

# PreScission 蛋白酶

## PreScission Protease

本产品需干冰运输；PreScission 蛋白酶 置于-80°C可保存 24 个月，-20°C可保存 6 个月，避免反复冻融；10×PreScission 蛋白酶 切缓冲液 置于-20°C即可保存 24 个月。

### 货号规格

货号	规格
JW102	200 U
JW102L	1,000 U

### 产品内容

名称	JW102	JW102L
PreScission 蛋白酶(1 U/μL)	200 μL	1,000 μL
10×PreScission 蛋白酶缓冲液	2.5 mL	12.5 mL

注：① 一个 PreScission 蛋白酶单位 (U) 定义为在 4°C下, 16 h 内将 100 μg GST 标签融合蛋白的 90% 完全切割所需的酶量；

② 本产品提供的 PreScission 蛋白酶缓冲液量如不足以用于实验, 则需额外配制, 10×PreScission 蛋白酶切缓冲液的组分为 500 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, pH7.5。

### 产品简介

PreScission 蛋白酶是由人鼻病毒 3C 蛋白酶 (Human Rhinovirus 3C Protease, HRV 3C) 和谷胱甘肽巯基转移酶 (Glutathione S-Transferase, GST) 融合形成的重组蛋白。PreScission 蛋白酶能特异识别 Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro(LEVLVQ↓GP) 短肽, 并在谷氨酰胺 (Gln, Q) 和甘氨酸 (Gly, G) 之间发生切割, 常用于切除融合蛋白标签, 如 pGEX-6P 系列载体自带该酶切位点, 目标蛋白与该序列融合表达, 经 GST 标签纯化后, 可用 PreScission 蛋白酶进行酶切去除 GST 标签。本产品也融合了 GST 标签, 可通过 GST 亲和层析柱去除。

### 使用说明

#### 反应条件的优化

因为不同标签蛋白所具有的特性不同, 需要对反应条件进行优化, 具体操作如下:

1. 按下表依次加入相应样品和试剂, 配制好酶切体系;

融合蛋白	100 μg
10×PreScission 蛋白酶缓冲液	10 μL
PreScission 蛋白酶(1 U/μL)	0、1、2或4 μL
ddH <sub>2</sub> O	定容至100 μL

2. 混匀后, 推荐 4°C反应 16 h 或过夜完成融合蛋白切割反应;



3. 取 20  $\mu\text{L}$  酶切产物进行 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, 如有必要, 也可以在反应的不同时间点取少量酶切产物, 后续通过电泳分析来确定最优的反应时长。

注: 对于绝大多数 GST 标签融合蛋白, 按以下条件即可完成酶切:

- ◇ 酶量: 1:25~1:100(酶 U : 融合蛋白 $\mu\text{g}$ )
- ◇ 反应温度: 4 $^{\circ}\text{C}$
- ◇ 反应时间: 16 h 或过夜

#### 柱上酶切 GST 标签融合蛋白 (以 10 mg GST 标签融合蛋白 /mL 凝胶为例)

1. 将 GST 标签融合蛋白结合于纯化柱并充分洗涤后, 用 10 倍柱体积的 1 $\times$ PreScission 蛋白酶切缓冲液平衡纯化柱;
2. 每 100  $\mu\text{g}$  GST 标签融合蛋白需使用约 2 U PreScission 蛋白酶 (或按前述步骤优化后的条件)。对于 10 mg GST 标签融合蛋白, 需使用 200 U PreScission 蛋白酶, 用 1 $\times$ PreScission 蛋白酶切缓冲液稀释至与凝胶柱相同的体积, 即 1 mL;
3. ▶ 将稀释好的 1 mL PreScission 蛋白酶泵入纯化柱中, 4 $^{\circ}\text{C}$  酶切 4~8 h 或过夜。  
▶ 如果蛋白结合是在离心管中进行的, 可将稀释后的 PreScission 蛋白酶直接加入离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$  在摇床上缓慢摇动 4~8 h 或过夜进行酶切;
4. ▶ 用 1 倍柱体积的 1 $\times$ PreScission 蛋白酶切缓冲液平衡纯化柱, 重复三次, 分别收集每次的洗脱液。  
▶ 如果酶切反应是在离心管中进行的, 先 1,000  $\times g$  离心 2 min, 收集上清, 然后加入 1 mL 1 $\times$ PreScission 蛋白酶切缓冲液重悬沉淀, 1,000  $\times g$  离心 2 min, 收集上清, 接着再加入 1 mL 1 $\times$ PreScission 蛋白酶切缓冲液重悬沉淀, 1,000  $\times g$  离心 2 min, 收集上清。

上述步骤收集的洗脱液或上清液中含有已切除 GST 标签的目的蛋白, 而 GST 标签和带有 GST 标签的 PreScission 蛋白酶则仍然结合在凝胶上。

#### 柱下酶切 GST、His 等标签融合蛋白 (以 10 mg 标签融合蛋白 /mL 凝胶为例)

1. 使用脱盐柱快速除去洗脱组分中的 GSH、咪唑等物质, 或用 1 $\times$ PreScission 蛋白酶切缓冲液进行透析;
2. 按每 100  $\mu\text{g}$  标签融合蛋白加入 2 U PreScission 蛋白酶的比例加入蛋白酶 (如果蛋白未定量, 可以按照每 1 mL 凝胶加入 200 U PreScission 蛋白酶), 4 $^{\circ}\text{C}$  酶切 4~8 h 或过夜;
3. 将酶切后的蛋白样品加入预先用 1 $\times$ PreScission 蛋白酶切缓冲液平衡好的 GST 标签蛋白纯化琼脂糖凝胶 (货号: YJ105), 室温结合 20~30 min;
4. 500  $\times g$  离心 5 min, 收集上清, 其中含有已切除标签的目的蛋白, PreScission 蛋白酶则结合在凝胶沉淀中。

如果目的蛋白是 GST 标签融合蛋白, 那么残留的未被酶切的 GST 标签融合蛋白、PreScission 蛋白酶和酶切下来的 GST 标签都会结合在凝胶沉淀中, 而已切除 GST 标签的目的蛋白则在上清液中。

## 注意事项

1. 100 mM  $\text{ZnCl}_2$ 、4 mM AEBSF 和 100  $\mu\text{M}$  Chymostatin 会抑制 PreScission 蛋白酶活性 50% 以上;
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
3. 本产品仅限科研使用。

