



PreScission Protease

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 操作步骤.....	1
3. 补充信息.....	1
4. 订购信息及相关产品.....	2

1. 产品介绍

1.1 产品简介

PreScission Protease (PPase) 为鼻病毒的 3C 蛋白酶 (Human Rhinovirus 3C Protease) 的原核表达产物, 特异识别短肽 Leu-Phe-Gln/Gly-Pro, 并在 Gln 和 Gly 残基之间进行切割。该酶可以识别 PGEX-6P-1、PGEX-6P-2、PGEX-6P-3 等载体内带有的酶识别序列 (LFQ/GP), 可以把 GST 标签和融合的目标蛋白切开。酶识别序列 (LFQ/GP) 也可以通过克隆的方法接入其它载体中。在切割反应过程中, 建议先用不同的切割时间摸索最佳条件, 用 SDS-PAGE 电泳来评估切割程度。完全消化 GST 融合蛋白 PreScission Protease 的用量, 温度和温浴的时间要根据不同的目标蛋白而进行改变, 应该在实验过程中优化切割条件。重组酶 N 端带有 GST 标签, 使得溶液状态酶切反应完后, 可以通过 Glutathione Beads (Smart-Lifesciences, Cat. No. SA008010) 去除。当进行柱酶切时, 则可以将目的蛋白从固定在介质上的融合蛋白上直接切下。该产品不提供酶切的缓冲液。

1.2 产品包装和储存

PreScission Protease (1 U/ μ l), 浓度 1 mg/ml。长时间可存放于 -20°C 或 -80°C 。大包装使用前可分装成小管, 请勿反复冻融。

1.3 活力单位

在酶切缓冲液中切割 100 μ g 被检测的融合蛋白, 反应条件为 5°C , 16 小时, 切割率 $\geq 90\%$, 定义为一个单位。通常 1 mg 蛋白酶的活力约为 833~1000 U。

1.4 酶切缓冲液

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.0。

2. 操作步骤

2.1 柱上酶切

- 1) 按照实验室条件对目的蛋白进行破碎、介质结合和洗杂, 不要洗脱;
- 2) 确保用 10 倍以上柱体积的洗杂缓冲液充分洗涤上样介质, 注意将管壁上残留上样液洗去;
- 3) 按照每 ml 介质使用 40 μ l PPase 进行酶切, 注意 40 μ l PPase 需用 2 ml 酶切缓冲液溶解, 然后把配制好的酶加到清洗完的介质中并轻轻混匀, 于适当温度条件轻轻震荡反应过夜 (推荐的反应条件为 5°C 酶切 16 小时);
- 4) 柱子直立静置 30 分钟以上, 收集柱中的流出液, 溶液中含有目标蛋白。可以补加少量缓冲液洗柱, 获得更多的目标蛋白。柱上残余部分, 可以使用常用的咪唑洗脱方法洗脱, 并电泳估计酶切效率。

2.2 洗脱后酶切

- 1) 用还原型谷胱甘肽把 GST 融合蛋白从 Glutathione Beads 上洗脱, 用酶切缓冲液进行充分透析, 除去谷胱甘肽;
- 2) 每 mg 融合蛋白中加入 10 μ l PPase, 如果融合蛋白的量不能确定, 就按照每毫升洗脱液加入 40 μ l PPase, 4°C 酶切过夜 (16 小时左右);
- 3) 当酶切完成之后, 用 Glutathione Beads, 除去 GST 标签和 PPase, 流出液含有目标蛋白。

3. 补充信息

3.1 PPase 酶切条件优化

PPase 属于 3C 蛋白酶家族, 不需要金属离子或者辅酶参与活性, 但活性中心有半胱氨酸参与, 需要维持一定的还原性反应条件 (0.1-1 mM DTT 或者 2-ME 就足够了)。这一类酶的识别序列包括了蛋白酶切位点上下游的多个残基 (4-6 个), 因此有良好的特异性。重组酶本身是和 GST 标签融合的, 因此酶切完成以后可以被 Glutathione Beads 吸附而除去。通常可以选择在柱酶切或者洗脱后酶切, 但两者的效率有很大差别 (洗脱酶切效果更好, 但稍微麻烦一些), 下表是酶切时需要注意的一些条件, 供参考。





组分	条件
PPase	≥10 U/mg GST fusion protein
pH	7-8
Dithiothreitol	0.1-1 mM
NaCl	0-500 mM
EDTA	0-10 mM
Detergents (Triton-x100;Tween-20;Nonidet-p40)	0-1%
Temperature	4-37°C

3.2 PPase 酶的抑制剂

蛋白酶通常可以被一些特异性的抑制剂抑制活力，进行酶切反应时请参考下表。

试剂	浓度	抑制程度
ZnCl ₂	100 mM	> 50%
Pefabloc 7SC	4 mM	> 50%
Chymostatin	100 μM	> 50%
Antipain dihydrochloride	74 μM	< 20%
Aprotinin	0.3 μM	< 20%
Bestatin	130 μM	< 20%
E-64	28 μM	< 20%
Leupeptin	1 μM	< 20%
Pepstatin	1 μM	< 20%
Phosphoramidon	0.6 mM	< 20%
PMSF	1 mM	< 20%
ZnCl ₂	10 mM	< 20%

4. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
PreScission Protease	SLP00500	1 mg
	SLP00501	10 mg

