

E2 Select Ubiquitin Conjugation Kit 重组人泛素结合酶筛选试剂盒

产品信息

产品名称	产品编号	规格
E2 Select Ubiquitin Conjugation Kit 重组人泛素结合酶筛选试剂盒	20440ES10	10 T

产品简介

泛素化是通过三个酶促步骤实现的。在 ATP 依赖的过程中，泛素激活酶(E1)催化与泛素形成活性硫酯键，然后转移到泛素载体蛋白的活性位点半胱氨酸(E2)。泛素级联对特定底物蛋白的选择性依赖于 E2 结合酶(细胞中包含的相对较少)和泛素-蛋白连接酶(E3)之间的相互作用，迄今为止已经鉴定出 600 多种这种酶。E3s 是一个大的，多样化的蛋白质组，其特征是几个确定的基序之一。这些包括 HECT(与 e6 相关蛋白 c 端同源)，RING(真正有趣的新基因)或 U-box(没有 Zn²⁺结合配体的完整补充的修饰的 RING 基序)结构域。而 HECT E3s 在泛素化过程中具有直接的催化作用，RING 和 U-box E3s 促进蛋白质泛素化。后两种 E3 类型充当适配器类分子。它们使 E2 和底物足够接近，从而促进底物的泛素化。虽然许多 RING-type e3，如 MDM2 和 c-Cbl，可以单独发挥作用，但其他一些是作为更大的多蛋白复合体的组成部分，如后期促进复合体。综上所述，这些多面的特性和相互作用使 E3s 能够利用泛素-蛋白酶系统，在真核生物的所有细胞中提供一种强大而具体的蛋白质清除机制。该筛选试剂盒集合了 11 种常用 E2 结合酶，可以筛选具有 E3 连接酶活性的蛋白所匹配的 E2 酶。

产品性质

来源(Source)	E.coli
分子量(Molecular Weight)	Ubiquitin 约 10 kDa, E1 酶大约 116 kDa, E2s11 种, E3 酶大约 102kDa,底物蛋白大约 40.7kDa。
外观(Physical Appearance)	泛素蛋白冻干粉，其他是液体；
标签(Tag)	None
纯度(Purity)	> 95% by SDS-PAG
储存液(Stock)	0.88 mg/ml (25 μM) in 50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% Glycerol.
浓度(Concentration)	见管外标签

产品组分

组分编号	组分名称	规格
20440-A	10 × Reaction Buffer	200 μL
20440-B	10 × E1 Enzyme (His-tag)	200 μL
20440-C	5 × Ubiquitin (冻干粉中加 400μL 水)	400 μL
20440-D	10 × Mg ²⁺ -ATP	200 μL
20440-E	10 × E3 Ligase Itch (Positive control)	20 μL
20440-F	20 × S5a substrate (Positive control)	20 μL
20440-G	20 × UBE2R1/UbcH3/Cdc34 (2R1)	15 μL
20440-H	20 × UBE2N/UBE2V2 Complex (2N/2V2)	15 μL
20440-I	20 × UBE2D1/UbcH5a (D1)	15 μL

20440-J	20 × UBE2D2/UbcH5b (D2)	15 μL
20440-K	20 × UBE2D3/UbcH5c (D3)	15 μL
20440-L	20 × UBE2L3/UbcH7 (2L3)	15 μL
20440-M	20 × UBE2K/E2-25K(2K)	15 μL
20440-N	20 × UBE2C/UbcH10(2C)	15 μL
20440-O	20 × UBE2H/UbcH2(2H)	15 μL
20440-P	20 × UBE2L6/UbcH8(2L6)	15 μL
20440-Q	20 × UBE2E1/UbcH6(E1)	15 μL

反应体系配制(20 μL)

组分	体积
ddH ₂ O	Up to 20 μL
10 × Reaction Buffer	2 μL
10 × E1 Enzyme	2 μL
5 × Ubiquitin	4 μL
10 × ATP-Mg	2 μL
20 × E2 Enzyme	1 μL
E3 Ubiquitin Ligase*	2 μL
Substrate(可选)*	1 μL

备注：*组分，使用者自己准备，E3 Ubiquitin Ligase 可重组表达或从细胞裂解液中纯化，Substrate (可选) not required for analyzing E3 Auto-Ubiquitination.

阳性对照反应体系(20 μL)

组分	体积
ddH ₂ O	to 20 μL
10 × Reaction Buffer	2 μL
10 × E1 Enzyme	2 μL
5 × Ubiquitin	4 μL
10 × ATP-Mg	2 μL
20 × E2 Enzyme	1 μL
10 × E3 Ligase Itch (Positive control)	2 μL
20 × S5a substrate (Positive control)	1 μL

反应条件

37°C孵育(30min~2h，如果效果不明显可增加反应时间 12h)，建议使用 PCR 仪或金属浴。

结果检测

1. 取样品 20 μL 加入 5 μL 的 5×SDS-PAGE Buffer，加热样品 95 °C 5min，随后使用还原性(含 DTT)上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳分析；
2. 选择 E3 Ubiquitin Ligase、泛素、Substrate 抗体进行 Western Blot 分析。

储存条件

-25~-15°C保存

注意事项

1. 避免反复冻融。
2. 本产品仅作科研用途。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。