

WELQ Protease (5U/ μ l)

产品编号	产品名称	包装
P2311S	WELQ Protease (5U/ μ l)	500U
P2311M	WELQ Protease (5U/ μ l)	2500U
P2311L	WELQ Protease (5U/ μ l)	10kU

产品简介:

- 碧云天生产的WELQ Protease, 也称WELQut Protease、WELQ蛋白酶或WELQut蛋白酶, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的重组蛋白酶。WELQ蛋白酶能特异性地识别四肽序列Trp-Glu-Leu-Gln (W-E-L-Q), 并对Gln (Q)之后的肽键进行酶切, 常用于重组蛋白除去His或者其它融合标签, 其最突出优势是酶切后不会在目的蛋白的N端留下任何额外的氨基酸残基。
- 本WELQ蛋白酶反应条件比较宽泛。WELQ蛋白酶是一种源自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的丝氨酸蛋白酶类似蛋白(Serine protease-like proteins) [1,2], 该蛋白酶反应时不需要特殊的反应缓冲液, 能在比较宽泛的温度区间(4-30°C)及pH区间(6.5-9.0)识别WELQ多肽序列, 并在Gln (Q)之后进行蛋白或多肽的剪切。
- 本WELQ蛋白酶能适用于His标签蛋白的柱上酶切。本WELQ蛋白酶带有His标签, 特别适用于His标签蛋白的柱上酶切。在切割His标签蛋白的时候, 切下的His标签和WELQ蛋白酶可结合于His纯化柱(His-tag Purification Resin)上, 而目的蛋白在穿透液中, 这样洗脱下来的蛋白中理论上就不会含有His标签和WELQ蛋白酶, 极大地方便了目的蛋白的纯化。如果不进行柱上酶切, 分别过镍柱和能除去目的蛋白融合标签的纯化柱也可以方便地去除WELQ蛋白酶和目的蛋白上切割下来的标签。
- 碧云天的WELQ Protease活性鉴定结果可参考图1。

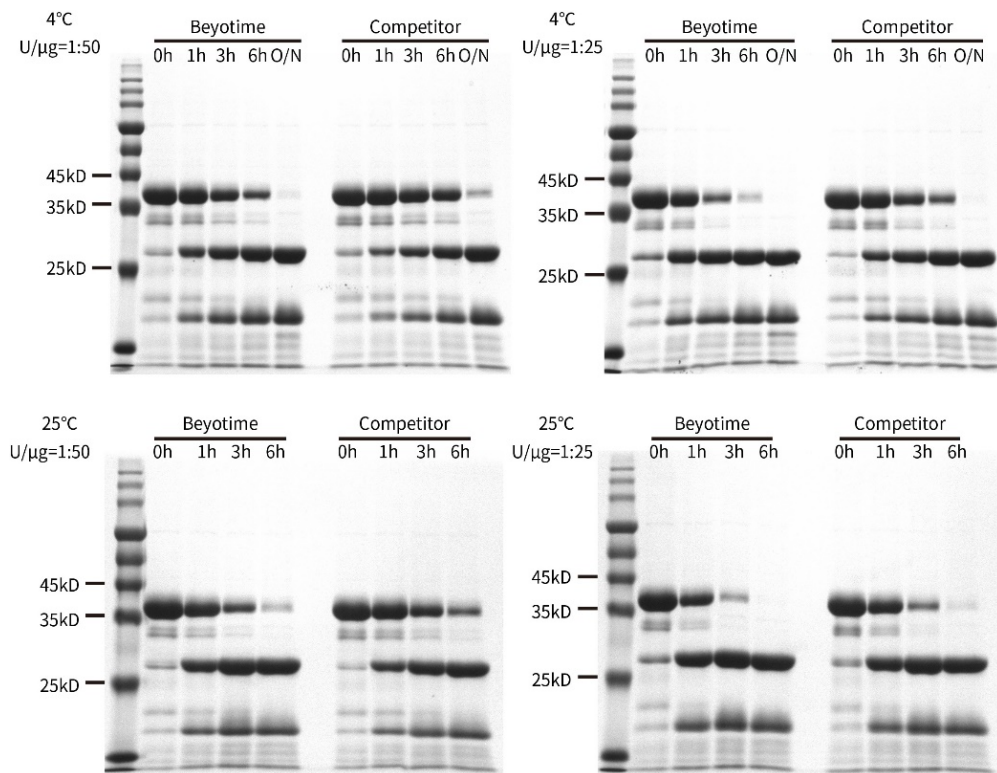


图1. 碧云天的WELQ Protease (P2311)与T公司同类产品(Competitor)切割GST标签融合蛋白(WELQ四氨基酸序列位于GST和10kD目的蛋白之间)的效果图。将含有WELQ Protease识别位点的36kD GST标签融合蛋白与WELQ Protease进行反应, 底物的用量为50 μ g, 酶的用量分别为1U和2U, 在50mM Tris-HCl (pH8.0)的缓冲液中反应, 设置4°C与25°C两种反应温度, 在反应0、1、3、6小时以及过夜(Overnight, O/N) (超过16小时)后取样, 进行SDS-PAGE电泳和考马斯亮蓝染色。酶切产物大小为约10kD的目的蛋白和约26kD的GST标签。如图所示, 本产品与T公司(Competitor)的WELQ蛋白酶具有相当的活性。实际效果会因样品种类、检测条件等不同而存在差异, 本图仅供参考。

- WELQ Protease分子量大小约22kDa, 纯度 \geq 95%。不含DNA内切酶和外切酶, 不含RNA酶, 不含磷酸酯酶。

- 酶活性单位定义：The amount of enzyme required to cleave $\geq 99\%$ of 100 μg of a control protein in 16h at 20°C.
- WELQ Protease储存液组成为：10mM Na_2HPO_4 ，1.8mM KH_2PO_4 ，140mM NaCl，2.7mM KCl，50% (v/v) Glycerol，pH7.3。
- WELQ Protease的酶切体系中可以兼容0.01-1% Triton X-100/Tween-80，5-50mM DTT，100mM NaCl，20-300mM Imidazole，100mM Tris-HCl (pH8.0)，100mM Na_3PO_4 (pH7.4)，20mM K_3PO_4 (pH7.4)。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2311S	WELQ Protease (5U/ μl)	500U
P2311M	WELQ Protease (5U/ μl)	2500U
P2311L	WELQ Protease (5U/ μl)	10kU
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，至少两年有效。

注意事项：

- 2M尿素、0.25M盐酸胍会抑制WELQ Protease的部分酶活性。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. WELQ Protease酶切条件优化。

WELQ Protease识别位点的暴露程度、位点附近的氨基酸序列以及蛋白的聚集程度都会影响WELQ Protease的酶切效果。因而对不同的蛋白进行酶切时，建议通过预实验来优化酶切条件。建议从以下三个方面进行酶切条件的优化：反应温度(4-30°C)、反应时间(1-12h或过夜)、酶的用量(酶活性单位数量与目的蛋白微克数比例(U/ μg)为1:5-1:100)。如下是一个简单的摸索酶用量、反应时间的实验方案。

a. 按照下表设置酶切反应体系：

Component	Amount
Target Protein	50 μg
WELQ Protease (5U/ μl)*	0.5/1/2/10U
Reaction Buffer**	To 50 μl

*设置酶与底物蛋白的比例分别为1:100、1:50、1:25、1:5(U/ μg)。除1:5的比例外，建议将WELQ Protease稀释至0.5U/ μl 后使用。

**建议使用10-100mM Tris-HCl (pH8.0)作为Reaction Buffer。

- b. 将反应混合物置于15-30°C反应。分别在反应1、3、6、12小时(或过夜)后，取出10 μl 酶切产物，用于后续的SDS-PAGE检测。当反应时长大于16小时时，建议酶切反应温度设置在20°C以下。
- c. 将上一步骤的留取的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分析，选择比较理想的反应的条件。确定了优化后的反应条件后，后续可以等比例扩大反应体系，选择进行溶液体系中的酶切或柱上酶切。如果用于柱上酶切，可能后续还需要进一步的调整酶用量等的酶切条件优化。

2. 融合蛋白在溶液体系中的酶切和纯化。

- a. 推荐使用10-100mM Tris-HCl (pH8.0)、10-100mM Na_3PO_4 (pH7.4)或10-20mM K_3PO_4 (pH7.4)作为Reaction Buffer进行酶切。**注：**如果酶切后的目的蛋白后续需要进行亲和层析，Reaction Buffer可以含有50mM NaCl以及5-20mM Imidazole。
- b. 按照优化后的酶与目的蛋白的比例和酶切时间，加入WELQ Protease，在15-30°C中进行反应。**注：**如果蛋白不稳定或者酶切反应时长大于16小时，建议选用4-20°C进行反应。
- c. 将酶切后的蛋白样品加入预先用Reaction Buffer平衡好的BeyoGold™ His-tag Purification Resin (P2210/P2218/P2220/P2233)中，室温结合20-30分钟。
- d. 500 $\times\text{g}$ 离心5分钟，收集上清，其中含有切除了标签的目的蛋白，WELQ Protease则结合在凝胶沉淀中。如果目的蛋白是His标签蛋白，那么残留的没有被酶切的His标签蛋白、WELQ Protease和酶切下来的His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。如果目的蛋白不是His标签融合蛋白，那么切除下来的带有WELQ的片段，还需要用适当的方法去除，例如如果是GST标签，那么可使用GST纯化柱去除GST标签。

3. 融合蛋白的柱上酶切和纯化。

如果目的蛋白带有His标签并且His标签的羧基端(C端)同时带有WELQ序列，本WELQ Protease可以在镍柱亲和层析过程中进行融合蛋白的酶切。目的蛋白在与镍柱结合时被切割，并进一步被洗脱，留下目的蛋白的His标签和带有His标签的WELQ Protease于柱上。

- a. 利用SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色估计待纯化和酶切的目的蛋白的总量。
- b. 按照常规操作流程将目的蛋白结合至镍柱上。
- c. 使用2-4倍柱体积缓冲液，如50-100mM Tris-HCl，50mM NaCl，5-20mM Imidazole (pH8.0)、50-100mM Na_3PO_4 ，50mM NaCl，5-20mM Imidazole (pH7.4)，或者10-20mM K_3PO_4 ，50mM NaCl，5-20mM Imidazole (pH7.4)，平衡亲和层析柱2

次。

- d. 按照酶切优化实验中确定的蛋白酶/重组蛋白比例，将WELQ Protease加入上一步镍柱平衡用的缓冲液中混匀后，加到柱上。**注：**如果蛋白酶/重组蛋白比例尚未确定，推荐使用1:20(U/μg)或者1:10(U/μg)的比例。
- e. 在15-30°C中反应适当时间。**注：**如果反应时长尚未确定，推荐在4-20°C中反应12小时或者过夜。
- f. 收集洗脱下来的目的蛋白。亲和标签和带有His标签的WELQ Protease结合于柱上。

常见问题：

1. 为什么酶切不完全？

- a. 可能是酶与底物蛋白的比例不合适。建议确定待酶切目的蛋白的含量，调整加入WELQ蛋白酶的量。
- b. 可能是孵育时间不够长。建议延长反应时间。
- c. 可能是酶切位点并未表达或发生了突变。建议测序确认序列是否正确。
- d. 可能是酶切位点并未暴露出来。建议尝试使用非离子型变性剂(如0.01-1% Triton X-100/Tween-80)使蛋白发生可逆变性，从而将酶切位点暴露出来。
- e. 可能是缓冲液内含有WELQ蛋白酶的抑制剂。建议将目的蛋白透析至合适的反应缓冲液中。

2. 为什么会出现不正确的条带？

- a. 可能是目的蛋白上出现了其它类似的酶切位点。建议调整酶切条件(如盐浓度、反应时间或者温度)，降低类似酶切位点的暴露程度。如果待表达纯化的目的蛋白本身含有WELQ序列，就不适合使用WELQ蛋白酶进行酶切了。
- b. 可能是蛋白在菌体内发生降解。建议使用蛋白酶缺陷的菌株。

参考文献：

1. Dubin G, Stec-Niemczyk J, Kisielska M, Pustelny K, Popowicz GM, et al. J Mol Biol. 2008. 379(2):343-56.
2. Popowicz GM, Dubin G, Stec-Niemczyk J, Czarny A, Dubin A, et al. J Mol Biol. 2006. 358(1):270-9.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
AH367	His-tag抗体(小鼠单抗)	>20次
D5002-1μg	pTac-His-MBP-WELQ(原核活性蛋白高表达质粒)	1μg
D5002-100μg	pTac-His-MBP-WELQ(原核活性蛋白高表达质粒)	100μg
D5005-1μg	pTac-GST-WELQ	1μg
D5005-100μg	pTac-GST-WELQ	100μg
D5008-1μg	pT7-N-His-WELQ	1μg
D5008-100μg	pT7-N-His-WELQ	100μg
D5010-1μg	pT7-N-His-PSP-SUMO-WELQ	1μg
D5010-100μg	pT7-N-His-PSP-SUMO-WELQ	100μg
P2210	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	10ml
P2218	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	100ml
P2220	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合型)	1000ml
P2226	His标签蛋白纯化试剂盒(耐还原螯合型)	10ml
P2229S	His标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)	10ml
P2233-10ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	10ml
P2233-100ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	100ml
P2233-1000ml	BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)	1000ml
P2302	PreScission Protease	100U
P2303	PreScission Protease	500U
P2307	TEV Protease (His-tag)	1000U
P2308	TEV Protease (His-tag)	10000U
P2310S	TEV Protease (GST/His-tag)	1000U
P2310M	TEV Protease (GST/His-tag)	10000U
P2312S	SUMO Protease	200U
P2312M	SUMO Protease	1000U
P2312L	SUMO Protease	5000U

Version 2022.11.27