

## 1. ОПИСАНИЕ

Непрозин — это секретируемая пролил-эндопротеаза, изначально обнаруженная в ловчих кувшинах растений рода *Nepenthes*, экспрессированная в *P. pastoris*.

## 2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

### ПРОТЕОЛИЗ В РАСТВОРЕ

1. Лиофилизат (50 мкг) растворить в 1 мл деионизованной воды.
2. Смешать: 1–10 мкг белка, 10 мкл 10X реакционного буфера, 20 мкл восстановленного раствора непрозина.
3. Довести водой до 100 мкл.
4. Инкубировать 15–60 мин при 37–50°C.
5. Добавить 20 мкл 5X буфера для остановки реакции.

### ПРОТЕОЛИЗ В ГЕЛЕ (ПААГ)

1. Поместите кусочек геля (~1 мм<sup>3</sup>) в пробирку.
2. Добавьте 10 мкл 10X буфера, 20 мкл непрозина и 70 мкл воды.
3. Инкубируйте 15–60 мин при выбранной температуре.

### 3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- Для максимальной эффективности расщепления «жестких» белков предварительно инкубируйте субстрат с 10 мМ DTT в течение 30 минут при 50°С.
- Оптимальное соотношение фермент : субстрат составляет от 1:5 до 1:50. Для новых объектов рекомендуется начинать с 1:20.
- Эффективность протеолиза критически зависит от кислотности. Убедитесь, что финальное значение pH смеси находится в диапазоне 2.0–3.0.
- Фермент устойчив к большинству стандартных ингибиторов, однако 10 мМ пепстатина снижает его активность примерно вдвое.
- Восстановленный фермент стабилен несколько месяцев при -20°С . Главное — избегать повторных циклов заморозки-разморозки, которые ведут к потере активности.

### 4. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

**1000 ЕД.**

1 пробирка: лиофилизат белка (получен из раствора в буфере 20 мМ Bis-Tris, 80 мМ NaCl, pH=7.2)

### 5. ХАРАКТЕРИСТИКИ

**АКТИВНОСТЬ**

**20 ед./мг**

**ИНАКТИВАЦИЯ**

**Не инактивируется большинством известных ингибиторов протеаз, кроме пепстатина**

## 6. СОСТАВ РАСТВОРОВ

Реакционный буфер (10x): 1M Gly-HCl, pH=2.5

5x СТОП Буфер: 1M Tris-HCl, pH=8.4

## 7. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За единицу активности было принято количество фермента, которое расщепляет 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 37°C и pH=2.5.

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Срок годности 1 год. Лиофилизат хранить при -20°C. Аликвоты разведенного фермента хранить при -20°C. Избегайте повторных циклов заморозки-разморозки. Не храните аликвоты в объеме менее 10 мкл.