



产品使用说明书

Rhinogen[®] Quick[™] Trypsin (Sequencing Grade)

货号：QIP-012



目 录

目 录	1
产品信息	2
试剂包装	2
产品来源	2
产品质量	2
产品特性	2
保藏条件	2
产品综述	3
背景	3
概述	3
应用	3
特性	3
操作方法	4
试剂准备	4
常规操作方法	4
还原条件操作方法	4
制备兼容 LC 和 LC/MS 的样品	4
操作说明	4
常见问题	5
相关产品	6
联系我们	7
参考文献	7

产品信息

试剂包装 Rhinogen® Quick™ Trypsin (Sequencing Grade) 包装规格如下:

目录号	规格
QIP-012-A	20µg

Rhinogen® Quick™ Trypsin (Sequencing Grade) 配套提供的试剂如下:

试剂	目录号	规格
Quick™ 反应增强剂	EB17-D	3×1vials

Quick™ Trypsin 酶及 Quick™ 反应增强剂以冻干粉形式提供。

注: 适配 Rhinogen® Quick™ Trypsin (Sequencing Grade) 的 Quick™ 反应增强剂可单独购买, 货号: EB17。

产品来源 Rhinogen® Quick™ Trypsin (Sequencing Grade) 是利用重组大肠杆菌系统表达生; 产并经过多步层析纯化得到的重组胰蛋白酶, 其氨基酸序列与猪源胰蛋白酶序列同源, 分子量大小约为25kDa。

产品质量 SDS-PAGE分析, 纯度≥95%; 没有检测到污染的蛋白酶活性。

产品特性 最适pH为7.0~8.0。

保藏条件 采用冰袋运输。收到产品后请立即置于-20°C, 密封防潮。酶溶解后, -70°C存放; 若溶解后存于2-8°C, 需在24hr内使用完毕; Quick™ 反应增强剂冻干粉溶解后, -70°C可储存一个月, 2-8°C可储存一周。酶液及Quick™ 反应增强剂溶解后避免室温下长时间放置, 可进行分装, 避免反复冻融。

产品综述

背景

胰蛋白酶（Trypsin）属于丝氨酸蛋白酶家族，能特异性切割多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基。胰蛋白酶原由胰腺分泌，受肠激酶或胰蛋白酶的有限分解成为活化胰蛋白酶，是肽链内切酶。它不仅起消化酶的作用，而且还能限制分解糜蛋白酶原、羧肽酶原、磷脂酶原等其它酶的前体，起活化作用，是特异性最强的蛋白酶。

概述

Rhinogen® Quick™ Trypsin（Sequencing Grade）是利用重组大肠杆菌系统重组表达并经过多步层析纯化得到重组胰蛋白酶。该酶经过甲基化修饰及突变，保证不自切，从而去除了因自切而产生的假糜蛋白酶活性。酶的纯度≥95%，无糜蛋白酶等杂蛋白酶污染，不需要 TPCK 抑制其他酶的活性。氨基酸序列与猪源胰蛋白酶同源，分子量大小约为 25kD，能特异性切割多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基。

应用

- ✓ 在数分钟内完成抗体或蛋白的完全快速消化；
- ✓ 肽谱图、肽指纹谱或蛋白序列分析；
- ✓ 蛋白质组学研究；
- ✓ 增加蛋白质序列覆盖率；
- ✓ 改善溶液内酶解方案。

特性

Rhinogen® Quick™ Trypsin（Sequencing Grade）是一种高度纯化和非常稳定的重组蛋白酶，具有稳定性高、比活性高等特点。适用于蛋白质组学研究中肽谱图、肽指纹谱或蛋白序列分析。

- ✓ **高纯度：** SDS-PAGE 分析，纯度≥95%；
- ✓ **高一致性：** 每批产品都经过严格的质量控制，以实现产品批间稳定性；
- ✓ **无动物源性：** 重组生产，无外源性的病毒污染，生产过程不使用任何动物源原料；
- ✓ **超高效率：** 可显著缩短蛋白质酶解时间，在同一天内完成所有酶解工作，兼容液相色谱（LC）和 MS 分析。

操作方法

试剂准备

1. 为了最佳的传热，请使用 0.2ml 薄壁微管或者 1.5ml 离心管。
2. 使用前，请将 Quick™ Trypsin (Sequencing Grade) 冻干粉及 Quick™ 反应增强剂冻干粉 10000rpm 离心 10 秒，确保所有试剂都在管底部。
3. 使用 40μl 50mM HAc 或 1mM HCl 溶解干粉，得到浓度为 0.5mg/ml 的胰蛋白酶溶液，推荐置于冰上保存。
4. 取 1 支 Quick™ 反应增强剂冻干粉，加入 40μl 反应缓冲液，复溶成 5×Quick™ 工作试剂，将液体瞬离至管底备用。

注：反应缓冲液推荐 50mM NH₄HCO₃ 或者 pH7.0-8.0 的缓冲溶液。

常规操作方法

1. 取 20-100μg 蛋白底物，使用反应缓冲液重悬或稀释至总体积为 14μl；
2. 加入 4μl 5×Quick™ 工作试剂混匀；
3. 60°C 条件下预热 10~30min，冷却至室温；
4. 加入 2μl 0.5mg/ml 的 Quick™ Trypsin (Sequencing Grade)，轻柔混匀；
5. 37°C 水浴条件下反应 10~60min。

还原条件操作方法

1. 取 20-100μg 蛋白底物，使用反应缓冲液重悬或稀释至总体积为 10μl；
2. 加入 4μl 5×Quick™ 工作试剂混匀；
3. 加入 1μl 0.1M DTT；
4. 60°C 条件下孵育 10~30min，冷却至室温；
5. 加入 3μl 0.1M 碘乙酰胺，黑暗中烷基化 30min。
6. 加入 2μl 0.5mg/ml 的 Quick™ Trypsin (Sequencing Grade)，轻柔混匀；
7. 37°C 水浴条件下反应 10~60min。

制备兼容 LC 和 LC/MS 的样品

1. 在消化后的蛋白质样品中加入甲酸、TFA 或 HCl，甲酸和 TFA 终浓度应该是 0.5%，HCl 的终浓度为 30~50mM，pH ≤ 2 有助于 Quick™ 反应增强剂快速水解。
2. 37°C 孵育样品 30-45min，可能观察到轻微的浑浊。
3. 将酸处理过的样品以 13000 rpm 离心 10 分钟。水解的 Quick™ 反应增强剂副产物不与水混溶，因此可观察到一些沉淀。
4. 小心地转移溶液，可适当进行稀释。
5. 通过 LC-MS 或 MALDI-MS 分析水相。

操作说明

- ✓ 胰蛋白酶的使用量为胰蛋白酶：目的蛋白=1:20~1:100 (w/w)，最适 pH 为 7.0~8.0；
- ✓ 反应体积可以按比例放大或缩小；
- ✓ 在酶切反应体系中添加 1mM CaCl₂，可以提高胰蛋白酶的活性；
- ✓ 反应结束后，取少部分反应体系进行 SDS-PAGE 或者 RP-HPLC 检测，确认酶切效果。剩余反应体系置于冰浴或者冻存。若酶切不完全，则取出反应体系，置于 37°C 继续进行反应；
- ✓ 对于不同的蛋白样品，需要实验摸索最适的酶浓度及反应时间。可用 50mM NH₄HCO₃ 或者 pH7.0-8.0 的缓冲溶液进行酶液稀释；
- ✓ 本产品仅供研究使用，不适用于人或动物的诊断及治疗用途。

常见问题

**是否可以调整样品
预处理温度？**

加入 Quick™ 工作试剂后高温孵育后有利于底物的舒展，从而暴露更多的切割位点。针对疏水蛋白，您可以提高孵育温度至 90°C 或接近 100°C，但要关注高温孵育是否会有沉淀产生。当您的底物孵育时发生沉淀，你可以选择适当降低孵育温度，当然提高反应增强剂的浓度也可以有效缓解蛋白沉淀问题。

**复杂蛋白按照说明书
操作不能有效快速
消化时要如何操作？**

我们说明书中推荐的快切试剂浓度适用于大多数蛋白的快速消化。对于按照上述操作仍不能有效完全快切的复杂蛋白（如膜蛋白等疏水性蛋白），可尝试参照下表提高快切试剂浓度。

加入反应缓冲液体积	Quick™ 反应增强剂 复溶浓度	反应体系 Quick™ 反应增强剂终浓度
40µl	5×	1×
20µl	10×	2×
8µl	25×	5×
4µl	50×	10×

同时，也可以尝试提高预处理温度、降低底物浓度、提高酶用量及延长反应时间等。

**水解 Quick™ 反应增
强剂后检测的肽段
覆盖率偏低是什么
情况？**

当使用胰蛋白酶消化膜蛋白等疏水蛋白时，高度疏水的肽或蛋白质可能会与 Quick™ 反应增强剂降解产物共同沉淀，导致水溶液层含有的肽段覆盖率偏低。如果您认为这是个问题，可减少 Quick™ 反应增强剂的使用量（如 0.5× 或 0.25×），并避免酸化。较低浓度的 Quick™ 反应增强剂不会干扰 LC/MS 和 MALDI-MS 分析。

同时，你可以尝试使用含异丙醇的水溶液来溶解沉淀物，提取出疏水肽段并进行 LC/MS 分析。

相关产品

产品名称	货号
IdeS protease	QIP-001
Chymotrypsin (Sequencing Grade)	QIP-002
Trypsin (Sequencing Grade)	QIP-003
Endoproteinase Lys-C	QIP-004
Glu-C (Sequencing Grade)	QIP-005
Carboxypeptidase B	QIP-006
IgdE protease	QIP-007
<i>O</i> -Glycoprotease	QIP-008
FabCOUPER protease	QIP-009
GlyCOUPER protease	QIP-010
<i>O</i> -GlyCORPAR protease	QIP-013
Immobilized IdeS, Microspin	QIP-101
Immobilized IdeS Cut-Pure Kit, Microspin	QIP-102
Quick™ 反应增强剂	EB17

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话：[0512-87663137](tel:0512-87663137)
- 技术支持：techserv@rhinobio.com

参考文献

-
- [1] Rice R.H. et al. Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation[J]. Biochem. Biophys. 1977, Acta 492: 316–21.
- [2] Flannery, A.V., Beynon, R.J. and Bond, J.S. “Proteolysis of Proteins for Sequencing Analysis and Peptide Mapping”. In: Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. R.J. Beynon and J.S. Bond, eds., IRL Press, Oxford, U.K. 1989.
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址: www.rhinobio.com
电 话: 0512-87663137
邮 箱: techserv@rhinobio.com



公众号



联系客服

