

PreScission Protease (PSP) 重组 PreScission 蛋白酶

产品信息

产品名称	产品编号	规格
PreScission Protease (PSP) 重组 PreScission 蛋白酶	20425ES60	200U
PreScission Protease (PSP) 重组 PreScission 蛋白酶	20425ES76	500U

产品描述

PreScission Protease 是一种由人鼻病毒 14 型的 3C 蛋白酶 (human rhinovirus (HRV) type 14 3C protease) 和 GST 组成的融合蛋白。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。底物的识别和切割不仅依赖于融合蛋白的一级结构还依赖于融合蛋白的二级和三级结构。它可以特异性的将 pGEX-6P 系列等载体表达出的带有酶底物识别多肽序列融合蛋白的 GST 标签进行分离。本品由大肠杆菌中重组表达, 以无菌液体形式提供。

产品性质

中文别名 (Chinese Synonym)	重组 PreScission 蛋白酶
英文别名 (English Synonym)	3C protease, Picornain 3C, PSP
来源 (Source)	大肠杆菌表达
分子量 (Molecular Weight)	约 46kDa
物理外观 (Physical Appearance)	无菌无色液体
储存缓冲液 (Storage Buffer)	25mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 50% (V/V) Glycerin
10×酶切缓冲液 (10×Cleavage Buffer)	500mM Tris-HCl (pH7.0), 1.5M NaCl, 10mM EDTA, 10mM DTT
纯度 (Purity)	经 SDS-PAGE 及 HPLC 分析, 纯度 > 95%
酶活定义 (Unit Definition)	在 5°C 条件下反应 16 小时, 能够切割 10μg 的 GST 标签的融合蛋白达 90% 以上所需的酶量定义为一个活性单位

运输和保存方法

干冰运输。-80°C 长期储存, 有效期 2 年; 小量分装 -20°C 保存, 有效期 6 个月;

注意事项

- 1) 100mM ZnCl₂、4mM AEBSF 和 100μM Chymostatin 将抑制 PreScission Protease 50% 以上酶活性;
- 2) 配制好的 10×Cleavage Buffer 置于 -20°C 保存。避免反复冻融!
- 3) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 4) 本产品仅作科研用途!

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	100 μ g
PreScission Protease	2 μ L (1U/ μ L)
10 \times Cleavage Buffer	10 μ L
ddH ₂ O	至 100 μ L

- b. 将反应混合物置于 4 $^{\circ}$ C 反应 15-16h;
- c. 取 20 μ L 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/ μ g 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 $^{\circ}$ 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 100 μ g 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 $^{\circ}$ C 保持 4-8h (为确保酶切完全, 可以 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 在摇床上缓慢摇动 4-8 小时 (为确保酶切完全, 可以 4 $^{\circ}$ 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 \times 2min)收集上清, 接着再加入 1mL 酶切缓冲液重悬沉淀, 离心(1000g \times 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。

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 100 μ g 标签蛋白加入 2U PreScission Protease 的比例加入蛋白酶, 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 GSTSep Glutathione Agarose Resin (Cat#20507ES), 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。