

Universelles Proteasen-Substrat

Casein, Resorufin-markiert

Best. Nr. 1 080 733 15 mg

Best. Nr. 1 734 334 40 mg

Version 3, Jan. 2003

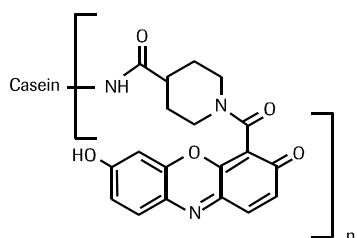
Stabil bei -15 bis -25° C

Produktbeschreibung

Herstellung

Casein aus Kuhmilch wurde mit aktiviertem Resorufin [N-(Resorufin-4-carbonyl)piperidin-4-carbonsäure-N'-hydroxy-succinimidester*] umgesetzt und mittels Gelchromatographie gereinigt. Pro mg Casein sind ca. 90 µg Resorufin gebunden (Nachweis durch Total-Hydrolyse mit Pronase*).

Struktur



Stabilität

Stabil bei -15 bis -25° C, trocken und lichtgeschützt gelagert. Eine wäßrige Lösung ist bei -15 bis -25° C mehrere Monate, bei 2-8° C 2-3 Tage stabil. Es wird empfohlen, wäßrige Lösungen in Aliquots bei -15 bis -25° C aufzubewahren.

Spektrale Eigenschaften des hydrolysierten Substrates

Absorptions (Anregungs)-Maximum im neutralen und alkalischen Bereich $\lambda = 574 \text{ nm}$, $e = 66000$ [$\text{l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$], im sauren Bereich $\lambda = 467 \text{ nm}$. Emissions-Maximum im neutralen und alkalischen Bereich $\lambda = 584 \text{ nm}$, im sauren Bereich $\lambda = 559 \text{ nm}$.

Anwendung

Das Präparat ist ein generelles Substrat für Proteasen und ist besonders gut zum Nachweis geringer Protease-Aktivitäten geeignet. Es kann in einem homogenen Assay eingesetzt werden und sowohl spektrophotometrisch als auch fluorimetrisch vermessen werden.

Prinzip

Bei Einwirkung von Proteasen auf Casein, Resorufin-markiert, werden Resorufin-markierte Peptide, die mit Trichloressigsäure nicht fällbar sind, freigesetzt. Diese dienen als Meßgröße für vorhandene proteolytische Aktivität.

Anwendungsbeispiel zur Bestimmung von proteolytischer Aktivität, modifiziert nach Twining (1)

Lösungen/Reagenzien

- I. Substrat-Lösung
0,4% Casein, Resorufin-markiert (w/v) in bidest. Wasser.
- II. Inkubations-Puffer
0,2 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,02 M CaCl₂.
- III. Probe-Lösung
- IV. Stopp-Reagenz
5% Trichloressigsäure (w/v) in bidest. Wasser.
- V. Test-Puffer
0,5 M Tris-HCl, pH 8,8.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: 574 nm (Absorptionsmessung); 584 nm (Emissionsmessung)
Schichtdicke: 1 cm
Inkubationstemperatur: 37° C

| In 1 ml Reagier-Gefäße pipettieren | Proben-leerwert | Probe |
|---|-----------------|--------|
| Substrat-Lösung (I) | 50 µl | 50 µl |
| Inkubations-Puffer (II) | 50 µl | 50 µl |
| bidest. Wasser | 100 µl | - |
| Probe-Lösung (III) | - | 100 µl |
| Bei 37° C über einem bestimmten Zeitraum (15 min bis über Nacht) inkubieren. Reaktion abstoppen durch Zusatz von | | |
| Stopp-Reagens (IV) | 480 µl | 480 µl |
| 10 min bei 37° C inkubieren, anschließend 5 min zentrifugieren und in Sarstedt-Küvetten pipettieren. | | |
| Zentrifugations-Überstand | 400 µl | 400 µl |
| Test-Puffer (V) | 600 µl | 600 µl |
| mischen und Extinktion der Probe gegen Leerwert bei 15-25° C sofort messen (= ΔE Probe); bzw. fluorimetrisch Differenz bestimmen. | | |

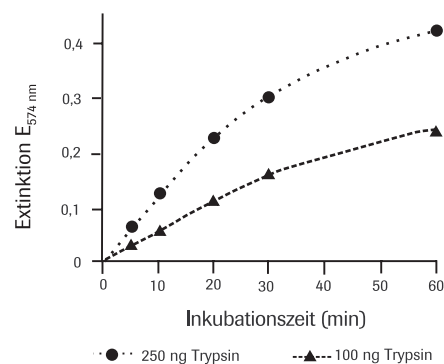


Abb. 1: Einfluß der Inkubationszeit auf die Casein-Resorufin-Hydrolyse durch Trypsin.

Ergebnis mit verschiedenen Proteasen

Limitierter und vollständiger Verdau von Casein-Resorufin durch verschiedene Proteasen

- a) Verdau durch kleine Mengen Proteasen (15 min)-Bestimmung der Nachweisgrenze
- b) Verdau durch große Mengen Proteasen über Nacht (Maximum der Totalhydrolyse)

| Enzym | Enzym-menge | $\Delta OD_{574 \text{ nm}}$ | Enzym-menge | Extinktion $\Delta E_{574 \text{ nm}}$ |
|---|-------------------|------------------------------|------------------|--|
| Pronase* | 0,1 μg | 0,11 | 1 mg | 1,9 |
| Trypsin, sequencing grade* | 0,1 μg | 0,07 | 20 μg | 1,06 |
| Endoproteinase Asp-N, sequencing grade* | 0,1 μg | 0,09 | 10 μg | 1,3 |
| Endoproteinase Lys-C, sequencing grade* | - | - | 5 μg | 0,39 |

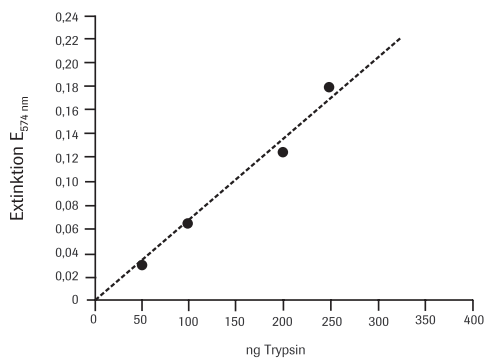


Fig. 2: Hydrolyse von Casein-Resorufin durch unterschiedliche Mengen Trypsin.

Vereinfachte Vorschrift zur Durchführung des Proteasetests mit Casein, Resorufin-markiert zum Nachweis von hohen Proteasekonzentrationen in Lösungen

Durchführung (in einem 1,5 ml Plastik Eppendorf Gefäß)

0,05 ml Casein, Resorufin-markiert (4 mg/ml H_2O)
0,05 ml 0,2 M Tris-HCl Puffer, pH 7,8,
0,02 M Calciumchlorid
0,1 ml Proteaselösung

Durchmischen und Farbänderung bei 15-25°C gegenüber einem Leerwert beobachten, der anstatt Proteaselösung Wasser enthält. Die Farbe verändert sich innerhalb kurzer Zeit von Blau-Violett nach Rot, wenn genügend Proteaseaktivität vorhanden ist. Die Farbbeobachtung erfolgt am günstigsten von oben bei geöffneten Eppendorf Gefäßen über einem weißen Blatt Papier.

Einige Ergebnisse beim Einsatz von verschiedenen Konzentrationen an Protease::

| Konzentration | Farbänderung innerhalb |
|---------------|------------------------|
| 2 mg/ml | ca. 1 min |
| 0,5 mg/ml | ca. 5 min |
| 0,2 mg/ml | ca. 10 min |

Literatur

- 1 Twining, S. S. (1984) *Anal. Biochem.* **143**, 30-34.
- 2 Schickaneder, E. et al (1988) "Casein-resorufin, a new substrate for a highly sensitive protease assay" *Fresenius Z. Anal. Chem.* **330**, 360.

* zu beziehen von Roche Applied Science

** Die Nachweisgrenze kann bei Einsatz von fluorimetrischer Analyse oder durch Verlängern der Inkubationszeit (z.B. über Nacht) erniedrigt werden.