

# TEV Protease

## TEV Protease

(*Tabak-Ätzvirus, modifiziert*)

Artikel Nr.	Größe
E4310-01	1000 Einheiten
E4310-02	10000 Einheiten

### Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C.  
Keine Autolyse.  
Das Protein ist mindestens 9 Monate haltbar.

### 1 x Reaktionspuffer:

25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 14 mM β-Mercaptoethanol.

### Lagerungspuffer:

0,4 M NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) Glycerin.

### Qualitätskontrolle:

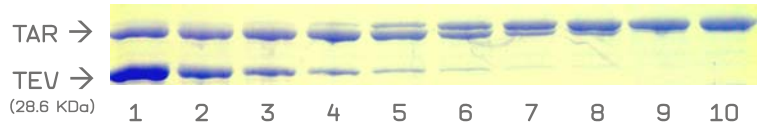
Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann. Unspezifische Protease-Aktivität ist nicht vorhanden.

### Literatur:

- Polayes D.A. et al. (1998) *Methods in Molecular Medicine* Vol.13: 169-183
- Dougherty, W.G. et al. (1989) *Virology* 172, 302.
- Dougherty, W.G. und Parks, T.D. (1989) *Virology* 172, 145.
- Dougherty, W.G. et al. (1988) *EMBO* 7, 1281.
- Kapust, R.B., et al. (2002a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 949-955.
- Nallamratty, S. et al. (2004) *Protein Expr Purif.* 38(1): 108-115.
- Mohanty, A.K. et al. (2003) *Protein Expr Purif.* 27: 109-114.

### Beschreibung:

- TEV Protease ist ein katalytischer Bestandteil des Proteins "a" (Nla) aus Einschlüssen des Zellkerns, die vom Tabakätzvirus (TEV) gebildet werden.
- TEV Protease ist eine Cystein-Proteinase. Sie erkennt und schneidet spezifisch ein lineares Epitop mit der allgemeinen Sequenz E-X-X-Y-X-Q-(G/S) (X ist eine beliebige Aminosäure) (2-5). Der Schnitt erfolgt zwischen Q und G/S. Für Fusionsproteine allgemein verwendete Sequenzen sind ENLYFQG oder ENLYFQS.
- Das Enzym ist resistent gegenüber zahlreichen gängigen Serin- und Cystein-Proteaseinhibitoren wie z.B.: PMSF, AEBSF, TLCK, E-64, "Complete" protease inhibitor cocktail (Roche).
- Das robuste Enzym arbeitet in einem breiten Bereich chemischer Bedingungen und kann mit verschiedenen Puffern verwendet werden. Es arbeitet bei NaCl-Konzentrationen zwischen 0 und 0,4 M sowie bei pH-Werten zwischen 4 und 9. Toleriert werden Substanzen wie MES, Azetat, Phosphat, Glycerin und Sorbitol.
- Das Enzym kann in einem breiten Temperaturbereich zwischen 4°C und 30°C eingesetzt werden. Damit eignet es sich auch für die Entfernung von Anhängen ("Tags") aus thermolabilen Proteinen. Das Enzym ist bei 4°C etwa um den Faktor 3 weniger aktiv als bei 30°C (6).
- Empfindlich gegenüber einigen Detergenzien (7).
- Das Enzym eignet sich hervorragend, um Affinitäts-Anhänge ("Tags") von Fusionsproteinen abzutrennen, unter schonenden Bedingungen für das Zielprotein.
- Das Enzym ist gegenüber dem Wildtyp gentechnisch verändert. Hierdurch wird die Enzympräparation vor Autolyse geschützt und die katalytische Aktivität gesteigert.



**Abbildung: Bestimmung der Enzymmenge an TEV Protease für effiziente Abtrennung.**

Die optimale Menge an TEV Protease für den Schnitt eines 35 kDa Fusionsproteins wurde durch SDS-PAGE Analyse bestimmt. TAR: Zielprotein (obere Bande: Fusionsprotein, untere Bande: geschnittenes Zielprotein ohne Affinitäts-Anhang), TEV: TEV Protease. Spuren 1-9, abnehmende Menge an Enzym bei einer konstanten Menge Fusionsprotein als Substrat, Spur 10: Kontrolle ohne Enzym. Der Schnitt wurde in 1x TEV Puffer für eine Stunde bei 30°C durchgeführt. Die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur und Reaktionszeit kann analog durchgeführt werden (1).

### Beispielprotokoll:

Ziel-Fusionsprotein (Beispielgröße: 35 kDa).....20 µg  
10x TEV buffer.....10 µl  
TEV Protease.....9 U  
H<sub>2</sub>O.....@ 100 µl

- Inkubation für eine Stunde bei 30°C. Temperaturempfindliche Ziel-Fusionsproteine werden entweder bei niedrigen Temperaturen für mindestens drei Stunden inkubiert oder die Proteasekonzentration wird erhöht, um die Inkubationszeit möglichst niedrig zu halten.
- Je höher das Molekulargewicht des Zielproteins, desto weniger Protease muss eingesetzt werden, um je 1 µg des Zielproteins zu schneiden. So werden beispielsweise lediglich 3 U TEV Protease benötigt, um 20 µg eines 100 kDa Fusionsproteins zu schneiden. In schwierigen Fällen (z.B. bei verminderter Zugänglichkeit der Schnittstelle) kann es nötig sein, die eingesetzte Menge an TEV Protease zu erhöhen.
- Nach erfolgtem Schnitt sollte ein Aliquot auf ein geeignetes SDS-PA Gel aufgetragen werden und die Vollständigkeit bzw. die Effizienz der Reaktion kontrolliert werden, indem der Anteil von geschnittenem zu nicht geschnittenem Zielprotein in Relation gesetzt wird. Die Reaktion kann optimiert werden durch Veränderung der Menge an eingesetzter TEV Protease, der Temperatur und der Inkubationszeit.

### Beispiel für die Einführung von TEV Schnittstellen durch PCR:

Im folgenden Beispiel wird gezeigt, wie ein PCR Primer am 5'-Ende durch Einfügen eines nicht-homologen Anhangs um eine Schnittstelle für TEV Protease erweitert wird. Die codierenden Nukleotidpositionen für die TEV Schnittstelle und ihre Aminosäure-Translation sind in blauer Farbe dargestellt. Klonierung erfolgt im Leserahmen durch Blunt-End Klonierung (z.B. Sma I). Zusätzlich eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme erleichtern ggf. nachfolgende Klonierungsschritte, sind aber nicht zwingend erforderlich (1). Der Zielprotein-spezifische Primerabschnitt hinter den blau gefärbten Sequenzabschnitten ist jeweils an das konkrete Design des Experimentes anzupassen.

E N L Y F Q G  
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His Met Val Asp Leu Glu  
5'-GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC CAT ATG GTC GAC C-3'-Oligo1  
3'-CTC TTA GAA ATA AAA GTC CCG GTA TAC CAG CTG GAG CT 5'-Oligo2  
NdeI Sall XhoI