

Wako

Lysyl Endopeptidase[®], Mass Spectrometry Grade

リシルエンドペプチダーゼ[®], 質量分析グレード

Lysyl Endopeptidase, originally isolated from the soil bacterium by Masaki *et al.*, cleaves specifically the peptides on the carboxy-terminal side of Lysine residues. This enzyme is very useful both in protein sequence analysis and in enzymatic synthesis of Lys-X compounds.

Source	: Bacteria (See Notice.)
Appearance	: Lyophilized form containing 2 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 8.0
Activity	: Indicated on the label
Molecular Weight	: 27,000 (Gel filtration), 30,000 (SDS-PAGE)
Solubility	: Soluble in water or buffer solutions.
Stability	: Stable at 4°C for at least 24 hours, when dissolved in Tris buffer at pH 4 - 11 ⁵⁾ . Stable at 30°C in the range of pH 6 - 11, but unstable over 50°C.
Optimal pH	: 9.0 ~ 9.5 (Amidase activity)
Isoelectric point	: 6.9 ~ 7.0

Substrate specificity :

Hydrolysable substrate ···· Tos-Lys-OMe, Bz-Lys-NH₂,
Bz-Lys-pNA, Lys-pNA
Unhydrolysable substrate ···· Bz-Arg-NH₂, Bz-Arg-
pNA, Arg-pNA

Inhibitors : DFP, PMSF, TLCK

Assay method**1. Reagents**

- A. 0.2 mol/L AMP buffer, pH 9.5
Dissolve 4.2 g of 2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol in 150 mL of water, adjust to pH 9.5 with 1 mol/L HCl, and then add water to bring the volume up to 200 mL.
- B. 2.5 mmol/L Substrate solution
Dissolve 22.6 mg of *N*^α-Benzoyl-DL-lysine-*p*-nitroanilide Hydrobromide in 20 mL of water.

- C. 2 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 8.0
Dissolve 0.24 g of 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol in 900 mL of water, adjust to pH 8.0 with 0.1 mol/L HCl, and then add water to bring the volume up to 1 L.
- D. Enzyme solution
Dissolve 1 vial of Lysyl Endopeptidase in 1 mL of Reagent C added directly into the vial.
- E. Stop Solution
Mix 55 mL of water and 45 mL of Acetic acid

Trans *

1. 試薬

- A. 0.2 mol/L AMP 緩衝液、pH 9.5
2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール 4.2 g を水 150 mL で溶解させた後、1 mol/L 塩酸で pH 9.5 に調整し、水を加え 200 mL にする。
- B. 2.5 mmol/L 基質溶液
N^α-ベンゾイル-DL-リシン-*p*-ニトロアニリド臭化水素酸塩 22.6 mg を水 20 mL に溶解させる。
- C. 2 mmol/L Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0
2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 0.24 g を水 900 mL に溶解させた後、0.1 mol/L 塩酸で pH 8.0 に調整し、水を加え 1 L にする。
- D. 酵素溶液
本品 1 vial に全量ピペットを用いて C 液 1 mL を加え溶解させる。
- E. 反応停止液
水 55 mL と酢酸 45 mL を混ぜる。

2. Procedure

Reagent	Test	Blank
A	2.6 mL	2.6 mL
B	0.3 mL	0.3 mL
Pre-incubate at 30°C for 5 minutes.		
D	0.1 mL	—
C	—	0.1 mL
Immediately mix, and incubate 30°C for exactly 25 minutes		
E	1.0 mL	1.0 mL
Immediately, measure the absorbance at 405 nm of wavelength with water as the control.		
Trans *		
直ちに、波長 405 nm における吸光度を水を対照液として測定する。		

3. Unit definition

One amidase unit (AU) is the amount of enzyme, which will produce 1 μ mol of *p*-nitroaniline per minute at 30°C, pH 9.5.

(Calculation)

$$\text{AU/vial} = \frac{a-b}{25} \times \frac{1}{9.62} \times \frac{4.0}{0.1}$$

a : Absorbance in test

b : Absorbance in blank

Trans *

3. 単位の定義

pH 9.5、30°Cで1分間に1 μ molの*p*-ニトロアニリンを生成する酵素量を1AUとする。

(計算)

$$\text{AU/vial} = \frac{a-b}{25} \times \frac{1}{9.62} \times \frac{4.0}{0.1}$$

a : 本試験の吸光度

b : 空試験の吸光度

[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°C.
8. After cooling to room temperature, replace the DTT solution with the same volume of 50 mM 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 Lysyl Endopeptidase solution* in an ice-cold bath.
※ Dilute the Lysyl Endopeptidase in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 to 10 μ g/mL.
15. Remove the Lysyl Endopeptidase solution, and incubate the gel pieces overnight at 37°C with 10 μ L of 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5.
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ビペットは、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°C、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 分間振盪して、脱水する。
13. 液を捨てて、15 分間真空乾燥する。
14. 水上で、酵素液* 100 μ L を加え、45 分間静置し、膨潤する。
※ リシルエンドペプチダーゼは、終濃度が 10 μ g/mL となるように 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 で溶解する。
15. 酵素液を除き 10 μ L の 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 (酵素なし) を加えて、37°C 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 μ L 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 μ L 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[®] など脱塩する。
20. 必要であれば、弱い陰圧で 2 μ L 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。

Notice

The source of this product had been indicated as “*Achromobacter lyticus*”, based on the physiological and morphological properties of the bacteria. However, by recent bacterial taxonomy, the bacteria were identified as *Lysobacter enzymogenes*.

Trans*

当製品について、菌発見当時の生理的・形態学的性質の知見から、由来は *Achromobacter lyticus* と表示させていただいておりましたが、近年の細菌分類学に基づいた再同定の結果、由来は *Lysobacter enzymogenes* であると結論いたしました。

[Storage] Store at -20°C in the dark.

[Package] 20 μ g \times 5 vials

[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.

Lysyl Endopeptidase[®] is registered trademark of Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

ZipTip[®] is registered trademark of Millipore.

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

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>

Wako Chemicals USA, Inc.

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

Wako Chemicals GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>