XL-Tryp Kit In-Solution Digestion

Cat No. YC-3230,YC-5002

【目的・用途】

溶液サンプルを還元アルキル化し、トリプシン消化するキットです。
質量分析において還元アルキル化はジスルフィド結合の多いタンパク質を高い収率と配列カバー率で同定するために重要です。20uL 以下のサンプル(10ug までのタンパク質)を還元アルキル化する試薬が 150 回分(YC-5002)含まれているキットと還元アルキル化し、トリプシン消化する試薬が 100 回分(YC-3230)含まれているキットがあります。
ゲル片サンプルの還元アルキル化には In-Gel R-CAM Kit(YC-5004)を、ゲル内酵素消化には XL-Tryp Kit(ST-3010)をご使用ください。
また、電気泳動前サンプルの還元アルキル化にはサンプルバッファーキット[構造解析 SDS-PAGE](SP-3020)をご使用ください。

【特徴】

1）高効率の還元アルキル化、トリプシン消化

2）プロテオーム解析の前処理に最適

3）独自の Ex 試薬により高いペプチド回収率

【キット内容・保存方法】

XL-Tryp Kit In-Solution Digestion　　Code No.YC-3230

内容	容量	保存方法	使用期限	使用方法
R-CAMバッファー	25 mL	4°C	1 年 (未開封)	プロトコール A、B
還元剤(DTT)	1 g			
ヨードアセトアミド(IAA)	1 g			
Tris-HCl　溶液	700 uL			プロトコール C
Ex試薬	200 uL			
トリプシン粉末	20 ug			
トリプシン溶解液	200 uL			

n-Solution R-CAM Kit　　Code No.YC-5002(約 150 回分)

内容	容量	保存方法	使用期限	使用方法
R-CAMバッファー	25 mL	4°C	1 年 (未開封)	プロトコール A、B
還元剤(DTT)	1 g			
ヨードアセトアミド(IAA)	1 g			

【本品以外に準備するもの】

- 超純水(比抵抗値 18MΩ以上)
- 35°Cの恒温槽またはヒートブロック
- 清浄で密栓可能なガラス容器(反応液の保存用)
- 卓上遠心分離機
- ディスポーザブルの手袋
- クリーンベンチ

【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。
- 下流の分析で阻害物質が含まれる場合は、事前に TCA 沈殿やカラムなどを用い、バッファー交換を行ってください。
- R-CAM バッファーには Tris が含まれております。

【方法】

A. 還元処理

● 準備するもの

・ 還元バッファー　(用時調製)

還元剤(DTT)	7.4mg
R-CAM バッファー	100uL
	100uL

1）20uL 以下のサンプル(～10ug タンパク質) 溶液に還元バッファー5uL を加え、総液量が 25uL となるように R-CMA バッファーを加えます。
※サンプルが酸性溶液に溶解している場合は R-CAM バッファーを加えたところで pH 試験紙等で中性になっていることを確認します。

2) 35°C・2 時間インキュベートします。

B. アルキル化処理

● 準備するもの

・ アルキル化バッファー　(用時調製、遮光)

ヨードアセトアミド(IAA)	9mg
R-CAM バッファー	50uL
	50uL

1）還元処理済みの溶液にアルキル化バッファー5uL 加えます。

2）室温・30min 静置します。(還元アルキル化されたサンプルです)

C. 酵素消化

● 準備するもの

・ 反応液　(4°C保存)

超純水	40mL
Tris-HCl 溶液	670uL
Ex 試薬	163uL
	40.833mL

・ トリプシンストック(-80°C保存)

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。
また、凍結融解は 5 回まで安定です。

1）トリプシンストックを反応液で 5 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用時調製です。使用直前に調製してください。

2）還元アルキル化したサンプルに反応液 215uL 加えます。

3）1)で調製した活性化トリプシン溶液を 5uL 加え、軽く撹拌してからスピンダウンします。

4） 35°C・4 時間～O/N インキュベートします。

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