

FUJIFILM

Wako

Code No. 160-28911 ( 25 mg )  
166-28913 (100 mg)  
164-28914 (500 mg)  
160-28916 ( 1 g )

## Proteinase K, recombinant プロティナーゼ K, 組換え体

**Source :** *Pichia pastoris* expressed *Parengyodontium album* (*Tritirachium album*) proteinase K

**Appearance :** White crystalline powder

**Activity :** Indicated on the label.

### Measurement of enzyme activity :

#### 1. Principle

Hemoglobin is reacted with proteinase K to hydrolyze. The obtained peptides are colored with a Phenol reagent.

[Trans] \*

#### 1. 原理

ヘモグロビンにプロティナーゼ K を作用させて加水分解し、生じたペプチドをフェノール試薬で呈色させる。

#### 2. Reagents

- A. 0.3 mol/L Trichloroacetic acid solution  
Dissolve 4.9 g of trichloroacetic acid in distilled water for the final volume of 100 mL.
- B. Phosphate buffer (pH 7.5)  
(Containing 6 mol/L urea and 5 mmol/L sodium chloride)  
Dissolve 0.680 g of potassium dihydrogen phosphate in distilled water for a volume of 50 mL. Add 36.04 g of urea and 0.03 g of sodium chloride, adjust pH to 7.5 with 1 mol/L sodium hydroxide solution, and dilute with distilled water to bring the volume up to 100 mL.
- C. Hemoglobin solution  
Dissolve 500 mg of hemoglobin from bovine blood in solution B for the final volume of 25 mL.
- D. 0.02 mol/L Calcium chloride solution  
Dissolve 0.55 g of calcium chloride in distilled water for the final volume of 250 mL.
- E. Enzyme solution  
Measure 4 mg of Proteinase K, recombinant exactly and dissolve in solution D for the final volume of 200 mL.
- F. Sodium carbonate solution  
Dissolve 6 g of sodium carbonate in distilled water for the final volume of 100 mL.
- G. L-Tyrosine standard solution  
Measure 10 mg of L-tyrosine exactly and dissolve in 0.2 mol/L hydrochloric acid for the final volume of 100 mL. (100  $\mu$ g tyrosine/mL)
- 1) G<sub>1</sub> solution  
Pipet 5 mL of this solution and dilute with distilled water

- to bring the volume up to 50 mL. (10  $\mu$ g tyrosine/mL)
- 2) G<sub>2</sub> solution  
Pipet 15 mL of this solution and dilute with distilled water to bring the volume up to 100 mL. (15  $\mu$ g tyrosine/mL)
- 3) G<sub>3</sub> solution  
Pipet 5 mL of this solution and dilute with distilled water to bring the volume up to 25 mL. (20  $\mu$ g tyrosine/mL)
- 4) G<sub>4</sub> solution  
Pipet 5 mL of this solution and dilute with distilled water to bring the volume up to 20 mL. (25  $\mu$ g tyrosine/mL)

[Trans] \*

#### 2. 試薬

- A. 0.3mol/L トリクロロ酢酸溶液  
トリクロロ酢酸 4.9g を水に溶解して 100mL とする。
- B. リン酸緩衝液 (pH 7.5)  
(6mol/L 尿素、5mmol/L 塩化ナトリウムを含む)  
りん酸二水素カリウム 0.680g を水に溶解して 50mL とする。  
さらに尿素 36.04g、塩化ナトリウム 0.03g を加え、1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.5 に調整し、水を加えて 100mL とする。
- C. ヘモグロビン溶液  
ヘモグロビン、ウシ血液由来 500mg を B 液に溶解して 25mL とする。
- D. 0.02mol/L 塩化カルシウム溶液  
塩化カルシウム 0.55g を水に溶解して 250mL とする。
- E. 酵素溶液  
本品 4mg を正しく秤量し、D 液に溶解して 200mL とする。
- F. 炭酸ナトリウム溶液  
炭酸ナトリウム 6g を水に溶解して 100mL とする。
- G. L-チロシン標準液  
L-チロシン 10mg を正確に秤量し、0.2mol/L 塩酸に溶解して 100mL とする (100  $\mu$ g チロシン/mL)。
- 1) G<sub>1</sub> 液  
この溶液 5mL をとり、水を加えて 50mL とする (10  $\mu$ g チロシン/mL)。
- 2) G<sub>2</sub> 液  
この溶液 15mL をとり、水を加えて 100mL とする (15  $\mu$ g チロシン/mL)。
- 3) G<sub>3</sub> 液  
この溶液 5mL をとり、水を加えて 25mL とする (20  $\mu$ g チロシン/mL)。
- 4) G<sub>4</sub> 液  
この溶液 5mL をとり、水を加えて 20mL とする (25  $\mu$ g チロシン/mL)。

#### 3. Procedure

##### 1) Test

Reagent	Test	Blank
C	5 mL	-
D	0.8 mL	0.8 mL
-	Keep at 37°C.	-
E	0.2 mL	0.2 mL
A	-	10 mL
-	Incubate at 37°C for 10 minutes.	Shake.

C	-	5 mL
A	10 mL	-
Incubate at 37°C for 30 minutes.		
Filtration.		
Filtrate	2 mL	2 mL
F	5 mL	5 mL
Phenol reagent(1+2)	1 mL	1 mL

Incubate at 37°C for 20 minutes.

Measure the absorbance at 660 nm with water as a reference using a 10 mm cell.

[Trans]\*

吸収セル 10mm を用い、波長 660nm における吸光度を水を対照液として測定する。

$E_1$  : Absorbance of test,  $E_0$  : Absorbance of blank

## 2) Calibration curve

Reagent	Blank	10 $\mu$ g Tyr/mL	15 $\mu$ g Tyr/mL	20 $\mu$ g Tyr/mL	25 $\mu$ g Tyr/mL
-	Water 2 mL	G <sub>1</sub> solution 2 mL	G <sub>2</sub> solution 2 mL	G <sub>3</sub> solution 2 mL	G <sub>4</sub> solution 2 mL
F	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Phenol reagent(1+2)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Incubate at 37°C for 20 minutes.

Measure the absorbance at 660 nm with water as a reference using a 10 mm cell, and prepare the calibration curve.

[Trans]\*

吸収セル 10mm を用い、波長 660nm における吸光度を水を対照液として測定し、検量線を作成する。

## 4. Unit Definition

One unit is defined as the enzyme amount that generates peptides equivalent to 1  $\mu$ mol tyrosine as the coloring substance reacted with a Folin reagent at 37°C for one minute under the above conditions.

[Trans]\*

単位の定義

前記条件下で、37°C、1分間にフォリン呈色物として1 $\mu$ molのチロシンに相当するペプチドを生成する酵素量を1unitとする。

(Calculation)

$$A = \frac{B}{189.19 \times 0.02 \times 0.2} \times 16 \times \frac{4}{S} \times \frac{1}{10}$$

A : Activity (units/mg)

B : Amount of tyrosine that was calculated with calibration curve and ( $E_1 - E_0$ ) ( $\mu$ g/mL)

S : Amount of sample (mg)

181.19 : Molecular weight of tyrosine

0.02 : Sample concentration of Enzyme solution (Reagent E) (mg/mL)

0.2 : Volume of Enzyme solution (Reagent E) (mL)

16 : Total volume of reaction solution (mL)

10 : Incubation time (minutes)

[Trans]\*

(計算)

$$A = \frac{B}{189.19 \times 0.02 \times 0.2} \times 16 \times \frac{4}{S} \times \frac{1}{10}$$

A : 活性 (units/mg)

B : ( $E_1 - E_0$ ) から検量線を用いて求めたチロシンの量 ( $\mu$ g/mL)

S : 量り取った本品の質量 (mg)

181.19 : チロシンの分子量

0.02 : 酵素溶液中の本品の濃度 (mg/mL)

0.2 : 酵素溶液の使用量 (mL)

16 : 反応溶液の総液量 (mL)

10 : 反応時間 (分)

## [Storage]

-20°C

## [Packages]

Code No.	Packaging
160-28911	25 mg
166-28913	100 mg
164-28914	500 mg
160-28916	1 g

\* : Trans is the Japanese translation.

## FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

Telephone : + 81-6-6203-3741

Facsimile : + 81-6-6201-5964

http://www.wako-chem.co.jp

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road

Richmond, VA 23237

U.S.A.

Telephone : + 1-804-271-7677

Facsimile : + 1-804-271-7791

http://www.wakousa.com

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggenstrasse 12

D-41468 Neuss

Germany

Telephone : + 49-2131-3111-0

Facsimile : + 49-2131-311100

http://www.wako-chemicals.de