

凝血酶 (Thrombin)

货号: BN23035

规格: 1000U

保存: -20°C保存, 有效期3年。

溶解方法:

可用生理盐水(0.9% NaCl溶液)配制, 储存液参考浓度为1000U/ml, -20°C保存可稳定6个月。为避免反复冻融, 可分装冻存。

产品应用:

一、凝血实验

凝血酶(Thrombin)来源于牛血浆, 分子量37KD, 是由两条肽链(31KD和6KD)通过二硫键组成的。凝血酶是凝血酶原(凝血因子II)激活后形成的蛋白质水解酶, 其催化纤维蛋白原(fibrinogen)水解掉A肽和B肽, 由此形成纤维蛋白单体, 单体进一步聚合, 在血小板、红细胞和白细胞等参与下形成血凝块。

凝血酶酶活: 固体活力: 50-200 单位/mg solid; 比活力: 比活力大于2000 单位/mg protein;

酶活检测方法: 以纤维蛋白原为底物, 按2010版药典凝血酶冻干粉检测。

产品稳定性好: 冻干产品在室温条件下考察12个月, 酶活力未见显著变化, 冷藏条件下保存36个月, 酶活力未见显著变化。

二、标签切割

由于凝血酶具有切割序列专一性强, 水解效率高的特点, 它也被广泛地应用于基因工程产品的开发, 其应用之一是作为工具蛋白酶用于重组融合蛋白质的特异性断裂, 尤其适用于生物工程制药业及基因工程、生物化学、分子生物学等研究。

凝血酶是一种广泛用于切割标签的蛋白酶, 凝血酶最佳切割位点是X4-X3-P-R[K]-X1'-X2', 这里X4和X3是疏水氨基酸而X1'和X2'是非酸性氨基酸, 一些经常使用的识别位点是L-V-P-R-G-S, L-V-P-R-G-F, 和M-Y-P-R-G-N。在X4-X3-P-R-G-X2'之间切割比在X4-X3-P-K-L-X2'更有效。其他识别位点是X2-R[K]-X1', 这里X2或者X1'是甘氨酸, 例如A-R-G和G-K-A, 这里切割发生在第二个残基后。在凝血酶切割位点和N末端标签之间插入五个甘氨酸残基可改善切, 通过这一"甘氨酸连接肽"只需较少酶量就可达到完全切割, 而且也可以避免可能发生的错误切割。

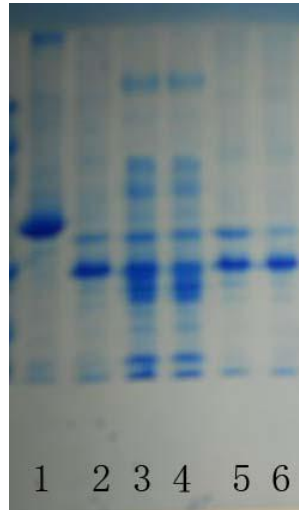
作为切割标签的蛋白酶具有以下特点:

1. 纯度高: SDS-PAGE检测图谱无杂蛋白条带;
2. 不含有其他蛋白酶活性;
3. 酶切活性高, 能够有效切质量比为1:1000的蛋白。切割可在20°C到37°C之间切割0.3到16小时。
4. 有效的酶切缓冲液是20mM Tris-HCl缓冲液, 含150mM氯化钠, pH8.0。
5. 凝血酶可从切割产物中用p-氨基琼脂糖亲和纯化, 或者苯甲脒琼脂糖移去。

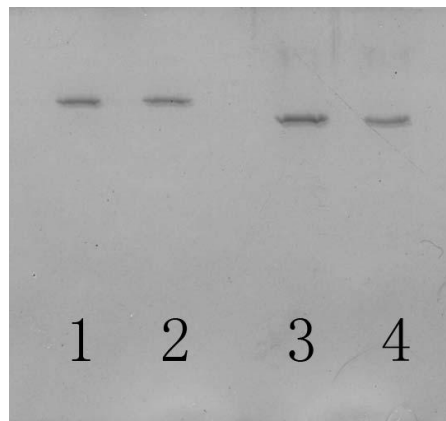
酶切条件: 凝血酶酶切条件举例: 20mM Tris-HCl缓冲液, 含150mM NaCl, pH8.0体系中:

融合蛋白总量 100 μ g
凝血酶用量 0.2-0.3U
温度 20 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C
酶切时间 0.3h-16h

根据底物蛋白酶切位点的差异，可以适当调整凝血酶的工作浓度与酶切时间，以便达到较好的酶切效果。



凝血酶切割样品 SDS-PAGE 比较图谱：泳道 1 为切割前样品，泳道 2 为采用 sigma 凝血酶（货号：T6634）切割后样品，泳道 3、4 为采用 sigma 凝血酶（货号：T4648）切割后样品，泳道 5、6 为采用自制凝血酶切割后样品。



SDS-PAGE 图谱：泳道 1 为自制凝血酶（非还原），泳道 2 为 sigma 公司凝血酶（非还原）；泳道 3 为自制凝血酶（还原），泳道 4 为 sigma 公司凝血酶（还原）。