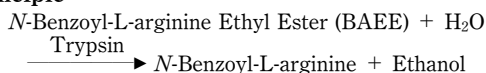


Code No. 202-15951 (20 μg $\times$ 5 vials)**Trypsin, from Porcine Pancreas,
Mass Spectrometry Grade****トリプシン, プタ腩臓由来,
質量分析グレード**

Source	: Porcine Pancreas
Appearance	: Lyophilized
Specific Activity	: Indicated on the label
Optimal pH	: pH 7.6

Assay method**1. Principle****2. Procedure**

- Set up dual beam spectrophotometer with temperature control as follows :
Cuvette Temperature : 30 °C
Wavelength : 253 nm
Kinetic program capable of measuring absorbance over 60 seconds.
- Resuspend Trypsin with 200 μL of Dilution Buffer (200-15952) (0.1 mg/mL).
Mix well by vortexing, and incubate at 30 °C for 15 minutes, then place on ice.
- Set up Activity Assays as follows :
 - Prepare a Blank Solution by adding 25 μL of Dilution Buffer (200-15952) to 3.15 mL of Reaction Buffer (see below).
 - Blank spectrophotometer by adding 1 mL of Blank Solution to a quartz cuvette, placing in cuvette sample holder, pressing Auto Zero, and monitoring A_{253} for 1 minute. If the ΔA_{253} of the Blank is $> \pm 0.005$, clean cuvette(s) and repeat.
 - Assay Resuspended Trypsin as follows :
25 μL of Resuspended Trypsin + 3.15 mL Reaction Buffer.
Mix by inverting several times.
Immediately place 1 mL into a quartz cuvette and monitor ΔA_{253} /minute over a period of 1 minute.

(Solutions)

Reaction Buffer : Make these two solutions first-
Buffer A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6 (25 °C), 1 mmol/L CaCl_2)
100 mmol/L BAEE (N-Benzoyl-L-arginine Ethyl Ester)-this should be prepared in Buffer A. For 10 mL, dissolve 342.8 mg BAEE in 9 mL of Buffer A. Mix well, then bring to 10 mL. This solution should be aliquoted into 200 μL samples and stored at -20 °C .
Just prior to use, add 150 μL of 100 mmol/L BAEE to 31 mL of Buffer A. Mix thoroughly.

Trans ***2. 測定方法**

- 分光光度計を次のように設定する :
キュベット温度 : 30 °C
波 長 : 253 nm
カイネティックプログラムは 60 秒以上測定できるものを準備する。
- トリプシン (208-15953) 1 本を 200 μL の Dilution Buffer (200-15952) で溶解し、終濃度を 0.1 mg/mL とする。ボルテックスミキサーで十分に混合した後、30 °C で 15 分間インキュベートし、氷冷する。
- 活性測定を次のように行う :
 - Dilution Buffer (200-15952) 25 μL を反応液 (下記参照) 3.15 mL に加え、空試験溶液とする。
 - 1 mL の空試験溶液を石英キュベットに入れ、キュベットホルダーにセットし、オートゼロを押して、253 nm の吸光度を 1 分間測定する。もし、空試験の ΔA_{253} /分が ± 0.005 以上であれば、キュベットを洗浄して再度測定する。
 - 再懸濁トリプシンの活性を次のように測定する :
25 μL の再懸濁トリプシンに 3.15 mL の反応液を加える。数回混合し、すぐに石英キュベットに 1 mL 入れ、253 nm の吸光度を 1 分間以上測定する。

(溶 液)

バッファ A : 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6 (25 °C),
1 mmol/L CaCl_2
100 mmol/L BAEE : 342.8 mg の BAEE を 9 mL のバッファ A に溶解し、よく混合して、バッファ A で全量を 10 mL とする。
反 応 液 : 使用前に 100 mmol/L BAEE 150 μL を Buffer A 31 mL に加え、良く混合する。

3. Unit definition

One unit is the amount of enzyme, which increases 0.001 of absorbance at 253 nm per minute at 30 °C in pH 7.6 with BAEE (N-Benzoyl-L-arginine Ethyl Ester) as substrate.

(Calculation)

Calculate Activity and Specific Activity as follows, and record the average value :

Activity :

$$\text{U/mL} = [(\Delta A_{253}/\text{min}) \times 1000] / \text{mLs Trypsin assayed}$$

Specific Activity :

$$\text{U/mg} = (\text{U/mL}) / (\text{mg/mL Protein})$$

Trans)*

3. 単位の定義

N-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル (BAEE) を基質として pH 7.6、30℃において1分間に253 nmにおける吸光度を0.001だけ増加させる酵素量を1 unit とする。

(計 算)

活 性 : unit/mL = $[(\Delta A_{253}/\text{min}) \times 1000] / \text{調製したトリプシン溶液の使用量 (mL)}$

比活性 : U/mg = 活性 (unit/mL) / たん白濃度 (mg/mL)

〔Protocols for In-Gel Digestion〕

Use a siliconized microcentrifuge tube and Pipette-Tip to prevent trapping any proteins. Use a gel staining kits for Mass Spectrometry, such as Wako's Silver Stain MS Kit (Code No. 299-58901) and Negative Gel Stain MS Kit (Code No. 293-57701).

1. Separate protein samples by electrophoresis.
2. Cut the protein bands from the gel and slice them into a microcentrifuge tube.
3. Destain the gel. (Use Destaining solution which is included in the gel staining kit for Mass Spectrometry)
4. Add 300 μ L Acetonitrile(ACN) to the tube. Shake the gel pieces for 30 minutes with a mixer(Dehydration).
5. Remove the ACN and cover the microcentrifuge tube with Parafilm.
6. Make some hole on the parafilm and vacuum dry for 15 minutes.
7. Reduce the proteins of the gel pieces with 100 μ L of 10 mmol/L Dithiothreitol (DTT) in 100 mmol/L Ammonium Bicarbonate and incubate for 1 hour at 56℃.
8. After cooling to room temperature, replace the DTT solution with the same volume of 50 mmol/L Iodoacetamide in 100 mmol/L Ammonium Bicarbonate and incubate the gel pieces for 45 minutes in the dark with occasional vortexing.
9. Wash the gel pieces for 10 minutes with 100 μ L of 100 mmol/L Ammonium Bicarbonate.
10. Dehydrate the gel pieces for 15 minutes with 300 μ L ACN.
11. Swell the gel pieces for 15 minutes with 100 μ L of 100 mmol/L Ammonium Bicarbonate.
12. Dehydrate again the gel pieces for 15 minutes with 300 μ L ACN.
13. Remove the liquid phase, and vacuum dry the gel pieces for 15 minutes.

14. Swell the gel pieces for 45 minutes with 100 μ L Trypsin solution* in an ice-cold bath.

※ Stock Solution : Dissolve a bottle of Trypsin in 200 μ L Dilution Buffer (200-15952).

※ Reaction Solution : Dilute 10 μ L Stock Solution in 50 mmol/L Tris-HCl, pH8.5 to 10 μ g/mL.

15. Remove the Trypsin solution, and incubate the gel pieces overnight at 37℃ with 10 μ L of 50 mmol/L Tris-HCl, pH8.5.
16. Shake the gel pieces for 20 minutes with 50 μ L of 20 mmol/L Ammonium Bicarbonate and extract the peptides.
17. Shake the gel pieces three times for 20 minutes with 5% Formic acid in 50% ACN and extract the peptides.
18. If necessary, concentrate the peptides with Speed Vac.
19. Desalt and purify the peptides with ZipTip®.
20. If necessary, concentrate the peptides to 2 μ L with weak vacuum.
21. Add the matrix and analyze it by mass spectroscopy.

Trans)*

〔ゲル内消化プロトコール〕

微量遠心チューブやピペットは、シリコン化など低吸着処理したものを使用する。染色は、銀染色 MS キット (和光コード No. 299-58901) やネガティブゲル染色 MS キット (和光コード No. 293-57701) 等の質量分析用の試薬を使用する。

1. タンパク質サンプルを電気泳動により分離する。
2. ゲルからタンパク質バンドを切り出し、数片に刻んで微量遠心チューブに入れる。
3. ゲル片を脱色する。(脱色は、質量分析用の染色キットに含まれる脱色液を使用する。)
4. アセトニトリル 300 μ L を加えて 30 分間ミキサーで振盪し、脱水する。
5. アセトニトリルを捨てて微量遠心チューブの口をパラフィルムで覆う。
6. パラフィルムに針で穴を開けたのち、15 分間真空乾燥する。
7. 100 μ L の 10 mmol/L DTT を含む 100 mmol/L 重炭酸アンモニウムで 56℃、1 時間還元する。
8. 室温に冷やした後に DTT 溶液を捨てて、同量の 50 mmol/L ヨードアセトアミドを含む 100 mmol/L 重炭酸アンモニウムに置き換え、45 分間暗所で時々振盪する。
9. ゲル片を 100 μ L の 100 mmol/L 重炭酸アンモニウムで 10 分間振盪して洗浄する。
10. アセトニトリル 300 μ L で 15 分間振盪して、脱水する。
11. 100 μ L の 100 mmol/L 重炭酸アンモニウムで 15 分間振盪して、膨潤させる。
12. 再びアセトニトリル 300 μ L で 15 分振盪して、脱水する。
13. 液を捨てて、15 分間真空乾燥する。

14. 氷上で、酵素溶液※ 100 μL を加え、45 分間静置し、膨潤する。
 ※ 保存溶液：本品 1 本を 200 μL の Dilution Buffer (200-15952) で溶解する。
 ※ 酵素溶液：保存溶液 10 μL を 90 μL の 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 で希釈し、終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ に調製する。
15. 酵素溶液を除き 10 μL の 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 (酵素なし) を加えて、37℃ 終夜インキュベートする。
16. 20 mmol/L 重炭酸アンモニウム 50 μL を加え、20 分間振盪し、溶液を回収する。
17. 5% ギ酸/50% アセトニトリル 50 μL を加え、20 分間振盪し、溶液を回収する（3 回繰り返す）。
18. 必要に応じて Speed-Vac などにより濃縮する。
19. Zip-Tip® などで脱塩する。
20. 必要であれば、弱い陰圧で 2 μL 程度まで濃縮する。
21. マトリックスと混和して質量分析する。

〔Storage〕 Store at -20°C in the dark.

〔Package〕

208-15953	Trypsin, Mass Spectrometry Grade	20 μg	5 vials
200-15952	Dilution Buffer	1 mL	1 vial

〔References〕

- 1) Wada, Y., and Kadoya, M. : *J. Mass Spectrom.*, **38**, 117 (2003)
- 2) Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. : *Anal. Chem.*, **68**, 850 (1996)
- 3) Masaki, T., Nakamura, K., Isono, M. and Soejima, M. : *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 1443 (1978).
- 4) Morihara, K., Oka, T., Tsuzuki, H., Tochino, Y. and Kanaya, T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 396 (1980).
- 5) Schwert, G. W. Takenaka, Y. : *Bioche. Biophys. Acta*, **16**, 570 (1955).
- 6) Tuppy, H., Wissbauer, U. and Wintersberger, E. : *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **329**, 278 (1962).
- 7) Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K. and Soejima, M. : *Biochem. Biophys. Acta*, **660**, 44 (1981).
- 8) Masaki, T., Fujihashi, T., Nakamura, K. and Soejima, M. : *Biochem. Biophys. Acta*, **660**, 51 (1981).

* **Trans** is the Japanese translation.

ZipTip® is registered trademark of Millipore.

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://fwvk.fujifilm.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

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-3111-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>