

1. ОПИСАНИЕ

TEV-протеаза Клонинг Фасилити — каталитический домен белка **Nla** вируса гравировки табака (*Tobacco Etch Virus*) с дополнительными мутациями экспрессированная в *E. coli*.

2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

СТАНДАРТНЫЙ ПРОТОКОЛ ГИДРОЛИЗА

1. Диализовать белок против 20 мМ Tris-HCl, pH 7.5
2. К 10-30 μg белкового субстрата добавить воду до объема 85 μl .
3. Добавить 10 μl Реакционного буфера (10X) и 1 μl 100 мМ DTT.
4. Добавить 4 μl (10 ед.) TEV протезы.
5. Инкубировать при 30°C 1 час или при 4°C ночь.
6. Проверить степень расщепления с помощью SDS-PAGE.

3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- Реакционный буфер может быть заменен на MES, HEPES или фосфатный буфер (pH 6–9), если это необходимо для стабильности вашего белка.
- Если образец содержит > 2 М мочевины, > 0.5 М гуанидина или ингибиторы цистеиновых протеаз, необходимо провести диализ перед реакцией.
- При 4°C активность снижается примерно в 10 раз, учитывайте это при планировании ночной инкубации.
- В особенно трудных случаях соотношение фермента к субстрату может достигать до 1:5.

4. ЧАСТЫЕ ВОПРОСЫ (FAQ)

В: Мой белок содержит дисульфидные связи. Нужно ли добавлять DTT?

О: TEV — это цистеиновая протеаза, ей нужна восстановительная среда. Если DTT разрушает ваш белок, замените его на систему глутатиона (3 мМ GSH / 0.3 мМ GSSG).

В: Почему протеаза не режет мой белок, хотя сайт на месте?

О: Скорее всего, сайт ENLYFQ «спрятан» внутри глобулы. Попробуйте добавить гибкий линкер или провести реакцию в присутствии до 2М мочевины.

В: Как полностью избавиться от протеазы после реакции?

О: Наша протеаза содержит 6xHis-tag. Просто нанесите реакционную смесь на Ni-NTA смолу. Перед этим удалите DTT и ЭДТА диализом.

5. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

1000 ЕД.

1 пробирка: 400 мкл раствора TEV-протеазы;

1 пробирка: 1 мл 20x Реакционный буфер;

1 пробирка: 200 мкл 100x раствор 0.1М DTT;

1 пробирка: 50 мкл раствора контрольного белка (2 мкг/мкл)

6. ХАРАКТЕРИСТИКИ

АКТИВНОСТЬ

2.5 ед./мкл

ИНАКТИВАЦИЯ

10 мин при 65 °С

7. СОСТАВ РАСТВОРОВ

Буфер для хранения: 25 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 200 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол, 50% глицерин

Реакционный буфер (20x): 1 М Tris-HCl (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА

Буфер для хранения контрольного белка: 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT

8. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Одна единица активности соответствует количеству фермента, необходимому для расщепления 1 мкг химерного рекомбинантного белка (~54,7 кДа mScarlet3-mNeonGreen) до глубины гидролиза 90% в общем реакционном объеме 10 мкл за 1 час при 25 °С в стандартном реакционном буфере.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Рекомбинантная TEV-протеаза остается стабильной до 1 года при -20°C .
Допускается транспортировка при температуре до $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов.
Избегайте повторяющихся циклов оттаивания-замораживания, а также замораживания при -70°C .