtert.
	Welche wechselseitige Beziehung besteht zwischen Proteinase K und Kalzium?	Proteinase K bindet an zwei Ca ²⁺ -Ionen, welche für die Stabilität des Enzyms auch bei höheren Temperaturen notwendig ist. Ferner schützt Calcium die Proteinase K vor Autolyse.
	Wie sieht es mit der Aktivität von Proteinase K bei molekularbiologischen Anwendungen aus?	Proteinase K kann DNasen und RNasen inaktivieren. Laut Richard Tullis und Harvey Rubin sind beim Arbeiten mit DNase I folgende Reaktionsbedingungen interessant. In Gegenwart von Ca ²⁺ ist DNase I vor Proteinase K geschützt (Konzentration von 1mg/ml). RNase hingegen wird in Anwesenheit von Ca ²⁺ inaktiviert. Diese Eigenschaften sind vorteilhaft für eine Behandlung von kontaminierter RNase-freier DNase I oder zur Isolierung von hochpolymerisierter RNA.
Besonderheiten	Wird Proteinase K durch EDTA inaktiviert?	Diese häufig gestellte Frage betrifft die Chelatoren EDTA oder EGTA, welche keine direkte Wirkung auf die Enzymaktivität von Proteinase K haben. EDTA wird zusammen mit Proteinase K zur Entfernung von Kalzium bei der Reinigung von DNA oder RNA verwendet.
	Was sind die Aktivatoren von Proteinase K?	Zu den Proteinase-K-Aktivatoren gehören SDS (Natriumdodecylsulfat) und Harnstoff.
	Wie ist Proteinase K an der Zellyse beteiligt?	Proteinase K ist eine Breitspektrum-Protease, welche native Proteine verdauen kann. Bei der Zellyse mit anschließender DNA-Isolierung und -Reinigung kann im Lyse-Protokoll Proteinase K enthalten sein, weil diese Oberflächenproteine degradiert. Bei Verfahrensschritten der Resuspension und Lyse von Zellkernen enthält der Präparationspuffer Proteinase K, welche den Verdau von möglichen Nukleinsäure-abbauenden Proteinen unterstützt.
	Warum wird in vielen Rezepten für DNA-Extraktions-Lysepuffer die Anwesenheit von Proteinase K gefordert?	Proteinase K inaktiviert Nukleasen während des DNA-Extraktionsverfahrens. Dieses ist nötig, weil Proteinase K in der Lage ist, die Nukleasen zu verdauen, die dem Produkt schaden könnten.
Spezielle Anwendung	Warum ist das Wissen über die Aktivität von Proteinase K wichtig? Wie ist die Aktivität definiert?	<p>Die Enzymaktivität definiert die Anzahl der Mole oder mg des Substrats, welches von einem Enzym in einem bestimmten Zeitrahmen (z. B. µmol/min) umgesetzt wird. Die spezifische Aktivität hängt mit der Reinheit des Enzyms zusammen. Sie ist die Menge an Substrat, die von einer bestimmten Menge an Protein in einem Enzympräparat pro Zeiteinheit modifiziert wird.</p> <p>Enzym-Konzentration: Die Enzymkonzentration wird über die Anzahl der Aktivitätseinheiten pro Volumen bestimmt.</p>
	Wie wird eine Proteinase-K-Stammlösung hergestellt?	Zur Herstellung einer 20 mg/ml-Stammlösung wird diese nach Protokoll in Tris-Puffer und CaCl ₂ angesetzt.
	Wie lange ist die Proteinase K haltbar?	Stammlösung: Beim Aliquotieren der Stammlösung ist diese bei -20°C bis zu 1 Jahr haltbar. Lyophilisiertes Pulver: Bei -20°C bis zu 2 Jahre aufzubewahren.



PROTEINASE K – FRAGEN UND ANTWORTEN

FRAGE

ANTWORT

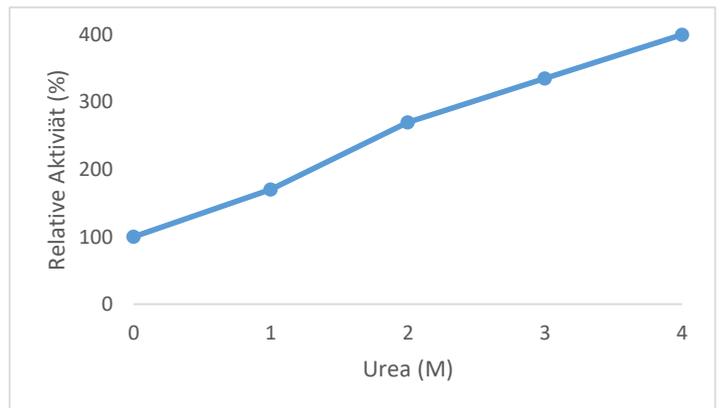
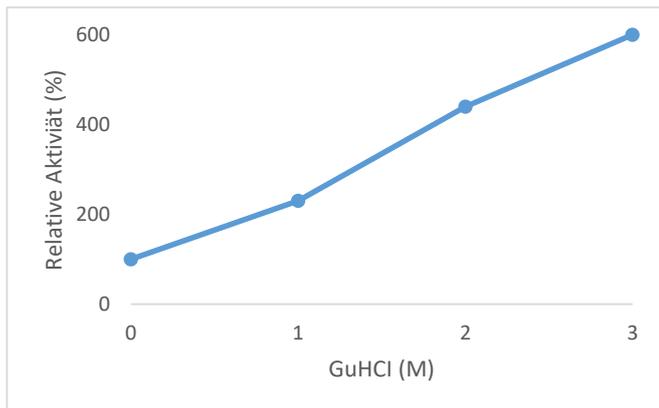
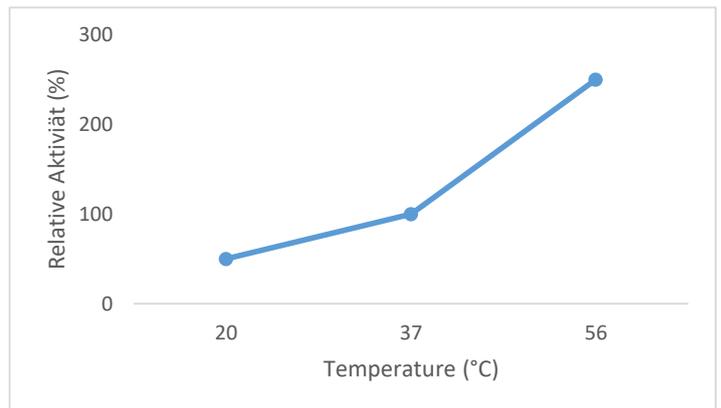
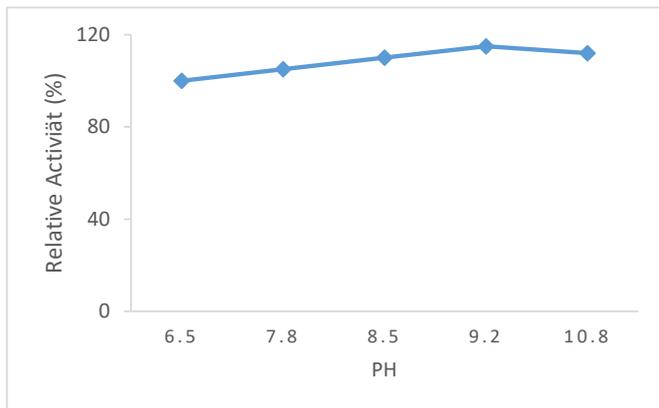
Was ist der Unterschied zwischen nativer und rekombinanter Proteinase K?

Native Proteinase K ist eine Serinprotease mit breitem Wirkungsspektrum. Das Enzym wird aus dem Pilz *Engyodontium album* (früher *Tritirachium album* Limber) gewonnen, gehört zur Subtilisin-Familie und besteht aus 279 Aminosäuren mit der katalytischen Triade Asp39-His69-Ser224 im aktiven Zentrum. Es ist in einem breiten Umgebungsspektrum stabil, was pH-Wert, Puffersalze, Detergenzien (z. B. SDS) und Temperatur betrifft. Wird Proteinase K 10 Minuten lang auf 95°C erhitzt, ist diese dadurch inaktiviert. Der Km-Wert (welcher die Affinität eines Enzyms für ein bestimmtes Substrat angibt) von rekombinanter Proteinase K ist nahezu identisch mit dem Km-Wert der nativen Proteinase K. Um bei der Herstellung die Ausbeute zu steigern, können schnell wachsende Hefewirtszellen der Arten *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces* und *Schizosaccharomyces* verwendet werden. Die rekombinante Proteinase K kann somit in größeren Mengen von höherer Reinheit erhalten werden. Das Produkt liegt in einer löslichen Form vor und weist annähernd die gleichen Eigenschaften auf wie die native Form aus den ursprünglich langsam wachsenden Pilzzellen. Allerdings wird das rekombinante Enzym bei Temperaturen über +65°C schnell denaturiert, wodurch auch die Haltbarkeit der rekombinanten Form herabgesetzt wird.

Wie verhält sich die Proteinase-K-Aktivität in verschiedenen Pufferumgebungen?

Siehe Diagramme unten

Spezielle Anwendung



Quelle: persönliche Korrespondenz 1997

Buffer	Proteinase K Activity (%)
30 mM Tris	100
30 mM Tris-HCl; 30 mM EDTA; 5% Tween 20, 0,5% Tergitol™; 800 mM GuHCl	313
36 mM Tris-HCl; 36 mM EDTA; 5% Tween 20; 0,36% Tergitol™; GuHCl	301
10 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA; 1200 mM NaCl; 0,5% SDS	128
10 mM Tris-HCl; 100 mM EDTA; 20 mM NaCl; 1% Sarkosyl	74
10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 15 mM MgCl; 0,45% Tween 20; Tergitol™	106
10 mM Tris-HCl; 100 mM EDTA; 0,5% SDS	120
30 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 1% SDS	203

