

Code No. 7360

研究用

TAKARA

HRV 3C Protease

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 组 成	1
● 活性定义	1
● 操作方法	1
● 实验例	4
● 相关产品	5

● 制品说明

本制品是从 *E.coli* 中获得的人源 Rhinovirus 14 编码的重组 3C Protease。本酶是高纯度的 6×HN 标签蛋白质，具有与天然蛋白质相同的活性，能够特异性切割氨基酸序列 LeuGluValLeuPheGln ↓ GlyPro，可有效切断含 HRV 3C Protease 识别序列的融合蛋白质的标签序列。

由于本制品在 N-末端有 6×HN 标签（经修饰的 His 标签），使用 TALON[®] Metal Affinity Resin 或 His60 Ni Superflow Resin，应用固定化金属亲和层析（IMAC）方法极易从蛋白酶反应液中去掉。另外，本酶在 4℃ 仍具有活性，可在低温下操作，不影响目的蛋白质的活性或稳定性。

本制品中附带 Cleavage Control Fusion Protein，Control Protein 在 N-末端含 6×HN 标签。使用 HRV 3C Protease 消化 Control Protein，获得 52 kDa TF 蛋白质和 24 kDa GST 肽段，通过 SDS-PAGE 电泳即可判定。

● 制品内容

HRV 3C Protease (1 U/μl)	500	Units
Cleavage Control Fusion Protein (1 μg/μl)	10	μl
10×HRV 3C Cleavage Buffer	10	ml

● 保存： -20℃

● 组成

HRV 3C Protease Storage Buffer

50 mM	Tris-HCl (pH8.0, 25℃)
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0.5 mM	Tris (Hydroxypropyl) Phosphine (THP)
50%	Glycerol

Cleavage Control Fusion Protein Storage Buffer

50 mM	Tris-HCl (pH7.5, 25℃)
100 mM	NaCl
10 mM	EDTA

10×HRV 3C Cleavage Buffer

500 mM	Tris-HCl (pH7.5, 25℃)
1.5 M	NaCl

● 活性定义

以 Cleavage Control Fusion Protein 为底物，在 1×HRV 3C Cleavage Buffer 的体系下，4℃ 反应 16 小时，切割 100 μg 底物，切割效率大于 95% 所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

● 操作方法

本制品适用于切断含 HRV 3C Protease 识别位点的重组融合蛋白质（如：制备无标签的目的蛋白质），结合 *E. coli* 表达载体如 pCold[™] TF DNA (Code No. 3365)、pCold ProS2 DNA (Code No. 3371) 和 pCold GST DNA (Code No. 3372) 以及其他含 HRV 3C 识别位点的表达载体使用，HRV 3C Protease 能够从这些载体表达的融合蛋白质中去除提高可溶性的标签（如：TF、ProS2、GST）。这些表达载体的多克隆位点上游具有 HRV 3C Protease 识别位点，在 HRV 3C Protease 识别位点的上游具有 N-末端 His 标签。因此，蛋白水解后，使用 IMAC 亲和层析树脂如 TALON Metal Affinity Resin 能够结合标签和 HRV 3C Protease，从而纯化获得无标签的目的蛋白质。

pCold I DNA (Code No. 3361)，pCold II DNA (Code No. 3362)，pCold III DNA (Code No. 3363) 和 pCold IV DNA (Code No. 3364) 没有 HRV 3C Protease 识别位点，因此 HRV 3C Protease 不能用于这些载体。

使用 HRV 3C Protease 去除融合蛋白质标签的流程图

纯化带有 N-末端标签的融合蛋白质

↓
使用 HRV 3C Protease 切断标签

↓
使用 TALON Metal Affinity Resin 等纯化

↓
去除标签和 HRV 3C Protease

↓
目的蛋白质

注意事项:

- 在 50 μ l HRV 3C Cleavage Buffer 中, 4 $^{\circ}$ C 反应 16 小时, 1 U 的 HRV 3C Protease 能切断至少 95% 的 Cleavage Control Fusion Protein (100 μ g)。但是, 由于蛋白质的初级和二级结构以及反应缓冲液不同, 切断效率会有所不同, 因此, 需要进行预实验来确定 HRV 3C Protease 的适宜添加量。
- HRV 3C Protease 可以在适合于目的蛋白质的缓冲液中进行反应 (参阅: 表 1. Buffer 组成对 HRV 3C Protease 的影响)。当使用 IMAC 产品如 TALON Metal Affinity Resin 来去除蛋白酶反应液中的标签蛋白和蛋白酶时, 蛋白酶反应液中不可以含有还原剂 (如: 2-巯基乙醇) 或螯合剂 (如: EDTA), 这些试剂会导致螯合金属离子的洗脱。*
*: TALON Metal Affinity Resin 复合有 Co^{2+} , 相比较 Ni^{2+} , Co^{2+} 抗还原剂 (2-ME) 的能力更强。使用 TALON Metal Affinity Resin 纯化 6xHis 标签融合蛋白质时, 可以在 30 mM 2-ME 存在条件下。
- 可以在 4 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C 进行反应, 但 4 $^{\circ}$ C 是推荐的标准反应温度。

表 1. Buffer 组成对 HRV 3C Protease 的影响

组份	活性 (%) [*]	组份	活性 (%) [*]
(1 \times HRV 3C Cleavage Buffer)	100	0.5 mM DTT	100
0.2 M NaCl	100	1 mM DTT	100
0.8 M NaCl	< 100	2 mM DTT	100
1 mM ZnCl_2	100	0.5 mM THP	100
10 mM ZnCl_2	0	1 mM THP	100
100 mM ZnCl_2	0	2 mM THP	100
0.1% Triton	100	0.5 mM TCEP	100
1% Triton	100	1 mM TCEP	100
0.1% Tween 20	100	2 mM TCEP	100
1% Tween 20	100	1% Glycerol	100
0.1% Nonidet P40	100	5% Glycerol	< 90
1% Nonidet P40	100	10% Glycerol	< 90
1 mM PMSF	100	0.5 M Urea	0
5 mM PMSF	100	1 M Urea	0
8 mM PMSF	< 100	2 M Urea	0
0.1 mM Leupeptin	< 100	0.5 M Guanidine	0
0.5 mM Leupeptin	< 70	1 M Guanidine	0
0.75 mM Leupeptin	< 70	2 M Guanidine	0
1 mM EGTA	100	0.1 M Imidazole	0
20 mM EGTA	100	0.2 M Imidazole	0
50 mM EGTA	100	0.5 M Imidazole	0
1 mM EDTA	100	10 mM Na Phosphate Buffer	< 90
20 mM EDTA	100	50 mM Na Phosphate Buffer	< 90
50 mM EDTA	100	100 mM Na Phosphate Buffer	< 90

*: 上述组份加入到 1 × HRV 3C Cleavage Buffer 中的相对活性 (定义 1 × HRV 3C Cleavage Buffer 中的活性为 100%)

a. 切断反应液

a-1. 优化条件: 目的蛋白质的小体系切断反应

1. 在 1.5 ml microtube 中制备下述反应液

Target protein *	10, 20, 50 and 100 µg each
10 × HRV 3C Cleavage Buffer	5 µl
HRV 3C Protease	1 µl (1 U)
灭菌水	up to 50 µl

HRV 3C Protease 与目的蛋白质 (unit/µg) 的比例分别是: 1: 10、1: 20、1: 50 和 1: 100。

*: 对照反应中 Cleavage Control Fusion Protein 的加量为 1~10 µg。

2. 4°C 保温反应。标准反应时间为 16 小时。如果想要缩短反应时间, 按照如下时间点进行收集和检测样品:

在 1、3、6、16 小时收集 10 µl 反应溶液, 与 10 µl 2 × SDS Sample Buffer 混合。在进行 SDS-PAGE 分析前, 样品保存于 -20°C。

3. 进行 SDS-PAGE。取少量的未消化目的蛋白质进行同步电泳比较。根据 SDS-PAGE 结果来确定适合的酶量和反应时间。

a-2. 放大体系及回收目的蛋白质

当融合蛋白质在 N 末端有 His 或 HN 标签时, 可以在使用金属螯合树脂回收酶切后的目的蛋白质。下面是 TALON Metal Affinity Resin (Cat. No. 635501) 的使用例。

1. 将 a-1 中的反应液放大, 依据上述最适的 HRV 3C Protease 与目的蛋白质比例来添加。

2. 4°C 下在适合的时间下反应。

3. 取 10 × HRV 3C Cleavage Buffer 适合的体积稀释来制备 1 × HRV 3C Cleavage Buffer, 4°C 放置。在 4°C 下进行下述的反应。

4. 取 TALON Metal Affinity Resin 的适合量加入到 1 × HRV 3C Cleavage Buffer 中, 制备 50% 悬浊液。

*: TALON Metal Affinity Resin 的偶联蛋白质容纳量是 5~15 mg/ml 树脂。

5. 加入 50% TALON 树脂悬浊液到 HRV 3C Protease 反应液中, 在 4°C 颠倒混匀 1 小时。

6. 将反应液在 700 × g 离心 5 分钟, 回收上清液。目的蛋白质在上清中。HRV 3C Protease 和标签结合在树脂中。然后, 将含树脂的反应液转移到 TALON 2 ml Disposable Gravity Column (Cat. No. 635606) 中, 回收洗脱液。

7. 通过 SDS-PAGE 方法分析洗脱液中的纯化后蛋白质。

b. 透析精制切断后的目的蛋白质

1. 取 10 × HRV 3C Cleavage Buffer 适合的体积稀释来制备 1 × HRV 3C Cleavage Buffer, 4°C 放置。在 4°C 或冰上进行上述的所有反应步骤。

2. 添加 HRV 3C Protease 到目的蛋白质溶液中, HRV 3C Protease 和 target protein (unit/µg) 的比例是 1: 10。转移混合物到透析管中。我们建议使用透过分子量 (MWCO) 22 kDa 或更低的透析膜。

3. 将透析管转移到含大约 100 倍体积的 1 × HRV 3C Cleavage Buffer 容器中, 在 4°C 进行透析约 16 小时。

4. 使用 TALON Metal Affinity Resin 等 IMAC 方法 (参考 a-2. 4~6) 去除切断的标签蛋白和 HRV 3C Protease。

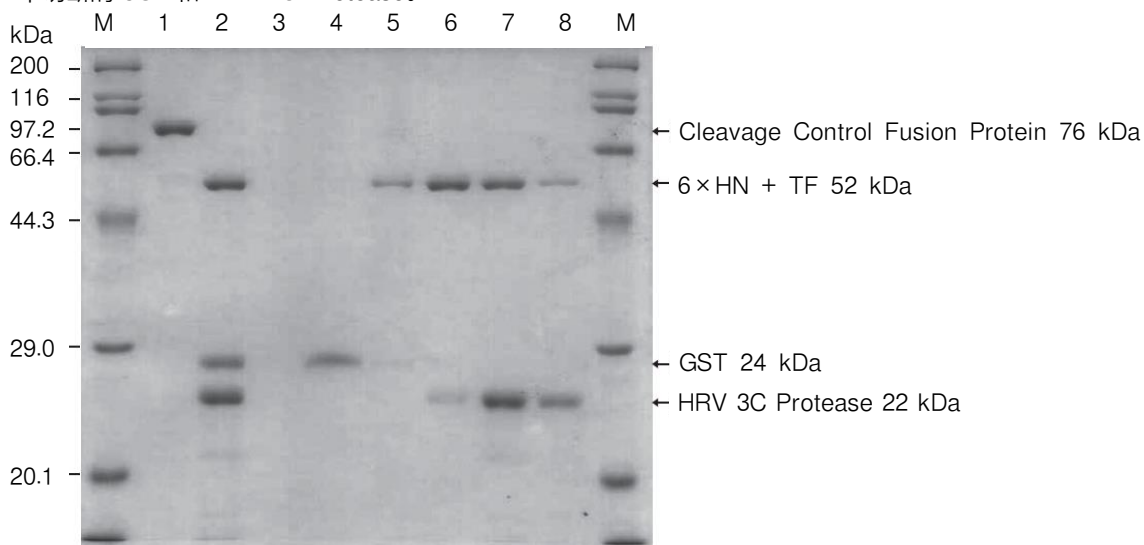
5. 通过 SDS-PAGE 分析纯化后的蛋白质。

c. 金属亲和柱精制切断后的目的蛋白质

1. 取 10 × HRV 3C Cleavage Buffer 适合的体积稀释来制备 1 × HRV 3C Cleavage Buffer, 4°C 放置。在 4°C 进行上述的所有反应步骤。
2. 取适量的 TALON Metal Affinity Resin 转移到 TALON 2 ml Disposable Gravity Column 中, 使用 10 倍体积的 Equilibration Buffer 平衡 TALON 树脂。
*: TALON Metal Affinity Resin 的偶联蛋白质容纳量是 5~15 mg/ml 树脂。
3. 添加目的蛋白质到 TALON 树脂中。
4. 在柱子的顶端和底端盖上盖子, 轻轻上下颠倒混合 1 小时, 以便目的蛋白质充分结合到树脂上。
5. 使用 10 ml Equilibration Buffer (等于 5 倍柱体积) 清洗未结合的蛋白质。
6. 使用 20 ml 1 × HRV 3C Cleavage Buffer (等于 10 倍柱体积) 平衡柱子。
7. 加入适量的 HRV 3C Protease, 在 4°C 下轻轻上下颠倒混合 16 小时。
8. 使用 10 ml Wash Buffer (含 5 mM 咪唑的 Equilibration Buffer) (等于 5 倍柱体积) 洗脱目的蛋白质。His 标签序列被 HRV 3C Protease 切断, 因此, 目的蛋白质在这个部分存在。
9. 如果有必要, 加入 Elution Buffer 到柱子中回收未切断蛋白质和 His 标签。
10. 通过 SDS-PAGE 对每部分溶液进行分析。

● 实验例

按照操作方法 a. 切断反应液, 取 10 μg 的 Cleavage Control Fusion Protein 在 4°C 保温 16 小时。完成标签切断反应后, 使用 TALON Metal Affinity Resin 和 TALON 2 ml Disposable Gravity Column 进行纯化。流出液、清洗和洗脱部分都进行 SDS-PAGE 分析, 可以观察到从 HN-标签 TF 融合蛋白质中切断的 GST 和 HRV 3C Protease。



12% SDS-PAGE, 采用 LabSafe GEL Blue (Cat. No. 786-35) 染色

M : Protein Molecular Weight Marker (Broad) (Code No. 3452)

Lane 1 : Cleavage Control Fusion Protein (76 kDa)

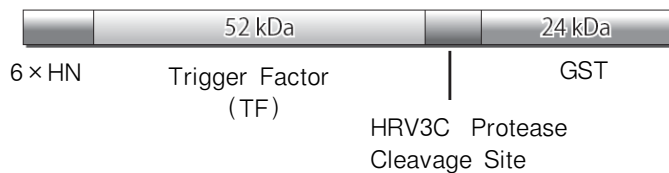
Lane 2 : HRV 3C Protease 切断反应液: 包含 GST (24 kDa), HN tagged TF (52 kDa) 和 HRV 3C Protease (22 kDa)。

Lane 3 : TALON Resin flow-through

Lane 4 : TALON Resin Wash Fraction: 包含 GST。

Lane 5 - 8 : TALON Resin Elution Fraction: 包含 HN tagged TF 和 HRV 3C Protease。

Cleavage Control Fusion Protein 结构:



● 相关产品

1. pCold™ TF DNA (Code No. 3365)
2. pCold™ ProS2 DNA (Code No. 3371)
3. pCold™ GST DNA (Code No. 3372)
4. TALON® Metal Affinity Resin (Cat. No. 635501-4, 635652, 635653)
5. TALON® 2 ml Disposable Gravity Column (Cat. No. 635606)

TALON is a registered trademark of Takara Bio USA, Inc.

pCold is a trademark of TAKARA BIO INC.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考TAKARA BIO INC.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>