Sumo Protease

目录

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

1. 产品介绍

1.1 产品简介

Sumo Protease 为酿酒酵母 ULP1 蛋白酶的原核表达产物，特异性识别酿酒酵母的类泛素蛋白（ubiquitin-like protein, Sumo），并在 Sumo 标签和融合蛋白之间进行切割。该酶识别 Sumo 标签的三级结构，因此具有极高的特异性。Sumo 蛋白酶在多种温度以及 pH 7-9 条件下，均可以有效剪切，同时可以耐受一定浓度的咪唑，EDTA，尿素，SDS 等抑制成分，使用方便，在多种缓冲液中均可完成酶解。其本身带有一个 His-tag 标签，酶切后可以方便地除去。还需要注意的是：酿酒酵母来源的 SUMO 蛋白表达系统是已知最好的促进原核可溶表达的系统之一，远比 Ubiquitin，GST，MBP，TRX 等系统更加出色。

1.2 产品包装和储存

Sumo protease，浓度 1 mg/ml，酶活＞600 U/μg。长时间可存放于-20℃或-80℃。大包装用前可分装成小管，请勿反复冻融。
注：一个酶活单位定义为：在 50 mM Tris，150 mM NaCl，1 mM DTT，pH 8.0 酶切缓冲液中，30℃反应 1h，酶切＞90%的 100 pmol 标准底物（SUMO-融合蛋白）

1.3 酶切能力

在酶切缓冲液中酶切 100 μg 融合蛋白，反应条件为 5℃、16 小时、酶切效率≥90%，仅需要 0.5 μg 蛋白酶。在 30℃条件下、0.5 小时、1 μg Sumo 蛋白酶可以酶切 200 μg 融合蛋白，酶切效率≥90%。在酶切反应过程中，建议先用不同的酶切时间摸索最佳条件，用 SDS-PAGE 电泳来评估酶切程度。确定酶切融合蛋白需要的 Sumo 蛋白酶用量。温度和温浴的时间可以根据不同的目标蛋白而进行改变，应该在实验过程中优化酶切条件。

1.4 酶切缓冲液

50 mM Tris，150 mM NaCl，1 mM DTT，pH 8.0（仅有缓冲液即可酶切，例如可以使用 10 mM Tris-HCl，pH 8.0）。

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 μl Sumo 蛋白酶进行酶切，注意 40 μl 酶需用 1 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，适当温度条件轻轻震荡反应过夜，（推荐的反应条件为 5℃酶切 16 小时）；
4）柱子直立静置 30 分钟以上，收集柱中流出液，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

不同的融合蛋白在柱酶切的效率有很大差异，当在柱酶切效果不好时，可以选择洗脱后酶切。
1）洗脱产物透析到酶切缓冲液中，降低咪唑浓度（10 mM 以下），也可以使用硫酸铵沉淀，但是过高的盐浓度对酶切有抑制。
2）每 mg 融合蛋白加入 10 μl Sumo 蛋白酶，如果融合蛋白的量不能确定，就按照每毫升洗脱液加入 40 μl Sumo 蛋白酶，4℃酶切过夜；如果目标蛋白稳定，可以使用 30℃酶切，此时效率更高。
3）当酶切完成之后，用 Ni NTA Beads（Smart-Lifesciences，Cat. No. SA004010），结合 His-Sumo 标签和 Sumo 蛋白酶，流出液含有目标蛋白。

3. 补充信息

3.1 酶切条件

SUMO 蛋白酶不需要金属离子或者辅酶参与活性，但一定的还原性反应条件（0.1-1 mM DTT）可以促进酶的稳定。下表是酶切时需要注意的一些条件，供参考。

组分	条件
Sumo 蛋白酶	≥ 1:200（酶：融合蛋白）
pH	7-9
Temperature	4-30℃（30℃以上酶容易沉淀）
常用缓冲液添加成分	
试剂名称	**浓度**
dithiothreitol	0.1-1 mM
NaCl	0-500 mM
Imidazole	0-300 mM
EDTA	0-10 mM
耐受抑制能力	
试剂名称	**浓度**
Detergents (Triton-x100;Tween-20;Nonidet-p40)	≤1%（尽量避免 SDS 等离子型去垢剂）
Urea	≤ 2 M
盐酸胍	≤0.2 M

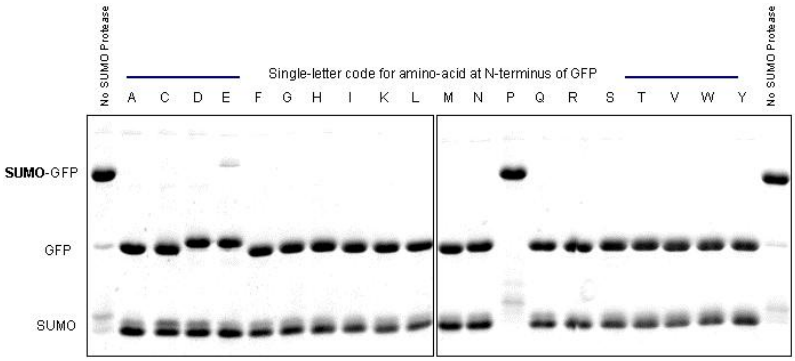
3.2 温度对酶切的影响

切割效率%					
时间/温度	4 ℃	16℃	21℃	30℃	37℃
0.5 小时	50	70	80	90	——
1 小时	60	87	90	93	——
2 小时	70	94	95	95	——
3 小时	75	95	95	95	沉淀

3.3 切割位点残基对切割的影响

通常 Sumo 标签蛋白的最后两个残基是甘氨酸（Sumo-GlyGly↓X-protein），通常要把目标蛋白或者多肽接到 Sumo 的下游可以选择限制性酶切，也可以选择 PCR 或者无缝克隆的方法。切点下游的第一个残基（通常称为 P1'）对酶切效率有较大影响。对于 Sumo 蛋白酶来说：P1'如果是脯氨酸（Pro），那么基本上切不动，其它一些蛋白酶也有这样的特性。此外 P1'如果为大侧链的残基，例如谷氨酸（Glu），切割效率也不太好。我们通常使用 BamHI 酶切位点编码的 GS 来提高酶切效率，引物 BamHI 与 BglII 为同尾酶，在做克隆时较为方便。

4. 应用案例



图一：P1'残基对酶切效率的影响（重点注意谷氨酸以及脯氨酸的情况）

5. 订购信息及相关产品

产品名称	货号	规格
Sumo Protease	SLP00700	1 mg
	SLP00701	10 mg
	SLP00702	100 mg
	SLP00703	500 mg
	SLP00704	1 g