

PreScission Protease

产品编号	产品名称	包装
P2302	PreScission Protease	100U

产品简介:

- PreScission Protease 是一种大肠杆菌中重组表达的带 GST 标签的人鼻病毒 14 型的 3C 蛋白酶(human rhinovirus (HRV) type 14 3C protease), 也称 HRV 3C Protease 或 HRV3C Protease, 能在低温条件下(4°C)特异性地识别八肽序列 Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro 或核心五肽序列 Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, 并在 Gln 和 Gly 氨基酸残基之间进行酶切, 常用于去除融合蛋白的 Glutathione S-transferase (GST)、His 或者其它标签的蛋白酶。
- 建议把 GST 或 His 等标签设计在融合蛋白的 N 端, 在 GST 或 His 等标签与目的蛋白之间设计加入 PreScission Protease 专一性识别与酶切的上述八肽序列, 这样在 GST 或 His 标签被酶切后, 在目的蛋白的 N 端仅有两个额外的 Gly-Pro 氨基酸残基, 从而最大限度地减少了对其结构和功能的影响。
- 本 PreScission Protease 带有 GST 标签, 特别适合用于 GST 标签蛋白的在柱酶切。在切割 GST 标签蛋白的时候, 切下的 GST 标签和 PreScission Protease 可结合于 GST 纯化柱(GST-tag Purification Resin)上, 而目的蛋白在穿透液中, 这样洗脱下来的蛋白中就不会含有 GST 标签和 PreScission Protease, 从而极大地方便了目的蛋白的纯化。GST 标签酶切去除的详细说明可以参考碧云天的 P2251/P2253/P2255 BeyoGold™ GST-tag Purification Resin 和 P2262 GST 标签蛋白纯化试剂盒的说明书。
- 酶活性单位定义: 5°C 反应 16 小时, 能够切割 100μg GST 标签蛋白达 90%以上所需的酶量定义为一个活性单位。
- 碧云天 PreScission Protease 酶活性鉴定结果可参考图 1。

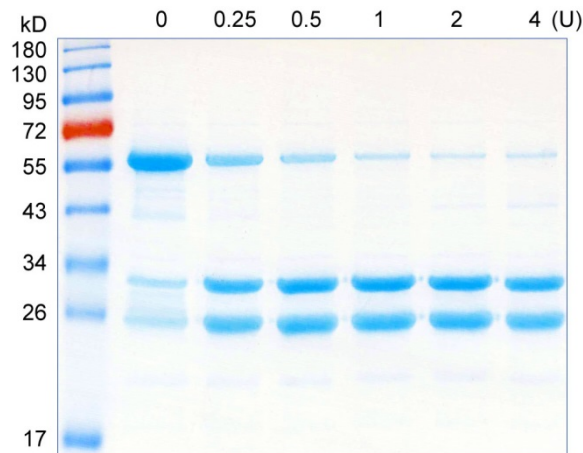


图1. PreScission Protease切割GST标签蛋白的效果图。含有PreScission Protease识别位点的56kD GST标签蛋白与PreScission Protease进行反应, 底物的用量为100μg, 酶的用量依次为0、0.25、0.5、1、2、4U, 5°C在1X PreScission Buffer中反应16小时后取样进行SDS-PAGE电泳和考马斯亮蓝染色。酶切产物大小为约30kD的目的蛋白和约26kD的GST标签。

- PreScission Protease分子量大小约46 kDa, 纯度≥95%。
- PreScission Protease储存液组成为: 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 1mM DTT, 50%(v/v) glycerol, pH 8.0。
- 10X PreScission Buffer组成为: 500mM Tris-HCl, 1.5M NaCl, 10mM EDTA, 10mM DTT, pH 7.5。
- PreScission Protease的酶切体系中可以兼容1% Triton X-100、Tween-20或NP-40, 10mM EDTA和500mM NaCl。
- 本产品一个包装含有100单位的酶, 可用于约10mg带有PreScission Protease识别位点的融合蛋白的切割。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2302-1	PreScission Protease (2U/μl)	50μl
P2302-2	10X PreScission Buffer	1.2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C 保存。

注意事项:

- 100mM ZnCl₂、4mM AEBSF 和 100μM Chymostatin 会抑制 PreScission Protease 的酶活性 50%以上。
- 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。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 初始反应条件(适用于绝大多数GST标签蛋白的酶切)

- 反应温度: 4°C。
- 反应时间: 16 h或过夜。
- 酶量: 1:25~1:100(U/μg)。

2. 反应条件的优化

由于不同标签蛋白具有不同的特性,所以在实际使用时,建议对酶和标签蛋白的比例进行适当优化,以下是一个简单的估计酶用量的实验方案。

- 按照下表设置酶切反应体系:

组分	体积(μl)
H ₂ O	X
10X PreScission Buffer	10
标签蛋白(100μg)	Y
PreScission Protease (2U/μl)	0、0.5、1或2
总体积	100

注: 如果标签蛋白浓度为5μg/μl,那么Y=100/5=20,即须使用20μl 5μg/μl的标签蛋白。

- 将反应混合物放置于4°C反应16小时或者过夜。

- 取20μl样品进行SDS-PAGE电泳分析,确定反应所需的合适酶量。在实际操作过程中,如果有必要,还可以在反应的不同时间点取少量样品,后续通过电泳分析来确定优化的反应时间。

3. 柱上酶切含GST标签的融合蛋白(以8mg GST标签蛋白/ml凝胶为例,不同量的GST标签蛋白可以按此比例换算)

- 在GST标签蛋白结合于纯化柱(1ml)并用洗涤液充分洗涤后,再用10倍柱床体积PreScission Protease的酶切缓冲液平衡柱子。PreScission Protease的酶切缓冲液的组分为50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH7.5。
- 准备PreScission Protease: 约每100μgGST标签蛋白使用2U PreScission Protease (或按照经步骤2优化后的条件)。对于8mg GST标签蛋白需使用160U PreScission Protease,用PreScission酶切缓冲液稀释至与凝胶柱相同的体积,即1ml。
- 将稀释好的1ml PreScission Protease泵入纯化柱中,4°C保持4-8h(为确保酶切完全,可以4°C酶切过夜)。如果蛋白结合是在离心管中进行的,可将准备好的PreScission Protease直接加入离心管中,4°C在摇床上缓慢摇动4-8小时(为确保酶切完全,可以4°C酶切过夜)。
- 用1倍柱床体积的PreScission Protease酶切缓冲液洗涤,重复三次,分别收集每次的洗涤液。如果酶切反应是在离心管中进行的,1000g离心2分钟,收集上清,然后加入1ml酶切缓冲液重悬沉淀,离心(1000g×2min)收集上清,接着再加入1ml酶切缓冲液重悬沉淀,离心(1000g×2min)收集上清。洗脱组分中含有切除了GST标签的目的蛋白,而GST标签和带有GST标签的PreScission Protease则仍然结合在凝胶柱上。

4. 洗脱后酶切含GST、His等标签的融合蛋白(以8mg标签蛋白/ml凝胶为例,不同量的GST标签蛋白可以按此比例换算)

- 使用脱盐柱快速除去洗脱组分中的GSH、咪唑等特殊组分,或用PreScission Protease酶切缓冲液进行透析。
- 按每100μg标签蛋白加入2U PreScission Protease的比例加入蛋白酶,如果蛋白未定量,可以按照每1ml凝胶加入160U PreScission Protease (按照每毫升凝胶结合8mg标签蛋白进行预估)的比例进行。4°C孵育4-8h或者过夜。
- 将酶切后的蛋白样品加入预先用PreScission Protease酶切缓冲液平衡好的BeyoGold™ GST-tag Purification Resin,室温结合20-30分钟。
- 500g离心5分钟,收集上清,其中含有切除了标签的目的蛋白,PreScission Protease则结合在凝胶沉淀中。如果目的蛋白是GST标签蛋白,那么残留的没有被酶切的GST标签蛋白、PreScission Protease和酶切下来的GST标签则结合在凝胶沉淀中,切除了标签的目的蛋白在溶液中。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2251	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	10ml
P2253	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	100ml
P2255	BeyoGold™ GST-tag Purification Resin	1000ml
P2262	GST标签蛋白纯化试剂盒	10ml
P2302	PreScission Protease	100U
P2303	PreScission Protease	500U
P2307	TEV Protease	1000U

P2308	TEV Protease	10000U
D2916	pET-N-GST-PreScission	1μg
D2933	pET-Dual-N-GST-PreScission	1μg

Version 2016.09.25