



重组全能核酸酶

产品介绍

本公司生产的全能核酸酶($\geq 99\%$, with His-tag)(同 Benzonase Nuclease)是一种来源于粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的非特异性核酸内切酶,可在非常宽泛的条件下降解单链、双链、线状、环状、天然或变性等各种形式的 DNA 或 RNA,产生长度为 3 至 5 个碱基的 5'-单磷酸寡核苷酸。本产品用途广泛,常用于重组蛋白、病毒疫苗等生物制品中去除核酸,以及有效降低细胞、组织、微生物等蛋白裂解液样品的粘度等。本产品带有 N 端 His-tag,可以通过镍柱吸附去除。本产品为超纯级,纯度 $\geq 99\%$,无蛋白酶活性,内毒素极低, $<0.25\text{EU/KU}$ 。全能核酸酶,又称超级核酸酶或广谱核酸酶,与 Benzonase endonuclease、TurboNuclease 等类似酶的氨基酸序列基本一致(主要是蛋白的氨基端或羧基端所带的标签或残留氨基酸序列略有不同),具有同样的酶催化活性和相同的用途,大多数情况下可以相互替代。具体使用时,需要注意纯度和内毒素水平对于后续分析检测的影响。超级核酸酶的稳定性非常好。37°C 保存 3-5 周,超级核酸酶能保持 $>90\%$ 的酶活性,在 25°C 保存 10 周后,酶活性基本没有变化。超级核酸酶采用自主研发技术平台表达、纯化,表达纯化获得的重组蛋白与 *Serratia marcescens* 中的天然核酸内切酶氨基酸序列完全一致, N 端融合 His-tag,没有额外的氨基酸,与天然粘质沙雷氏菌的核酸内切酶相比在生化特性方面相同。

别名(Synonyms)	全能核酸酶; 超级核酸酶; 广谱核酸酶; 活性核酸酶; Benzonase Nuclease; Benzonase Endonuclease; TurboNuclease, Universal Nuclease
CAS 号(CAS No.)	9025-65-4
分子量(MW)	~26.7kDa
外观(Physical appearance)	液体
活性(Biological activity)	50U/ μl
活力单位(Unit definition)	One unit of Super Nuclease is defined as the amount of enzyme that causes a ΔA_{260} of 1.0 (equivalent to the complete digestion of 37 μg DNA) in 30min.
纯度(Purity)	$\geq 99\%$ by SDS-PAGE, protease-free



配方(Formulation)	10mM Tris (pH7.4), 500mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 50% glycerol
-----------------	---

产品应用

有效去除重组蛋白中的核酸；有效去除病毒疫苗和普通重组病毒中的核酸，使其符合FDA 指南中核酸污染的要求；实时定量 PCR 测定重组病毒滴度时去除病毒包装细胞的核酸和包装质粒；降低细菌或细胞裂解液由核酸导致的粘度使其易于后续操作；防止细胞成团；提高包涵体蛋白(inclusion bodies)复性率；在二维凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)的过程中，提高蛋白质的分离效率和双向电泳的分辨率。

产品优势

本产品内毒素极低。本产品适用范围宽。本产品活性好，效果佳。本产品可有效降低细胞或细菌裂解液粘度。

使用说明

1.用于降低细胞、组织或细菌裂解液的粘度。

a.对于培养细胞样品：

(a)对于贴壁细胞：吸除细胞培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍(如果血清中的蛋白没有干扰，可以不洗)。每 1ml RIPA 裂解液、Western 及 IP 细胞裂解液或其它细胞裂解液中加入 0.1-1μl 本公司的超级核酸酶，然后按照裂解液的使用说明用于贴壁细胞的裂解。加入含有超级核酸酶的裂解液后，冰浴或室温孵育 5-30 分钟，收集裂解液，10000-14000 ×g 离心 3-5 分钟，取上清，即可用于后续的 PAGE、Western 和免疫沉淀等实验。

(b)对于悬浮细胞：250-1000×g 室温离心 5min，吸除上清，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍(如果血清中的蛋白没有干扰，可以不洗)，再离心收集细胞，轻轻 vortex 或者弹击管底以把细胞尽量分散开。如果细胞量较多，必须分装成 50-100 万细胞/管，然后再用于后续的裂解。每 1ml RIPA 裂解液、Western 及 IP 细胞裂解液或其它细胞裂解液中加入 0.1-1μl 本超级核酸酶，然后按照裂解液的使用说明用于贴壁细胞的裂解。加入含有超级核酸酶的裂解液后，冰浴或室温孵育 5-30 分钟，10,000-14,000×g 离心 3-5 分钟，取上清，即可用于后续的 PAGE、Western



和免疫沉淀等实验。裂解液用量说明: 通常 6 孔板每孔贴壁细胞或每 100 万动物细胞加入 100 微升裂解液已经足够, 但如果细胞密度非常高或者细胞比较大的情况, 可以适当加大裂解液的用量到 150-250 微升。

b. 对于组织样品:

(a) 把组织剪切成细小的碎片。

(b) 按照每 20 毫克组织加入 150-250 微升裂解液的比例加入 1ml RIPA 裂解液、Western 及 IP 细胞裂解液或其它细胞裂解液, 同时加入 0.1-1 μ l 本超级核酸酶。

(c) 用玻璃匀浆器匀浆, 或使用手持式组织研磨仪、高通量组织研磨仪进行研磨, 直至充分裂解。也可以把组织样品冷冻后液氮研磨, 研磨充分后加入裂解液进行裂解。

(d) 充分裂解后, 冰浴或室温孵育 5-30 分钟, 10,000-14,000 $\times$ g 离心 3-5 分钟, 取上清, 即可进行后续的 PAGE、Western 和免疫沉淀等操作。

(e) 如果组织样品本身非常细小, 可以适当剪切后直接加入裂解液裂解, 通过强烈 vortex 使样品裂解充分。然后同样离心取上清, 用于后续实验。直接裂解的优点是比较方便, 不必使用匀浆器或研磨设备, 缺点是不如匀浆或研磨那样裂解得比较充分。

c. 对于细菌或酵母样品:

(a) 对于 1ml 菌液或酵母液, 离心去上清, 如果有必要可以使用 PBS 洗涤一次, 充分去除液体后, 轻轻 vortex 或者弹击管底以把细菌或酵母尽量弹散。加入 100-200 微升 RIPA 裂解液或其它细胞裂解液, 同时加入 0.1-1 μ l 本公司的超级核酸酶。

(b) 轻轻 vortex 或者弹击管底以混匀, 冰浴或室温孵育 5-30 分钟。如果希望获得更好的裂解效果, 细菌和酵母可以分别使用溶菌酶和破壁酶(Lyticase)消化, 然后再使用裂解液进行裂解。

注: RIPA 裂解液、Western 及 IP 细胞裂解液含有不同浓度的 Triton X-100 或 NP-40、SDS 及脱氧胆酸钠等, 对酶活性有一定的影响, 所以需要适当增加酶量或延长孵育时间。

2. 去除重组蛋白中的核酸:



重组蛋白生产时对核酸残留有严格的要求，很多情况可以参考如下描述以去除残留的核酸。生物样品中 DNA 浓度范围通常在 0.5-5 μ g/ml 之间，如下采用高负荷 DNA 浓度 50 μ g/ml 的鲑鱼精子 DNA 溶液进行的测试，反应缓冲液为 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA。

a. 37°C 反应 22h，反应液中超级核酸酶终浓度为 90U/ml 时，可降解所有 DNA；反应液中超级核酸酶终浓度为 9U/ml 时，可降 95% 的 DNA。

b. 反应液中超级核酸酶终浓度为 90U/ml 时，23°C 反应 30h 可降解所有 DNA；0°C 反应 30h 可降解 99% 的 DNA。

c. 样品在 10mM Tris (pH8.0) 缓冲液中，反应液中超级核酸酶终浓度为 90U/ml 时，23°C 反应 22h 可降解所有 DNA；样品在 PBS 缓冲液中，反应液中超级核酸酶终浓度为 90U/ml 时，23°C 反应 30h 可降 95% 的 DNA。

3. 去除重组病毒中的核酸：

对于在细胞中包装生产的重组病毒，在收集的细胞上清中直接加入超级核酸酶，使之终浓度约为 1U/ml，30-34°C 反应 4-8h，即可有效地将宿主细胞的核酸(DNA 及 RNA)降解为 3-5bp 的核酸片段。

4. 实时定量 PCR 法测定重组病毒滴度时去除核酸干扰：

在检测重组病毒滴度时，超级核酸酶可以去除病毒上清中基因组 DNA、RNA 和质粒等核酸干扰，通过在载体的长末端重复序列区(LTR)设计引物，利用荧光实时定量 PCR 测定重组病毒中 LTR 拷贝数来测定病毒颗粒数。建议在 PCR 管中按照下表体系进行设置，37°C 孵育 30min 去除核酸后，再对样品进行梯度稀释并实时定量 PCR 检测。超级核酸酶终浓度 1-5U/ml，Reaction Buffer: 10mM Tris pH8.0, 2mM MgCl₂, 0.1% PEG8000, 0.1mg/ml BSA.

Component	Volume
Sample (μ l)	5
超级核酸酶 (0.01-0.1U) (μ l)	x
Reaction Buffer (μ l)	50-x
Total Volume (μ l)	50

5. 防止细胞成团：



超级核酸酶加入细胞培养液中可以防止细胞成团，特别是在解冻细胞时。例如全血分离的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)解冻后易聚集在一起，影响后续分析和检测。如果在 PBMCs 冻存液中加入终浓度为 50U/ml 的超级核酸酶可以有效防止细胞成团。超级核酸酶不仅没有蛋白酶的活性，而且不会对健康细胞造成伤害，因此是防止细胞成团的理想选择。

6.降低大肠杆菌裂解液粘度，改善纯化过程中离心难、过滤难的问题：

大肠杆菌高密度发酵在增加菌密度的同时提高了重组蛋白的表达量，但是大肠杆菌破碎后释放的基因组 DNA 会导致裂解液粘度大，加大了离心和澄清过滤的难度。按照 0.2g 湿菌用 1ml 细菌裂解液重悬菌体，使用高压破碎仪 1500bar，4℃进行均质破碎。如果加入终浓度为 25U/ml 的超级核酸酶，15℃反应 15min，与不加超级核酸酶的细菌裂解液相比粘度降低 50%；如果加入终浓度为 2.5U/ml 超级核酸酶，15℃反应 30min，与不加超级核酸酶的细菌裂解液相比粘度降低 37%。

采用混纤膜(MCE)和聚醚砜膜(PES)，孔径分别为 0.4μm 和 0.8μm 的滤膜进行澄清测试，不加超级核酸酶的细菌裂解液几乎立即堵塞了滤膜，而终浓度为 25U/ml 的超级核酸酶处理过的细菌裂解液，在过滤时间为 20s 后，0.8μm 孔径的膜通量可以达到 7400L/m²h，0.45μm 孔径的膜通量可以达到 4200L/m²h。对于孔径较小的 0.22μm 滤膜，即使在使用 25U/ml 超级核酸酶消化后，过滤时也会立即发生堵塞，如果一定需要使用 0.22μm 滤膜过滤细菌裂解液，建议先用聚醚砜膜(PES)材质 0.45μm 孔径的滤膜过滤后再用 0.22μm 滤膜过滤，或者需要加大酶的用量或延长孵育时间。

7.提高包涵体蛋白复性率：

在大肠杆菌中以包涵体形式表达重组蛋白的方法，因其表达量高、蛋白纯度高、免受蛋白酶降解和可表达对宿主细胞有毒的蛋白而广泛应用。在包涵体蛋白变性后复性，即重折叠的过程中，由于细菌裂解液中大量的 DNA 可能会粘附蛋白酶，导致目的蛋白的降解，如果在细菌裂解液中加入终浓度为 1U/ml 超级核酸酶，37℃反应 30min，即可有效降低由于基因组 DNA 而粘附的蛋白酶，提高包涵体的纯度，最终提高包涵体蛋白复性率。

8.二维凝胶电泳样品的制备：



二维凝胶电泳用于分离复杂的蛋白质混合物，分辨率高。核酸是带负电荷的分子，可以与蛋白质表面带正电荷的区域相互作用形成复合物，这种核酸-蛋白质复合物的形成和形状很难预测。与纯蛋白质相比，这些核酸-蛋白质复合物在电场中的迁移方式不同，可能会导致蛋白质条带偏移，使二维凝胶电泳的分辨率差。如果按照每 100 μ l 细胞裂解液加入 50U 的超级核酸酶对样品进行预处理，可减少水平条纹，显著提高二维凝胶电泳分离的分辨率。另外，因为所需酶量较少，所以无需担心超级核酸酶的使用对二维凝胶电泳的结果的影响。

9. 常见问题:

a. 在使用过程中，应在哪一步加入超级核酸酶？

如果“使用说明”中没有相应的操作，一般是在培养后、捕获样品步骤之前添加。

b. 在低温条件下，应在加入多少超级核酸酶？

温度低于 37 $^{\circ}$ C 时，超级核酸酶的效率会降低，通常情况下，在不增加超级核酸酶使用量的情况下，可以通过延长孵育时间来补偿低温时的酶切效率低。

c. 为什么超级核酸酶不起作用？什么会抑制超级核酸酶的活性？

超级核酸酶在很宽泛的条件下都有酶活性，但是 Mg^{2+} 是超级核酸酶的关键催化辅助因子，反应液含有 1-2mM Mg^{2+} 对超级核酸酶的酶活性是必须的。 Mn^{2+} 可以替代 Mg^{2+} ，但是只有在 Mg^{2+} 存在的情况下，酶才能达到最佳的活性。如果阳离子浓度 >300mM、磷酸盐浓度 >100mM、硫酸铵浓度 >100mM 或者 >1mM EDTA 的情况下，超级核酸酶的酶活性会受到抑制。

d. 为什么超级核酸酶的酶活性下降？

通常来说超级核酸酶是十分稳定的，在极少数情况下酶活性下降。不可逆的酶失活可能是由于样品中存在变性剂、蛋白酶或者 -80 $^{\circ}$ C 冻融；可逆的酶失活可能是因为存在螯合剂(如 EDTA)或去除了超级核酸酶的关键催化辅助因子 Mg^{2+} 。

e. 不小心将超级核酸酶在室温放置了 2 天还能用吗？

本超级核酸酶非常稳定。即使在 37 $^{\circ}$ C 保存数周，超级核酸酶也能保持 >90% 的酶活性，在 25 $^{\circ}$ C 保存 10 周后，酶活性基本没有变化。

f. 如何抑制超级核酸酶的酶活性？



在阳离子浓度>300mM、磷酸盐浓度>100mM、硫酸铵浓度>100mM 或者>1mM EDTA的情况下, 超级核酸酶的酶活性会受到抑制, 但这些都是可逆的酶失活。只有在极端条件下(100mM NaOH, 70°C处理 30min)才能实现不可逆的酶失活。

g. 如何去除超级核酸酶?

可以通过下游纯化操作来完成, 如澄清液的深度过滤、浓缩的切向流过滤(TFF)、浓缩和色谱层析(如离子交换、分子筛、疏水层析)。对于全能核酸酶($\geq 99\%$, with His-tag)可以通过镍柱吸附去除。

h. 超级核酸酶是否具有蛋白酶活性?

否。超级核酸酶没有检测到蛋白酶活性, 因此在其“工作”期间不会降解目的蛋白。但是如果样品中存在蛋白酶, 可能会导超级核酸酶的不可逆降解。

i. 超级核酸酶是否与蛋白酶抑制剂兼容?

是。但是, 由于许多蛋白酶抑制剂中含有 EDTA, 而>1mM EDTA 的情况下超级核酸酶的酶活性会受到抑制, 因此应谨慎使用。

稳定性和储存

在-20°C下储存 (3 年); 收货后建议分装, 避免反复冻融, 密封。

注意事项:

1. 本产品不建议-80°C保存, 冻融可能会降低本产品的酶活性。
2. Mg^{2+} 是超级核酸酶的关键催化辅助因子, 反应缓冲液含有 1-2mM Mg^{2+} 对超级核酸酶的活性是必须的。
3. 参照最适范围和有效范围表格, 若使用的溶液较为特殊, 如为高盐溶液, 或偏酸性、偏碱性, 或含有较高浓度的去垢剂、变性剂等, 应适当增加超级核酸酶的用量或孵育时间。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。