

M5 HiPer PreScission protease (PP 酶) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer PreScission protease (2U/ul)	50U	MF831-01
M5 HiPer PreScission protease (2U/ul)	500U	MF831-01

【储存条件】

-20°C。

【产品组分】

	MF831-01	MF831-10
PreScission Protease (2U/μl)	25ul	250ul
10X PreScission Buffer	0.6ml	4x1.5ml

【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) type14 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-LeuPhe-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。

【质量保证】

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。

【活性定义】

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。

【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。

【反应体系】**1. 初始反应条件(适用于绝大多数 GST 标签蛋白的酶切)**

- a. 反应温度：4°C。
- b. 反应时间：16 h 或过夜。
- c. 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。

- a. 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。

- b. 将反应混合物放置于 4°C 反应 16 小时或者过夜。
- c. 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)

- a. 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。
- b. 准备 PreScission Protease：约每 100μg GST 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。
- c. 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)。
- d. 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)

- a. 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。
- b. 按每 100 μ g 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 $^{\circ}$ C 孵育 4-8h 或者过夜。
- c. 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。
- d. 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。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。