

製品コード 7360

研究用

Takara

HRV 3C Protease

説明書

v201611Da

HRV 3C Protease は、ヒトライノウイルス 14 型由来の 3C Protease を大腸菌で発現させた組換え体であり、高純度に精製された 6 × HN タグとの融合タンパク質です。

本酵素は、Native 体と同等の活性をもっており、特定のアミノ酸配列：LeuGluValLeuPheGln ↓ GlyPro を認識・切断するので、HRV 3C Protease 認識配列を持つタグ融合タンパク質のタグ配列の切断に用いることができます。

本酵素は、6 × HN タグ融合タンパク質であることから、反応後、TALON® Metal Affinity Resin や His60 Ni Superflow Resin などの IMAC (immobilized metal affinity chromatography) に吸着することによって反応液から容易に除去することができます。また、本酵素は 4℃ で十分な活性を示しますので、目的タンパク質の活性を損なうことなく、安定な状態で切断が行えます。

本製品には、反応のコントロールとして利用可能な Cleavage Control Fusion Protein が含まれています。Control Protein は N 末端に 6 × HN タグを持ち、HRV 3C Protease によって 52 kDa の Trigger Factor および 24 kDa の GST に切断されますので、切断後、SDS-PAGE で容易に切断を確認することができます。

I. 内容

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

II. 保存

− 20℃

III. 形状・組成

HRV 3C Protease Storage Buffer

50 mM	Tris-HCl (pH8.0 at 25℃)
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0.5 mM	Tris(3-hydroxypropyl)phosphine (THP)
50%	Glycerol

Cleavage Control Fusion Protein Storage Buffer

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

10 × HRV 3C Cleavage Buffer

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

IV. 活性の定義

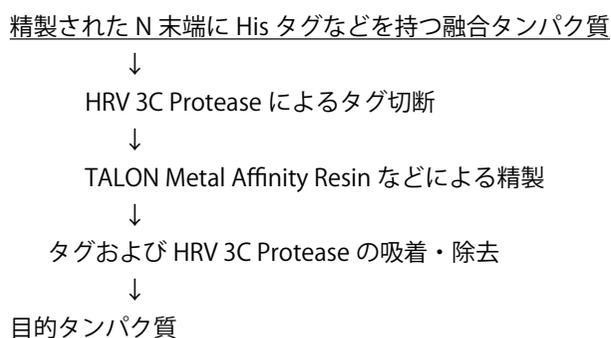
Cleavage Control Fusion Protein を基質として、HRV 3C Cleavage Buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.5) 中において、100 μg の基質を 4℃、16 時間で 95% 以上切断する活性を 1 U とする。

V. プロトコール

HRV 3C Protease は、HRV 3C Protease 認識配列を持つ組換え融合タンパク質を切断して、目的タンパク質を得るために使用する。特に、pCold™ TF DNA (製品コード 3365)、pCold ProS2 DNA (製品コード 3371)、pCold GST DNA (製品コード 3372) などの発現ベクターを用いて、可溶性促進タグ (TF タグ、ProS2 タグ、GST タグ) との融合タンパク質として発現したタンパク質からタグを除去する際に有効である。これらの発現ベクターは、マルチクローニングサイトの上流に HRV 3C Protease 認識配列を持っており、得られた融合タンパク質は、本酵素によって、可溶性促進タグと目的タンパク質に切断される。また、可溶性促進タグの N 末端には His タグがあるので、TALON Metal Affinity Resin などの IMAC によって、可溶性促進タグと本酵素は金属キレート樹脂に吸着され、目的タンパク質から容易に除去できる。

なお、pCold I DNA (製品コード 3361)、pCold II DNA (製品コード 3362)、pCold III DNA (製品コード 3363)、pCold IV DNA (製品コード 3364) は、HRV 3C Protease 認識配列を持っていないため、本酵素は利用できない。

【HRV 3C Protease による融合タンパク質からのタグ除去のフロー】



注意：

- 1 U の HRV 3C Protease は、50 μ l の HRV 3C Cleavage Buffer 中において 4°C、16 時間反応した場合、100 μ g の Cleavage Control Fusion Protein を 95% 以上を切断する。しかし、切断対象となるタンパク質は、1 次構造や 2 次構造、また反応バッファーによって切断効率が異なるため、あらかじめ予備試験を行って必要な酵素量を決定する。
- HRV 3C Protease は、目的タンパク質に適したバッファーで反応することが可能である (表 1. 各成分の HRV 3C Protease 活性に対する影響参照)。ただし、反応後に TALON Metal Affinity Resin などの IMAC によって切断したタグと本酵素を目的タンパク質から除去する場合は、キレートされている金属イオン漏出の原因となる高濃度の EDTA、メルカプトエタノール (2-ME) 等のキレート剤や還元剤のバッファーへの添加は避ける必要がある。*
 - * : TALON Metal Affinity Resin は Co^{2+} イオンをキレートした樹脂であり、2-ME による還元を Ni^{2+} イオンに比べてはるかに受けにくく、30 mM の 2-ME 存在下でも 6 \times His タグ融合タンパク質が精製できる。
- 本酵素は 4°C から 37°C で反応が可能であるが、標準では 4°C で反応することを推奨する。

表 1. 各成分の HRV 3C Protease 活性に対する影響

成分	活性 (%)*	成分	活性 (%)*
(1 × 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

* : 1 × HRV 3C Cleavage Buffer に表中の成分を加えた場合の相対活性
(1 × HRV 3C Cleavage Buffer での活性を 100% とする。)

< V-a. 溶液での切断 >

V-a-(1). 小スケールでの目的タンパク質切断の至適化試験

1. 1.5 ml マイクロチューブに以下の反応液を調製する。

Target protein*	各 10、20、50、100 μ g
10 \times HRV 3C Cleavage Buffer	5 μ l
HRV 3C Protease	1 μ l (1 U)
精製水	up to 50 μ l

HRV 3C Protease と目的タンパク質の混合比率 (unit/ μ g) は、それぞれ 1 : 10、1 : 20、1 : 50、1 : 100 となる。

* : 反応のコントロールとして、Cleavage Control Fusion Protein を切断する場合は、1 ~ 10 μ g を用いる。

2. 4°Cで反応する。標準の反応時間は 16 時間であるが、長時間反応を避けたい場合は、次のようにサンプリングを行い、反応時間も同時に検討する。上記反応液から、1、3、6、16 時間ごとに反応液 10 μ l を取り、10 μ l の 2 \times SDS Sample Buffer と混合する。SDS-PAGE を行うまで、混合液は - 20°C で保存する。
3. SDS-PAGE を行う。コントロールとして、未消化の目的タンパク質も同時に SDS-PAGE に供する。SDS-PAGE の結果から、目的タンパク質を切断するために必要な酵素量、反応時間を決定する。

V-a-(2). スケールアップと目的タンパク質の回収

目的の融合タンパク質が、N 末に His タグ、HN タグ配列を持っている場合、金属キレート樹脂を用いて、切断後の目的タンパク質を回収することが可能である。以下は、TALON Metal Affinity Resin (製品コード 635501) を使用した例を示す。

1. V-a-(1)-1. の反応液を、スケールアップして調製する。
至適化試験において決定した量比になるように目的タンパク質および HRV 3C Protease を加える。
2. 4°Cで、至適化試験で決定した時間の反応を行う。
3. 必要量の 10 \times HRV 3C Cleavage Buffer を 10 倍に希釈して、1 \times HRV 3C Cleavage Buffer を作製し、4°Cにおいておく。以下の操作は 4°Cで行う。
4. 相当量の TALON Metal Affinity Resin* を、1 \times HRV 3C Cleavage Buffer で平衡化して 50% Slurry の状態にする。

* : TALON Metal Affinity Resin のタンパク質結合容量は、約 5 ~ 15 mg/ml Resin である。

5. 50% Slurry の TALON Resin に 2. の反応液を加える。穏やかに 4°Cで 1 時間転倒混和する。
6. 5. の Resin を含む溶液を、700 \times g で 5 分間遠心し、上清を回収する。HRV 3C Protease およびタグは Resin に吸着するため、目的タンパク質が上清に回収される。または、5. の Resin を含む溶液を、TALON 2 ml Disposable Gravity Column (製品コード 635606) などに充填し、Wash 画分を回収する。
7. SDS-PAGE による確認を行う。

< V-b. 目的タンパク質の透析中の切断～ TALON による精製 >

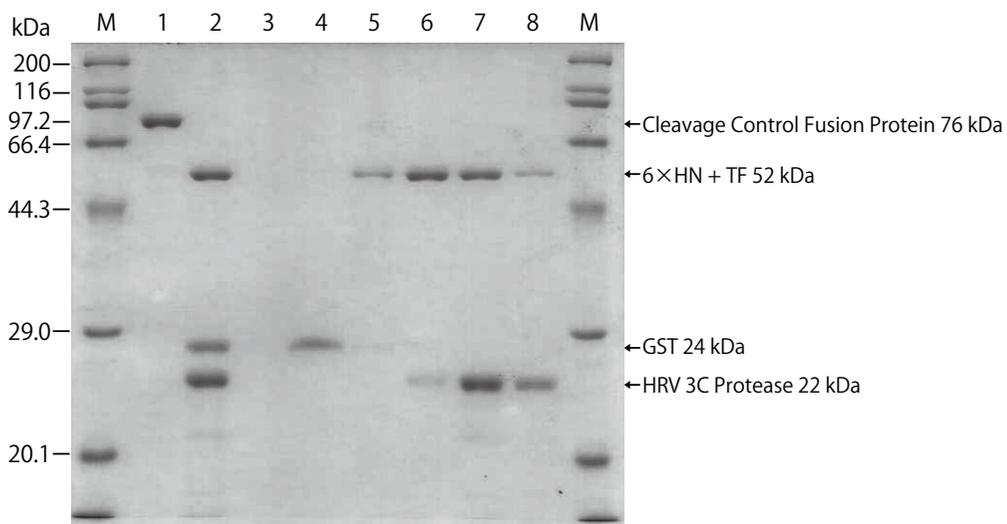
1. あらかじめ、必要量の 10 × HRV 3C Cleavage Buffer を 10 倍に希釈して、1 × HRV 3C Cleavage Buffer を作製し、4℃においておく。以下の操作は 4℃もしくは氷上で行う。
2. [HRV 3C Protease : 目的タンパク質] の混合比率 (unit/ μ g) が [1 : 10] となるように、目的タンパク質溶液に酵素を添加し、透析チューブへ入れる。透析膜は、22 kDa MWCO 以下を推奨する。
3. 2. の混合液の約 100 倍量の 1 × HRV 3C Cleavage Buffer 中で 4℃、16 時間透析を行う。
4. TALON Metal Affinity Resin などの IMAC により、タグおよび HRV 3C Protease を除去する。(V-a-(2). 4 ～ 6 参照)
5. SDS-PAGE による確認を行う。

< V-c. 金属キレートカラム上での切断 >

1. あらかじめ、必要量の 10 × HRV 3C Cleavage Buffer を 10 倍に希釈して、1 × HRV 3C Cleavage Buffer を作製し、4℃においておく。以下の操作は 4℃で行う。
2. TALON 2 ml Disposable Gravity Column に、適当量の TALON Metal Affinity Resin* を添加し、ベット容量の 10 倍量の Equilibration Buffer を加えて平衡化する。
* : TALON Metal Affinity Resin のタンパク質結合容量は、約 5 ～ 15 mg/ml Resin である。
3. TALON Resin に目的タンパク質を添加する。
4. カラムの上下にキャップをつけて、穏やかに 1 時間転倒混和して、目的タンパク質を Resin に吸着させる。
5. カラム容量の 5 倍量 (10 ml) の Equilibration Buffer をカラムに通して、未吸着のタンパク質を洗い流す。
6. カラム容量の 10 倍量 (20 ml) の 1 × HRV 3C Cleavage Buffer をカラムに通して、カラムを平衡化する。
7. 適当量の HRV 3C Protease を添加し、緩やかに転倒混和する。4℃、16 時間反応する。
8. カラム容量の 5 倍量 (10 ml) の Wash Buffer (5 mM imidazole を含む Equilibration Buffer) で、HRV 3C Protease で切断された His タグ配列を含まない目的タンパク質を溶出する。目的タンパク質は Wash 画分に溶出されるので、注意する。
9. 必要に応じて、Elution Buffer をカラムに添加して、His タグを持つ切断タンパク質および未切断のタンパク質を回収する。
10. 各画分を SDS-PAGE で確認する。

VI. 実験例：Cleavage Control Fusion Protein を基質とした場合の実験例

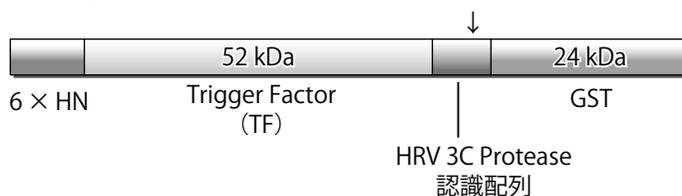
10 μ g の Cleavage Control Fusion Protein をプロトコルの「V-a. 溶液での切断」に従って、4°C で 16 時間で反応を行った。反応後、TALON Metal Affinity Resin および TALON 2 ml Disposable Gravity Column を用いて精製を行った。TALON Resin のフロースルー、Wash 画分、溶出画分の SDS-PAGE を行い、GST と、HN タグ融合 TF および HRV 3C Protease の分離を確認した。



12% SDS-PAGE LabSafe GEL Blue (製品コード 786-35) で染色

- M : Protein Molecular Weight Marker (Broad) (製品コード 3452)
Lane 1 : Cleavage Control Fusion Protein (76 kDa)
Lane 2 : HRV 3C Protease で切断後の反応液：GST (24 kDa)、HN 融合 TF (52 kDa)、HRV 3C Protease (22 kDa) が含まれる。
Lane 3 : TALON Resin フロースルー
Lane 4 : TALON Resin Wash 画分：GST が含まれる。
Lane 5 ~ 8 : TALON Resin 溶出画分：HN タグ融合 TF および HRV 3C Protease が含まれる。

Cleavage Control Fusion Protein の構造：



VII. 関連製品

pCold™ TF DNA (製品コード 3365)
pCold™ ProS2 DNA (製品コード 3371)
pCold™ GST DNA (製品コード 3372)
TALON® Metal Affinity Resin (製品コード 635501 ~ 4/635652/635653)
TALON® 2 ml Disposable Gravity Column (製品コード 635606)

VIII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- TALON は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。pCold はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社