MS 用トリプシン

Cat No. YC-3000　　使用説明書

【目的・用途】

質量分析用のトリプシンです。
トリプシンはリジンおよびアルギニン残基の C 末端側を特異的に切断するセリンプロテアーゼです。Lys および Arg 残基を持つタンパク質をトリプシン消化し、得られたペプチドを質量分析法により分析することでタンパク質を同定することができます。トリプシンは自己消化を抑制するため、還元アルキル化によって修飾されています。また、TPCK 処理とアフィニティー精製により擬似トリプシンを除去しているため、高純度です。添付のトリプシン溶解液でトリプシンを溶解することで、安定に保存できます。

【特徴】

1)　高純度（TPCK 処理とアフィニティー精製）

2)　高い安定性（凍結融解は 5 回まで可能です）

3)　高いコストパフォーマンス

【キット内容・保存方法】

内容	容量	保存方法	使用期限
トリプシン粉末	20 ug	-20°C※	1 年
トリプシン溶解液	200 uL		

※ 溶解後は適量ずつ分注し、-80°C保存してください。

【本品以外に準備するもの】

- 酵素反応用バッファー
- 35°Cの恒温槽またはヒートブロック
- ディスポーザブルの手袋
- クリーンベンチ

必要に応じてご用意ください。

- 還元アルキル化試薬
- 酵素反応用バッファー
- 酸性化用のトリフルオロ酢酸(TFA)またはギ酸
- 脱塩濃縮用の固相抽出チップ

【操作上の注意】

- 全ての操作はクリーンベンチなどの清浄な環境下にて手袋着用で作業し、使用する器具等も清浄なものを使用して下さい。
- 添付のトリプシンは自己消化を抑制するため修飾されていますが、それでも自己消化断片がある程度生成されます。
  (自己消化断片のスペクトルについては裏面をご覧ください)
- トリプシンは pH7-9 で最大活性を示し、pH<4 で不活性化します。
- 酵素消化は 50mM 重炭酸アンモニウム pH8、50mM　Tris　pH8、50mM TEAB pH8 などのバッファー中で行います。
- トリプシンは 0.1% SDS や 1M urea や 10% アセトニトリルなどの弱い変性条件中でも活性を維持します。
- タンパク質サンプルはあらかじめ還元アルキル化を行ってください。

【方法】

1）トリプシンストックの調製

トリプシン粉末	20ug
トリプシン溶解液	100uL
	100uL

適量ずつ分注し、-80°C保存

※ トリプシンストックの調製は失活防止のため、操作は氷上で行ってください。
※ トリプシンストックの凍結融解は 5 回まで可能です。
※ XL-Tryp Kit (ST-3010)、XL-Tryp Kit in Solution Digestion (YC-3230)をご使用の
場合はそれぞれのプロトコールに従って酵素消化を行ってください。

A. in-gel 酵素消化の場合

1）トリプシンストックを任意の酵素反応バッファーで 10 倍希釈します。
（活性化トリプシン溶液）
※活性化トリプシン溶液は使用直前に調製してください。
2）調製した活性化トリプシン溶液を脱色・洗浄したゲル片に加えます。
3）35°C・4 時間～O/N インキュベートします。
4）その後の実験に使用します。
※必要に応じて、酸性化や精製を行います。(下記参照)

B.　in-solution 酵素消化の場合

1）還元・アルキル化したタンパク質溶液にトリプシン：タンパク比が
1：20～1：100 (w/w) となるようにトリプシンストックを加えます。
2）35°C・4 時間～O/N インキュベートします。
3）その後の実験に使用します。
※必要に応じて、酸性化や精製を行います。(下記参照)

酸性化について

100uL の酵素消化済みサンプルに対して 2.5% TFA を 10uL 加えます。
pH 試験紙で pH<4 であることを確認します。

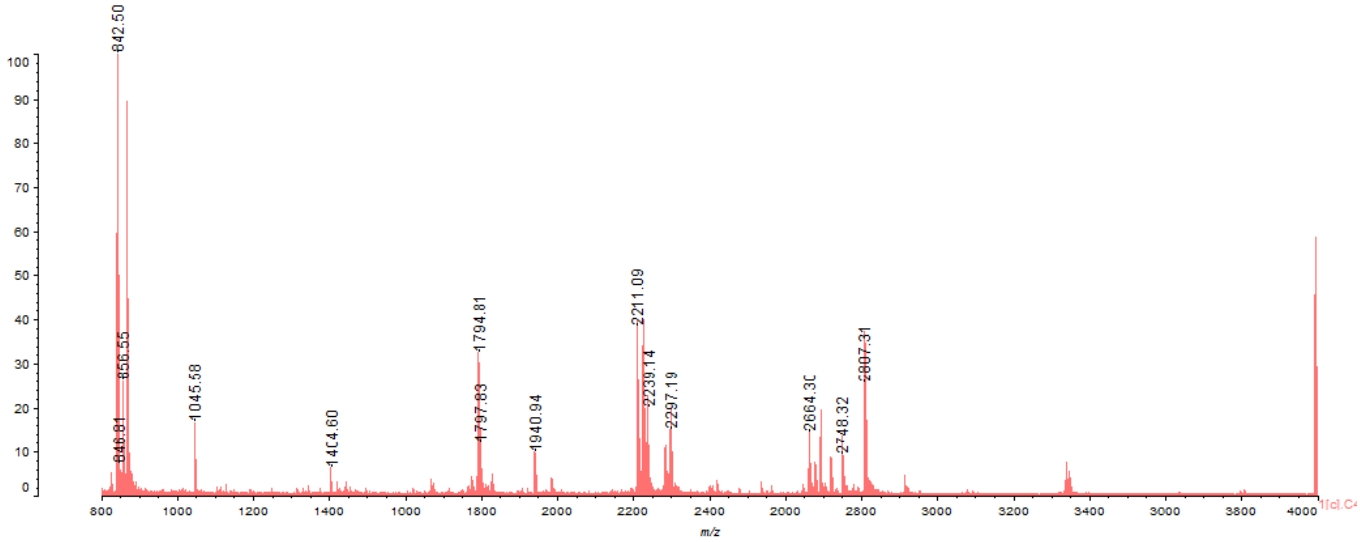
ペプチドの精製について

C18 カラムや C18 ピペットチップ等を用いてペプチドの精製を行います。

株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ
〒770-0865 徳島県徳島市南末広町４-53　エコービル４階
■Tel：088-678-6372　■Mail：bio@apro-s.com
■Url：https://apro-s.com/
本社　〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49

【トリプシン自己消化断片について】

タンパク質を含まないアクリルアミドゲルをサンプルとし、本品を使用してプロトコールに従ってゲル内トリプシン消化を行いました。トリプシン消化後の溶液を TFA を用いて酸性化した後、C18 ピペットチップを用いて脱塩濃縮を行いました。その後、マトリックス溶液で MALDI ターゲットプレートに溶出し、自然乾燥後 MALDI-MS 分析を行いました。



株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ
〒770-0865 徳島県徳島市南末広町４-53 エコービル４階
■Tｅｌ：088-678-6372 ■Mail：bio@apro-s.com
■Ｕｒｌ：https://apro-s.com/
本社 〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49