

PreScission Protease Protocol

1. 产品描述

PreScission Protease 是一种融合了人鼻病毒 14 型的 3C 蛋白酶 (human rhinovirus (HRV) type 14 3C protease) 和 GST 的重组蛋白酶。该蛋白酶可在低温下 (4°C) 特异识别短肽 Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, 并在 Gln 和 Gly 氨基酸残基之间进行酶切。其底物的识别和切割不仅依赖于该重组蛋白酶的一级结构还依赖于它的二级和三级结构。它可以特异性的将 pGEX-6P 系列等载体表达的外源蛋白与其融合的 GST 标签进行分离, 从而获得纯度更高的外源目标蛋白。

2. 产品组分

成分	规格	规格	规格
PreScission Protease	100U	200U	500U
10×Cleavage Buffer	1mL	1mL	3× 1mL

3. 储存条件

-80°C 长期储存, 有效期 2 年; 少量分装 -20°C 保存, 有效期 6 个月。10×Cleavage Buffer 置于 -20°C 保存。避免反复冻融!

4. 使用方法

工作液浓度应根据具体实验确定, 建议进行预实验摸索最佳实验浓度。

1) 初始条件摸索

a. 按照下表设置酶切反应体系:

反应物组成	体积
GST 融合蛋白	100μg
PreScission Protease	2μL (1U/μL)
10×Cleavage Buffer	10μL
ddH ₂ O	至 100μL

b. 将反应混合物置于 4°C 反应 15-16h;

c. 取 20μL 样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 根据结果, 优化反应所需的最适酶量, 重复步骤;

d. 在实际操作中, 建议酶用量 1:25-1:100U/μg 融合蛋白。

2) 柱上酶切 GST 标签蛋白 (以 10mg GST 标签蛋白/mL 凝胶为例)

a. 4°C 条件下, 使用 10 倍柱体积酶切缓冲液洗涤已结合 GST 标签蛋白的纯化柱, 并去除残留缓冲液;

b. 准备 PreScission Protease: 约每 100μg GST 标签蛋白使用 2U PreScission Protease (或按照经步骤 1 优化后的条件)。对于 10mg GST 标签蛋白需使用 200U 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, 再重复洗涤一次。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。

3) 柱下酶切 GST 标签蛋白 (以 10mg GST 标签蛋白/mL 凝胶为例)

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 100μg 标签蛋白加入 2U PreScission Protease 的比例加入蛋白酶, 4°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 GST 标签蛋白纯化树脂 (GSTSep Glutathione Agarose 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。

5. 注意事项

1) 100 mM ZnCl₂、4 mM AEBSF 和 100 μM Chymostatin 将抑制 PreScission Protease 50% 以上酶活性;

2) 10X Cleavage Buffer 组成为: 500mM Tris-HCl, 1.5M NaCl, 10mM EDTA, 10mM DTT, pH 7.5, 实验中可按照实验进度需要继续配置;

3) 本产品仅限科研用途使用。