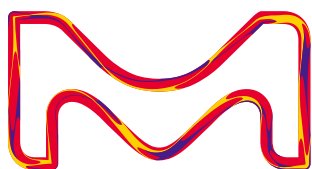
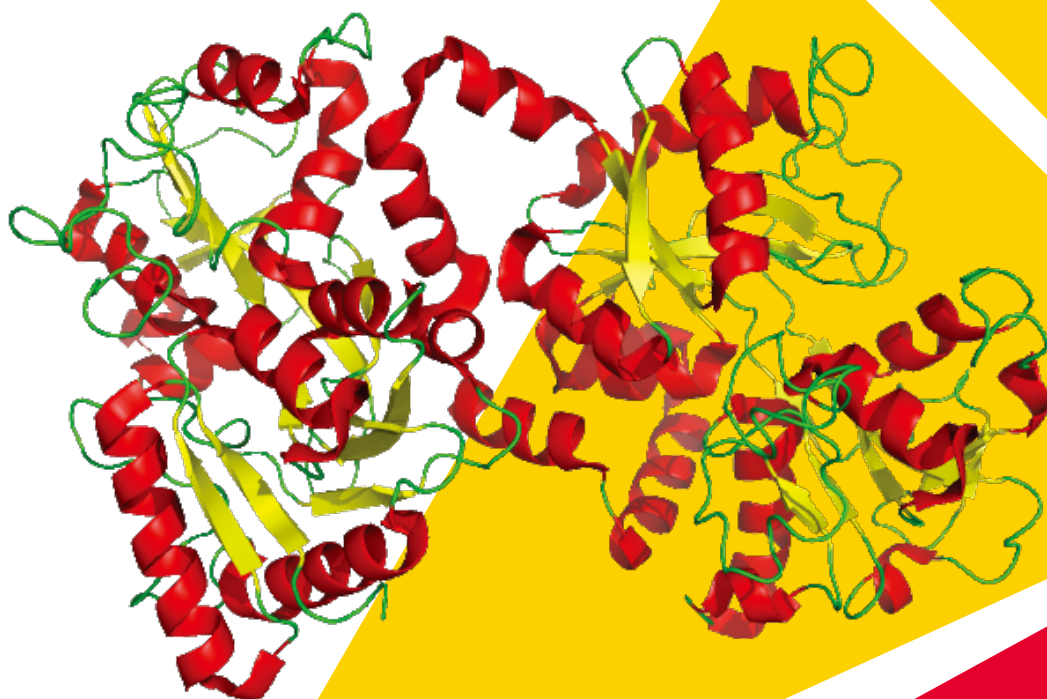


シーケンスグレードの プロテアーゼ

予測通りの結果のための選択的なタンパク質消化



Roche

The life science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in
the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

ペプチド・マッピングや、タンパク質の構造解析のために使用されるプロテアーゼは、明確な開裂選択性を有し、非特異的なプロテアーゼ活性が混在していないことが重要です。高特異性、高純度、Lot 間再現性の観点から、ロシュ社のシーケンスグレードプロテアーゼは、タンパク質・ペプチド解析に優れたツールです。

イントロダクション 2-3

シーケンスグレードプロテアーゼの製品概要・解説 4-5

マスマスプロテオミトリデータ 6-7

関連製品 8

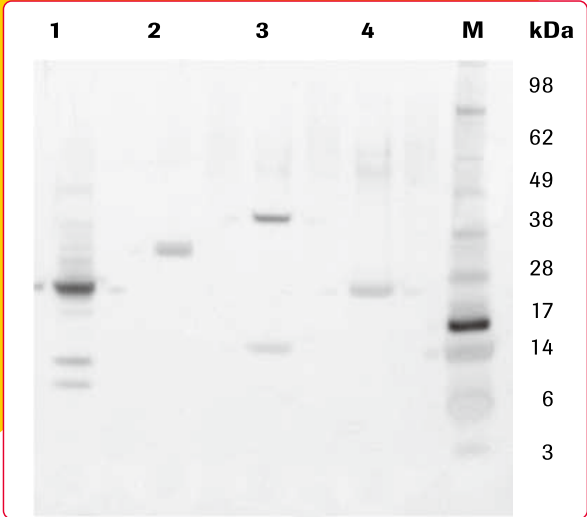


図1：ロシュ社のプロテアーゼは自己消化産物が少なく高純度
エンドプロテアーゼの SDS-PAGE 解析（銀染色）。各エンドプロテアーゼ 100 ng をゲルにアプライ。

Lane M: マーカー（SeeBlue, Invitrogen®）
Lane 1: Trypsin, Proteomics Grade (23.5 kDa)
Lane 2: Endoproteinase Sequencing Grade Lys-C (33 kDa)
Lane 3: Endoproteinase Sequencing Grade Arg-C (59 kDa)
Lane 4: Endoproteinase Sequencing Grade Asp-N (27 kDa)
自己分解が最小限であることが観察された。

開裂（切断）部位

プロテアーゼ（シーケンスグレード）	切断部位	
Chymotrypsin	-X- ↑ -Y-	Y = non-specific X = Trp, Tyr, Phe cleavage reduced if X = Leu, Met, Ala, Asp, Glu
Endoproteinase Arg-C	-Arg- ↑ -Y-	Y = non-specific
Endoproteinase Asp-N	- ↑ -Asp-Y- and - ↑ -CysSO ₃ H-Y-	Y = non-specific
Endoproteinase Glu-C	-Glu- ↑ -Y- and -Asp- ↑ -Y-	Y = non-specific
Endoproteinase Lys-C	-Lys- ↑ -Y-	Y = non-specific
Trypsin, Proteomics Grade	-Lys- ↑ -Y- and -Arg- ↑ -Y-	Y = non-specific

ロシュの広範にわたる酵素開発や最適化の実績は、実験を成功に導き、最適な結果を提供します

プロテアーゼはマスマススペクトロメトリー解析におけるタンパク質の分解に使用できます。

- 目的タンパク質の再現性の高い開裂パターンを達成。
- 明確な質量スペクトルは、配列確認や新規特性解析を容易にします。

高特異性の獲得

- 開裂部位は、既知配列のペプチドを用いて、高濃度 (1:10) およびオーバーナイトインキュベーション (16 時間) でテストされています。

純度の信頼性

- ペプチドの分離範囲に不純物は観察されません。
- 非特異的開裂は観察されず、予期されたペプチドのみが観察されます。

ロット間再現性からの利点

- 各ロットは、純度および特異性が試験されており、ペプチドシーケンシングにおいて不純物の混在は認められません。

高い安定性の確保

- 酵素は、既定の保存期間においてその安定性が保証されています。
- 酵素は、適切な環境下で分注かつ発送されています。

使用しやすいサイズ

- 各サイズは実験毎に必要な量を溶解できるように分注されています。

準備時間の短縮

- 再溶解のバッファー溶液は必要ありません。
- 凍結乾燥品は水または供給されたバッファー溶液に溶解します。

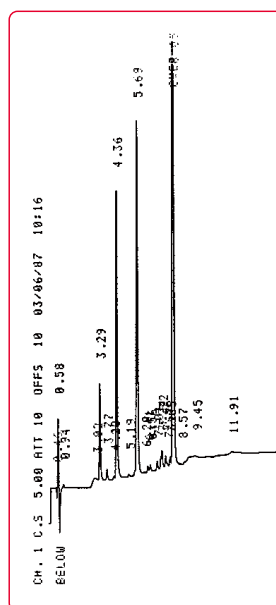


図 2：逆相 HPLC における、Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade の特異性検証

消化：

100 µg グルカゴンと 10 µg Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade を 100 µL の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 中で 18 時間、37°C にてインキュベーション。

サンプル：20 µL 消化物

逆相 HPLC：

カラム：Shandon ODS Hypersil, 5 µm

溶媒 A：水、0.1% (v/v) TFA を含む

溶媒 B：水：アセトニトリル = 30：70、

0.1% (v/v) TFA を含む

グラディエント：20 min リニア (0–100%B)

流速：1 mL/min

検出波長：215 nm

フラグメント：

3.29 min Asp (15) – Gln (20),

4.36 min His (1) – Ser (8),

5.69 min Asp (9) – Leu (14),

8.05 min Asp (21) – Thr (29)

変性剤	濃度	酵素活性
添加なし (コントロール)	—	100
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.001% (w/v)	113
	0.01% (w/v)	122
	0.1% (w/v)	10
尿素	0.1 mol/L	100
	0.5 mol/L	108
	1.0 mol/L	105
グアニジン 塩酸塩	0.1 mol/L	100
	0.5 mol/L	85
	1.0 mol/L	80
アセトニトリル	1% (v/v)	90
	5% (v/v)	115
	10% (v/v)	125

表 1：変性物質下における安定性

Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade 200 µg/mL を変性剤とともに 6 時間、25°C、25 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.8) 中にインキュベーション。Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade の活性は基質として azocoll を用いて決定。

シークエンスグレードプロテアーゼの製品概要・解説

最適な結果に導くロシュの高品質酵素

プロテアーゼ 由来 / EC. No. / 分子量	特異性	溶液調製	推奨使用濃度
Chymotrypsin Sequencing Grade ウシ膵臓由来 EC 3.4.21.1 Mr = 25 kD	セリン エンドペプチダーゼ チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp) の C 末端側のペプチド結合を特異的に加水分解。ロイシン (Leu)、メチオニン (Met)、アラニン (Ala)、アスパラギン酸 (Asp)、およびグルタミン酸 (Glu) の分解は低率。影響を受けやすいアミノ酸のアミド類、エステル類に作用。特異性は基質としてメリチンを用いて試験。	1 mM HCl に溶解	1:200 ~ 1:20 (プロテアーゼ：タンパク質重量比)
Endoproteinase Arg-C Sequencing Grade <i>Clostridium histolyticum</i> 由来 EC 3.4.22.8 Mr = 59 kD	システイン プロテアーゼ アルギニン (Arg) のカルボキシル基側における特異的なペプチド、エステル、アミド結合の加水分解。還元剤 (DTT 等) や Ca^{2+} が、完全活性化に要求される。	50 μL の蒸留水に 1 バイアルの内容物を溶解。最終的に 50 mM Tris-HCl buffer、10 mM CaCl_2 、5 mM EDTA、pH 8.0 中にて使用。活性化溶液は、最終的に 50 mM DTT と 5 mM EDTA になるように 100 μL の蒸留水に DTT と EDTA を溶解し作製。	1:200 ~ 1:50 (プロテアーゼ：タンパク質重量比)
Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade <i>Pseudomonas fragi</i> mutant 由来 EC 3.4.24.33 Mr = 27 kD	金属プロテアーゼ アスパラギン酸 (Asp)、システイン酸のアミノ基側におけるペプチド結合の加水分解。システインが還元もしくはアルキル化されている場合は、 - $\uparrow$ - Asp-X のみが開裂される。	50 μL の蒸留水に 1 バイアルの内容物を溶解。10 mM Tris-HCl pH 7.5 中にて使用。	1:200 ~ 1:20 (プロテアーゼ：タンパク質重量比)
Endoproteinase Glu-C Sequencing Grade <i>Staphylococcus aureus</i> V8 由来 EC 3.4.21.19 Mr = 27 kD	セリン プロテアーゼ アスパラギン酸 (Asp)、クエン酸のアミノ基側におけるペプチド結合の加水分解。システインが還元もしくはアルキル化されている場合は、 - $\uparrow$ - Asp-X のみが開裂される。	蒸留水に酵素を溶解。	1:100 ~ 1:20 (プロテアーゼ：タンパク質重量比)
Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade <i>Lysobacter enzymogenes</i> 由来 EC 3.4.21.50 Mr = 33 kD (reduced) Mr = 30 kD (nonreduced)	セリン プロテアーゼ リジンのカルボキシル基側におけるアミド、エステル、ペプチド結合を特異的に加水分解。	50 μL の蒸留水に 1 バイアルの内容物を溶解。最終的に 50 mM HEPES、10 mM EDTA、5 mg/mL ラフィノース、pH 8.0 中にて使用。	1:100 ~ 1:20 (プロテアーゼ：タンパク質重量比)
Trypsin recombinant, Proteomics Grade ブタ由来 <i>Pichia pastoris</i> にて発現 EC 3.4.21.4 Mr = 23.5 kD	セリン エンドプロテアーゼ 塩基性アミノ酸であるアルギニンとリジンのカルボキシル基側において、タンパク質、ペプチドを特異的に加水分解。アルギニン、リジン残基のアミドおよびエステル結合も開裂。	250 μL の溶解用溶液を 25 μg の酵素に加えて 0.1 mg/mL 溶液を作製。	1:100 ~ 1:20 (プロテアーゼ：タンパク質重量比)

阻害剤	pH 至適条件	アプリケーション	純度	カタログ番号 包装単位
アプロチニン DFP PMSF 10H- フェノチアジン -10- カルボン酸クロリド TPCK α 2- マクログロブリン α 1- アンチトリプシン 大豆トリプシンインヒビター キモスタチン APMSF によっては阻害されない	7.0 ~ 9.0	キモトリプシン単独もしくは他のプロテアーゼとの共用によるタンパク質の加水分解には、Chymotrypsin Sequencing Gradeを使用。ペプチドマッピング、フィンガープリンティング、配列解析に適合。	逆相 HPLC におけるペプチド特異的開裂や分離を妨害するような不純物不含。	11 418 467 001 4 x 25 μ g
酸化剤 SH 試薬 (e.g.TLCK) EDTA Co^{2+} Cu^{2+} Cd^{2+} クエン酸塩 ホウ酸塩 また Tris アニオンが一部阻害	7.2 ~ 8.0	ペプチドマッピング、フィンガープリンティング、配列解析のためのタンパク質、ペプチドの特異的開裂。溶液中、ゲル内、メンブラン上でのタンパク質の消化。	逆相 HPLC におけるペプチド特異的開裂や分離を妨害するような不純物不含。	11 370 529 001 3 x 5 μ g
EDTA α - フェナントロリン	7.0 ~ 8.0	タンパク質構造解析および配列解析には、Endoproteinase Asp-N Sequencing を使用。	逆相 HPLC におけるペプチド特異的開裂や分離を妨害するような不純物不含。 純度は SDS-PAGE および銀染色にて検証済み。	11 420 488 001 2 μ g 11 054 589 001 3 x 2 μ g
DFP α_2 - マクログロブリン TLCK	4.0 ~ 7.8	タンパク質構造解析および配列解析には、Endoproteinase Glu-C Sequencing を使用。	逆相 HPLC におけるペプチド分離を妨害するような不純物不含。	11 420 399 001 50 μ g 11 047 817 001 3 x 50 μ g
DFP TLCK アプロチニン ロイペプチン	8.5 ~ 8.8	タンパク質構造解析および配列解析には、Endoproteinase Lys-C Sequencing を使用。溶液中、ポリアクリルアミドゲルまたは、メンブラン上のタンパク質を消化するのに最適。	逆相 HPLC におけるペプチド分離を妨害するような不純物不含。 純度は、HPLC および SDS-PAGE (銀染色) にて検証済み。	11 420 429 001 5 μ g 11 047 825 001 3 x 5 μ g
TLCK DFP PMSF ロイペプチン 大豆トリプシンインヒビター 鶏卵由来トリプシンインヒビター アプロチニン α_2 - マクログロブリン α_1 - アンチトリプシン APMSF アンチパイニン	8.0 ~ 8.5	Trypsin recombinant、Proteomics Grade は、2 次元電気泳動または液体クロマトグラフィー法によって分離されたタンパク質を、特異的に消化するために使用。	他のプロテアーゼ由来の活性不含。 特に本製品にはキモトリプシン活性なし < 95% (ゲルろ過法)	03 708 985 001 4 x 25 μ g 03 708 969 001 4 x 100 μ g

マスマスプロトメトリーデータ

ペプチドを明確に同定

Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade によるリゾチームの消化 (16時間インキュベーション)

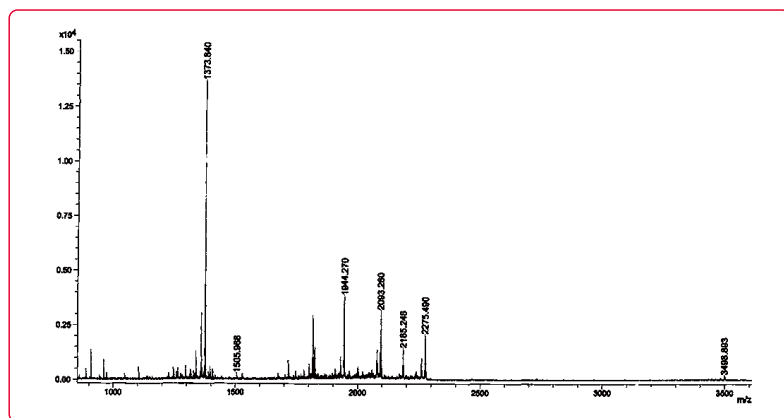


図 3 : Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade の消化条件

1 mg/mL のリゾチーム溶液を 1,4- ジチオスレイトールを用いて還元、ヨードアセタミドによりアルキル化を行った。高い酵素安定性を実証するために、まずリゾチームを Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade を用いて、1 : 100= 酵素 : タンパク質比により 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 中にて 25°C、24 時間、消化を行い、消化物を 37°C、16 時間インキュベートした。サンプルは弊社の ZipTip® μ -C18 ピペットチップを用いて脱塩し、MALDI マトリックス (α -cyano-4hydroxycinnamic acid、10 mg/mL 70% ACN 中、0.03% TFA) を用いて、MALDI ターゲット上に直接溶出した。MALDI 解析は、Reflex III インストルメント (Bruker® 社) を用いてリフクター陽イオンモードにて行った。

Peak	Amino Acid	Missed Cleavages	(M+H) +
P1	119 - 129	0	1373.84
P2	87 - 100	0	1505.97
P3	1 - 17	0	1944.27
P4	101 - 118	0	2093.26
P5	48 - 65	1	2185.25
P6	66 - 86	0	2275.49
P7	18 - 47	0	3498.89

シーケンス カバー率 : 100%

他のプロテアーゼのシーケンス カバー率 :

Trypsin, Proteomics Grade: 95%;

Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade: 100%;

Endoproteinase Arg-C Sequencing Grade: 100%

Trypsin, Proteomics Grade による rGFP の消化 (16 時間インキュベーション)

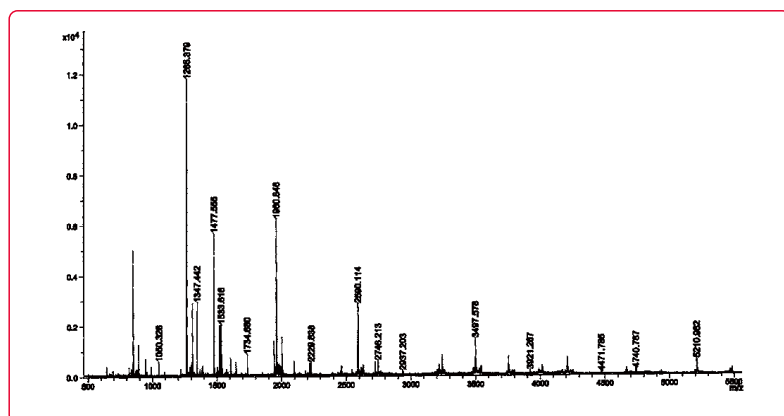


図 4 : Trypsin, Proteomics Grade 消化条件

1 mg/mL の rGFP 溶液を 1,4- ジチオスレイトールを用いて還元、ヨードアセタミドによりアルキル化を行った。rGFP は、Trypsin, Proteomics Grade を用いて、1 : 100= 酵素 : タンパク質比により 25 mM トリス、1 mM EDTA、2 M 尿素、pH 8.5 にて消化し、消化物を 25°C で 16 時間インキュベートした。サンプルは弊社の ZipTip μ -C18 ピペットチップを用いて脱塩し、MALDI マトリックス (α -cyano-4hydroxycinnamic acid、10 mg/mL 70% ACN 中、0.03% TFA) を用いて、MALDI ターゲット上に直接溶出した。MALDI 解析は、Reflex III インストルメント (Bruker 社) を用いてリフクター陽イオンモードにて行った。

Peak	Amino Acid	Missed Cleavages	(M+H) +
P1	114 - 122	0	1050.33
P2	86 - 96	0	1266.38
P3	97 - 107	1	1347.44
P4	110 - 122	1	1477.55
P5	114 - 126	1	1533.62
P6	127 - 140	1	1542.59
P7	97 - 109	2	1604.61
P8	108 - 122	2	1734.68
P9	110 - 126	2	1960.85
P10	141 - 156	0	1973.65
P11	141 - 158	1	2229.84
P12	216 - 238	0	2590.11
P13	215 - 238	1	2746.21
P14	132 - 156	1	2937.20
P15	127 - 156	2	3497.58
P16	4 - 41	1	3921.27
P17	169 - 209	0	4471.79
P18	167 - 209	1	4740.79
P19	169 - 215	2	5210.96

シーケンス カバー率 : 77%

他のプロテアーゼのシーケンス カバー率 :

Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade: 78%

Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade: 72%

リゾチームのEndoproteinase Lys-C Sequencing Gradeによる消化(1時間インキュベーション)

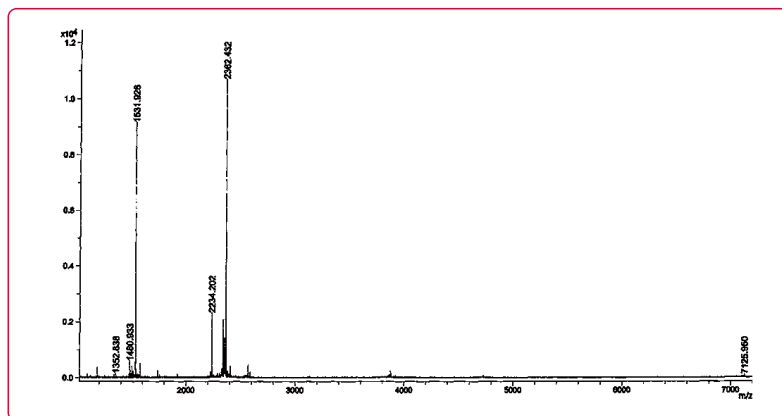


図 5 : Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade の消化条件

1 mg/mL のリゾチーム溶液を 1,4- ジチオスレイトールを用いて還元、ヨードアセタミドによりアルキル化を行った。リゾチームは、Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade を用いて、1 : 100= 酵素 : タンパク質比により 25 mM トリス、1 mM EDTA、2 M 尿素、pH 8.5 にて消化し、消化物を 37°C で 1 時間インキュベートした。サンプルは弊社の ZipTip μ -C18 ピペットチップを用いて脱塩し、MALDI マトリックス (alpha-cyano-4hydroxycinnamic acid、10 mg/mL 70% ACN 中、0.03% TFA) を用いて、MALDI ターゲット上に直接溶出した。MALDI 解析は、Reflex III インスツルメント (Bruker® 社) を用いてリフレクター陽イオンモードにて行った。

Peak	Amino Acid	Missed Cleavages	(M+H) +
P1	2 - 13	0	1352.84
P2	1 - 13	1	1480.93
P3	117 - 129	0	1531.93
P4	98 - 116	0	2234.20
P5	14 - 33	0	2337.28
P6	97 - 116	1	2362.43
P7	34 - 96	0	7125.95

シーケンス カバー率 : 100%

他のプロテアーゼのシーケンス カバー率 :

Trypsin, Proteomics Grade: 100%

リゾチームの Trypsin, Proteomics Grade を用いたゲル内消化 (16 時間インキュベーション)

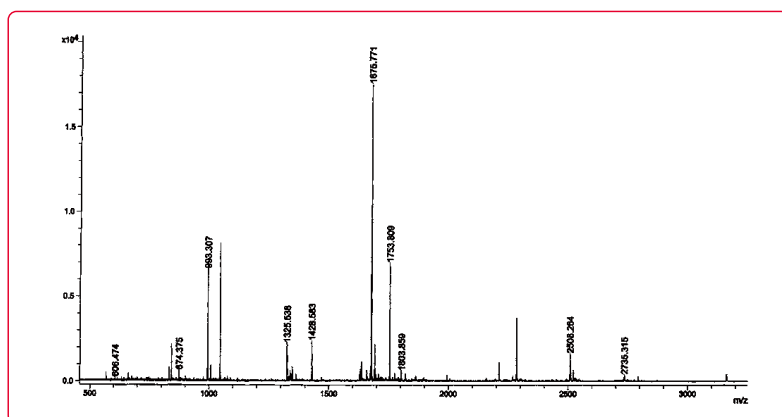


図 6 : Trypsin, Proteomics Grade のゲル内消化条件

クマシー染色されたタンパク質バンドを 0.1M 炭酸水素アンモニウム含有 30% アセトニトリルにより脱色し、1,4- ジチオスレイトールを用いて還元、ヨードアセタミドによりアルキル化を行った。タンパク質のバンドは、Trypsin, Proteomics Grade (0.28 μ g/ バンド) により、2 mM トリス (pH 8.5) 中にて消化した。消化物は 25°C で 16 時間、暗所にてインキュベートした。タンパク質は、20% アセトニトリル、0.1% TFA、および 1.3 mM トリス中に抽出した。サンプルは弊社の ZipTip μ -C18 ピペットチップを用いて脱塩し、MALDI マトリックス (alpha-cyano-4hydroxycinnamic acid、10 mg/mL 70% ACN 中、0.03% TFA) を用いて、MALDI ターゲット上に直接溶出した。MALDI 解析は、Reflex III インスツルメント (Bruker 社) を用いてリフレクター陽イオンモードにて行った。

Peak	Amino Acid	Missed Cleavages	(M+H) +
P1	1 - 5	1	606.47
P2	15 - 21	0	874.37
P3	62 - 68	0	993.31
P4	22 - 33	0	1325.54
P5	115 - 125	1	1333.56
P6	34 - 45	0	1428.58
P7	98 - 112	0	1675.77
P8	46 - 61	0	1753.81
P9	97 - 112	1	1803.86
P10	74 - 96	0	2508.26
P11	22 - 45	1	2735.32

シーケンス カバー率 : 84%

他のプロテアーゼのシーケンス カバー率 :

Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade: 84%;

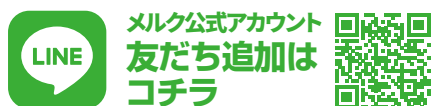
Endoproteinase Asp-N Sequencing Grade: 100%;

Endoproteinase Arg-C Sequencing Grade: 98%

関連製品

- グリコシル化は、真核生物細胞中のタンパク質における最も一般的な翻訳後修飾の1つです。糖の構造はゲノム配列から予測することができず、糖タンパク質から直接分析する必要があります。
- エンド、エクソ - グリコシダーゼの両方もしくはどちらかを使用することにより、側鎖が、N もしくは O 結合型か、またどのようなタイプの N 結合型であるかを検討することができます。
- DIG Glycan Differentiation Kit は、糖タンパク質の側鎖がどのようなものであるかを検討、解析をすることができます。

製品名	カタログ番号	包装単位
エンドグリコシダーゼ		
α-Amylase from pig pancreas	10 102 814 001	50 mg (5 mL)
Endoglycosidase H from <i>Streptomyces plicatus</i> , rec. from <i>E. coli</i>	11 088 726 001	1 U (200 µL)
	11 643 053 001	2.5 U (500 µL)
O-Glycosidase from <i>Diplococcus pneumoniae</i>	11 347 101 001	25 mU
N-Glycosidase F, lyophilizate PNGase F of <i>Flavobacterium meningosepticum</i> , rec. from <i>E. coli</i>	11 365 185 001	100 U
	11 365 193 001	250 U
N-Glycosidase F, solution PNGase F of <i>Flavobacterium meningosepticum</i> , rec. from <i>E. coli</i>	11 365 169 001	100 U (0.1 mL)
	11 365 177 001	250 U (0.25 mL)
Lysozyme Muramidase from hen egg white	10 837 059 001	10 g
エキソグリコシダーゼ		
Amyloglucosidase special quality for starch determination, from <i>Aspergillus niger</i>	11 202 332 001	500 U
	11 202 367 001	3,500 U
Amyloglucosidase from <i>Aspergillus niger</i>	10 102 857 001	100 mg (10 mL)
β-Galactosidase from <i>E. coli</i> overproducer	10 105 031 001	1,500 U
β-Galactosidase from <i>E. coli</i> overproducer, EIA grade	10 745 731 001	25 mg
β-Glucuronidase from <i>E. coli</i> K 12	03 707 580 001	1 mL
	03 707 598 001	5 mL
	03 707 601 001	15 mL
Neuraminidase (Sialidase) from <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	10 269 611 001	1 U (100 µL)
Neuraminidase (Sialidase) from <i>Clostridium perfringens</i> , special quality with low protease content	11 585 886 001	5 U
Neuraminidase (Sialidase) from <i>Vibrio cholerae</i>	11 080 725 001	1 U



メルク公式アカウント
友だち追加は
コチラ



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
カタログ
ファインダー



メルク ライフサイエンス公式 Facebook ページ
メルク ライフサイエンス - Merck で検索



メルク ライフサイエンス公式 Twitter アカウント
メルク ライフサイエンス - Merck で検索



メルク ライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格(税別)です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年6月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.sigma-aldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: sialjpcs@merckgroup.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

RBM178-2006-0.5K-H