

GEBRAUCHSANLEITUNG

TEV Protease, rekombinant (Kat.-Nr. 36403)



SERVA Electrophoresis GmbH - Carl-Benz-Str. 7 - 69115 Heidelberg
Phone +49-6221-138400, Fax +49-6221-1384010
e-mail: info@serva.de -<http://www.serva.de>

Inhalt

1. Allgemeine Informationen	2
1.1. Eigenschaften und Vorteile	2
1.2. Komponenten	2
1.2.1. Lagerungspuffer	2
1.2.2. Empfohlener Reaktionspuffer	2
1.2.3. 20x TEV Reaktionspuffer	2
1.3. Anwendung	3
1.4. Lagerungsbedingungen	3
2. Protokoll	3
3. Reaktionsoptimierung	4

1. Allgemeine Informationen

Rekombinante **TEV Protease** ist eine stark positionsspezifische Cysteinprotease, die im Tabakätzvirus gefunden wird. Aufgrund der Sequenzspezifität ist die TEV Protease ein sehr leistungsfähiges Reagens zur Entfernung von Fusions-Tags aus rekombinanten Proteinen nach Proteinreinigung.

Das Enzym wurde genetisch modifiziert, um seine Aktivität und seine Autolyse-Resistenz zu erhöhen. Es besteht aus der katalytischen Domäne von 27 kDa mit einer N-terminalen Polyhistidin-Markierung.

Die **TEV Protease** erkennt spezifisch eine 7-Aminosäuresequenz der allgemeinen Form Glu-XX-Tyr-X-Gln ↓ (Gly / Ser), am häufigsten Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln ↓ Gly, und spaltet zwischen Glutamin und Glycin oder Serin.

Die **TEV Protease** kann auch verwendet werden, um die Affinitätsmarkierung von einem Fusionsprotein, das auf dem Affinitätsharz immobilisiert ist, zu spalten. Nach dem Verdau kann die Protease leicht durch Affinitätschromatographie unter Verwendung der Polyhistidin-Markierung am N-Terminus der Protease aus der Spaltungsreaktion entfernt werden.

1.1. Eigenschaften und Vorteile

- Spezifische Aktivität: 1 U/μl
- Ursprung: recombinant in *E. coli* exprimiert
- Erhöhte Enzymstabilität für verlängerte Proteaseaktivität
- Enzymaktivität über einen breiten Temperatur- (4 °C bis 37 °C) und pH-Bereich (6,5 bis 8,5).

1.2. Komponenten

TEV Protease 1 U/μl	1 ml
20x TEV Reaction Buffer	1 ml
100 mM DTT	0,5 ml

1.2.1. Lagerungspuffer

100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% (v/v) Glycerol

1.2.2. Empfohlener Reaktionspuffer

50 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT

1.2.3. 20x TEV Reaktionspuffer

1 M Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA

1.3. Anwendung

Abspaltung von Affinitäts-Tags bei Fusionsproteinen

1.4. Lagerungsbedingungen

Für die Langzeitlagerung sollten die Komponenten bei - 15 °C bis - 25 °C gelagert werden. Der Puffer kann kurzzeitig auch bei + 2 °C bis + 8 °C gelagert werden.

2. Protokoll

- Die nachfolgenden Komponenten werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

Komponente	Menge
20x TEV Reaktionspuffer	5 µl
100 mM DTT ⁽¹⁾	1 µl
Fusionsprotein ⁽²⁾	20 – 30 µg ⁽³⁾
TEV Protease 1 U/µl	10 µl (10 U)
ddH ₂ O	auf 100 µl auffüllen

⁽¹⁾ Wenn erwartet wird, dass das Zielprotein Disulfidbindungen enthält, sollte DTT nicht in der Reaktion verwendet werden. In einem solchen Fall verwenden Sie stattdessen 3 mM Glutathion oder 0,3 mM oxidiertes Glutathion. Wenn Ihr Zielprotein Zinkfinger enthält, sollten Sie DTT durch β-Mercaptoethanol (bis zu einer Endkonzentration von 14 mM) ersetzen und EDTA durch einen schwächeren Metallchelator wie Citrat (bis zu einer Endkonzentration von 5 mM) zu ersetzen.

⁽²⁾ TEV Protease toleriert eine Reihe von Pufferkomponenten, z. B. Phosphat, MES oder Acetat.

⁽³⁾ Ist die Spaltstelle des Fusionsproteins sterisch blockiert, z. B. wenn die Proteasespaltstelle zu dicht an einer geordneten Struktur im Zielprotein liegt oder wenn das Fusionsprotein in Form von löslichen Aggregaten vorliegt, sollte mehr Protease eingesetzt werden.

- Das Reaktionsgemisch wird 2 bis 6 h bei 16 °C bis 30 °C inkubiert. In seltenen Fällen kann eine Inkubation über Nacht erforderlich sein. Wenn das Ziel-Protein hitzestabil ist, sollte die Inkubation bei + 4 °C erfolgen. Reaktionen bei + 4 °C erfordern längere Inkubationszeiten (über Nacht) und/oder mehr **TEV Protease**.
- Nach 2, 4 und 6 Stunden Inkubationszeit werden 20 µl-Aliquots aus der Reaktion genommen und zur weiteren Analyse mit SDS PAGE Probenpuffer versetzt. Die Aliquots können dann bei - 20 °C gelagert werden bevor die Spalt-Effizienz mittels SDS PAGE analysiert wird.
- Die Spaltungsbedingungen, die für einen kleinen Maßstab optimiert wurden, können proportional an spezifischen Anwendungserfordernis angepasst werden.

3. Reaktionsoptimierung

- Um die Spaltung eines spezifischen Fusionsproteins zu optimieren, kann eine Vielzahl von Variablen untersucht werden:
 - Menge des Enzyms (Protease-Zielprotein-Verhältnis)
 - Inkubationstemperatur
 - Inkubationszeit
- Wenn möglich, führen Sie zuerst eine kleine Reaktion durch, um die Effizienz des Prozesses zu überprüfen.
- Die Effizienz der Spaltung kann aufgrund der Sequenzen um die Spaltstelle herum, der Konformation und der Löslichkeit des Zielproteins variieren. Aufgrund der hohen Spezifität kann mehr Enzym oder längere Spaltungszeit bei höherer Temperatur (37 °C) verwendet werden, um eine hohe Effizienz zu erreichen, ohne die Spezifität zu beeinträchtigen.
- **TEV Protease** kann durch Inkubation mit einem geeigneten Nickel-Chelat-Harz aus der Reaktion entfernt werden, um das His-Tag zu binden (DTT und EDTA sollten zuerst entfernt werden). Befolgen Sie hierbei die Bindungsanweisungen für das Affinitätsharz der Wahl. Das gespaltene Ziel-Protein befindet sich in der Durchfluß- (Säulenchromatographie) oder Überstandsfraction (Batch-Verfahren). Wenn das Enzym zur Entfernung eines Polyhistidin-Tags verwendet wird, wird dieses Polypeptid ebenfalls aus der Reaktion entfernt.