

中文说明书

Arg-C Ultra, Mass Spec Grade

适用产品目录号：
VA1831, VA1832



Arg-C Ultra, Mass Spec Grade

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。
如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱：chinatechserv@promega.com

1. 产品描述	2
2. 产品组分与储存条件	3
3. 重要注意事项	4
4. 样品准备	5
4.A. 还原和烷基化标准流程	5
4.B. 准备 L- 半胱氨酸	5
5. 消化流程	6
5.A. 消化条件	6
5.B. 消化复杂蛋白质混合物	6
5.C. 消化难处理的蛋白质	7
6. 组合使用质谱级的 Arg-C Ultra 和 Lys-C 的消化	7
6.A. 顺序消化	7
6.B. 同时消化	8
7. 疑难排查	8
8. 参考文献	9
9. 相关产品	9

1. 产品描述

质谱级的 Arg-C Ultra 是一种内肽酶，优先在精氨酸残基的 C 端（羧基端）一侧切割蛋白质。该酶是一种带有 His 标签的半胱氨酸蛋白酶，从牙龈卟啉单胞菌中分离并纯化得到，也被称为牙龈蛋白酶 R2 或 RgpB。它在还原条件下消化蛋白质，产生高度适合通过质谱进行鉴定和表征的肽段。

与“传统”的 Arg-C（也称为 clostripain）不同，质谱级的 Arg-C Ultra 对仅在精氨酸残基后切割具有高度选择性，而传统的 Arg-C 不仅在精氨酸残基处广泛切割，还在赖氨酸残基处切割（图 1）。

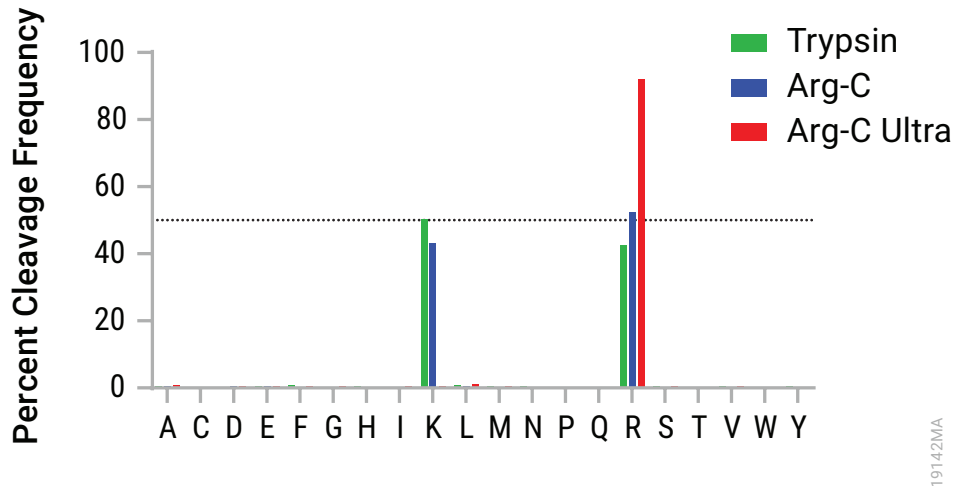


图 1. 各种在精氨酸后切割的蛋白酶的 C 端切割特异性。人 K562 提取物使用指示的蛋白酶以 1:50 的酶 : 底物比例在 37°C 下过夜消化。肽段使用 Orbitrap Exploris™ 240 (Thermo Fisher Scientific) 进行 LC-MS/MS 分析。数据分析使用 Bionic 软件 (Protein Metrics) 进行，未指定酶。

除了显著的消化特异性外，质谱级的 Arg-C Ultra 还是一种极其高效的酶，在优化条件下几乎可以实现 100% 的消化效率（例如，接近零漏切）。在消化效率方面，质谱级的 Arg-C Ultra 优于胰蛋白酶消化，并且比 Lys-C 酶高效近 100 倍，这由 K562 与质谱级的 Arg-C Ultra 在 2 小时内 1:500 的消化相比 Lys-C 在 20 小时内 1:50 的消化中产生更少的漏切现象所表明。质谱级的 Arg-C Ultra 在保持最小消化特异性损失的情况下实现了这种效率（图 2）。

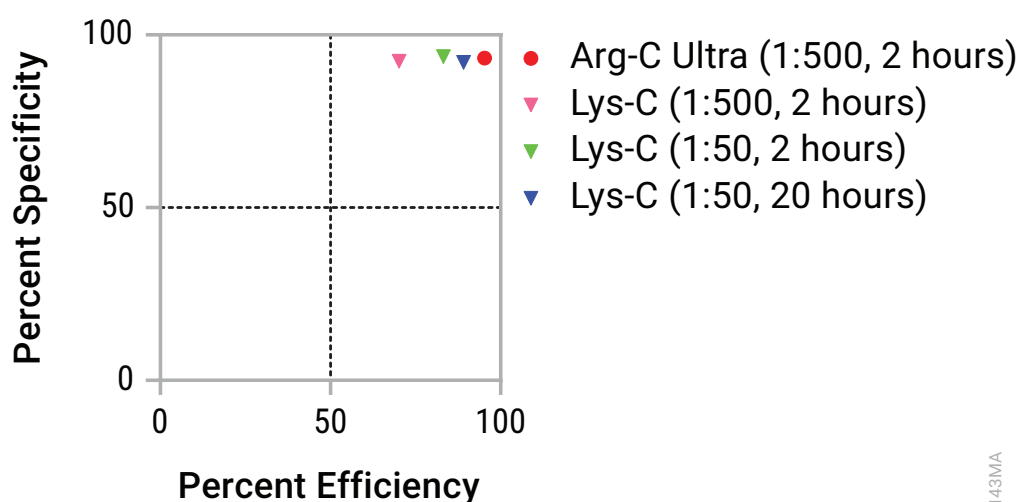


图 2. 质谱级的 Arg-C Ultra 快速且高效。特异性 - 效率图，其中特异性表示在优选氨基酸处（对于质谱级的 Arg-C Ultra 为精氨酸；对于 Lys-C 为赖氨酸）的切割百分比，效率是漏切百分比的倒数。人 K562 提取物在指示条件下用 Arg-C Ultra 或 Lys-C 进行消化。肽段使用 Orbitrap Exploris™ 240 (Thermo Fisher Scientific) 进行 LC-MS/MS 分析。数据分析使用 Byonic 软件 (Protein Metrics) 进行，未指定酶。

2. 产品组成与储存条件

产品	规格	目录号
Arg-C Ultra, Mass Spec Grade	5µg	VA1831
	20µg	VA1832

储存条件：收到后，请将冷冻的质谱级的 Arg-C Ultra 存放在 -30°C 至 -10°C 。首次使用前，请用手快速解冻质谱级的 Arg-C Ultra 溶液，并置于冰上或 $+2^{\circ}\text{C}$ 至 $+10^{\circ}\text{C}$ 。首次解冻后，质谱级的 Arg-C Ultra 可在 $+2^{\circ}\text{C}$ 至 $+10^{\circ}\text{C}$ 下储存 3 个月。长期储存时，请存放在 -20°C 或以下。经过五次冻融循环后，未检测到活性损失。

浓度：质谱级的 Arg-C Ultra 的提供浓度为 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

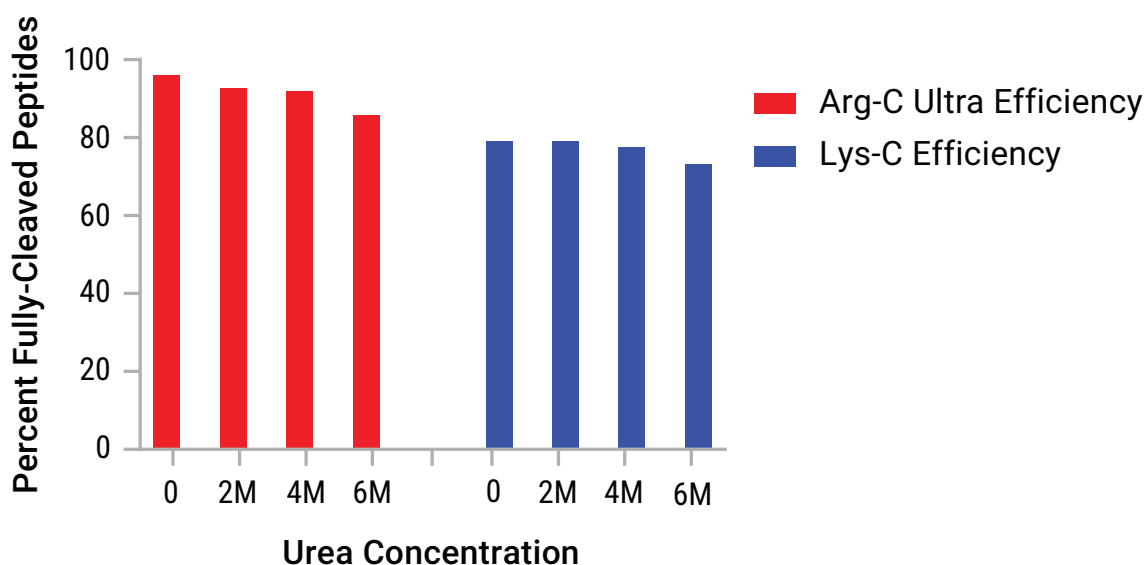
3. 重要注意事项

! 质谱级的 Arg-C Ultra 是一种半胱氨酸蛋白酶，因此在消化过程中需要存在还原剂。以下还原剂已被证明与质谱级的 Arg-C Ultra 兼容：

- L-半胱氨酸：2–10mM（我们推荐最终浓度为 10mM。）
- DTT 或 TCEP：≥10mM（我们推荐最终浓度至少为 10mM。）

此外，质谱级的 Arg-C Ultra：

- 能耐受至少 6M 尿素
- 由于胍与精氨酸侧链的结构相似性，低浓度的盐酸胍会抑制其活性。避免使用盐酸胍。
- 会被半胱氨酸烷基化试剂（如碘乙酰胺）抑制。在消化前应小心中和此类试剂。或者，可以在消化后对半胱氨酸进行烷基化。
- 经测试，在 pH 值 5.5–9 的范围内显示出优异的活性。建议从 pH 8.0 开始，并根据需要进行优化。



19144MA

图 3. 尿素浓度对质谱级的 Arg-C Ultra 和 Lys-C 消化效率的影响。人 K562 提取物在 37°C 下使用 1:100 的比例，分别与质谱级的 Arg-C Ultra 或 Lys-C 在不同尿素浓度下消化 2 小时。肽段使用 Orbitrap Exploris™ 240 (Thermo Fisher Scientific) 进行 LC-MS/MS 分析。数据分析使用 Byonic 软件 (Protein Metrics) 进行，未指定酶。

4. 样品准备

用户需提供的材料

- NANOpure® 水或等效物
- 还原剂（例如，L-半胱氨酸，DTT，TCEP）
- 变性剂（例如，尿素）
- 消化缓冲液（例如，Tris，碳酸氢铵等）
- 烷基化剂（例如，碘乙酰胺）

4.A. 还原和烷基化的标准流程

此操作流程示例使用了适用于质谱的完整人类蛋白质提取物（K562 细胞提取物；目录号 V6941），其尿素浓度约为 6.5M。

1. 解冻一管完整人类蛋白质提取物（目录号 V6941；100 μ l，浓度为 10 μ g/ μ l）。
2. 加入 1 μ l 的 0.5M DTT（最终浓度 5mM）进行还原。
3. 在 37°C 下孵育 30 分钟。
4. 加入 1.5 μ l 的 1M 碘乙酰胺（最终浓度 15mM）进行烷基化。
5. 在暗处室温下孵育 30–60 分钟。

注意事项：

- a. 经过还原和烷基化的样品已准备好进行消化（第 5 节），或可储存在 -70°C 直至准备消化。
- b. 在添加质谱级的 Arg-C Ultra 之前，确保样品已用过量的还原剂中和，以防止酶活性位点的半胱氨酸被烷基化。这可以通过在消化步骤中确保还原剂存在于酶反应中来完成。重要的是要考虑到，DTT 和 L-半胱氨酸都可以用来中和烷基化试剂，但 TCEP 不可以。

4.B. 准备 L-半胱氨酸

注意：如在消化过程中使用 L-半胱氨酸作为还原剂，需采取预防措施确保 pH 值调整得当。

1. 在水中制备 1M L-半胱氨酸储备液。将 90 μ l 的份量储存在 -20°C 或更低温度。
2. 向 90 μ l 的 1M L-半胱氨酸中加入 10 μ l 的 5M NaOH 以中和 pH 值。
3. 加入 800 μ l 的水制成 100mM L-半胱氨酸的工作液。配制后立即使用此溶液，并丢弃未使用的部分。

5. 消化流程

5.A. 消化条件

- 酶与底物 (E:S) 比例: 1:10 至 1:500
- 消化时间: 30 分钟至 2 小时
- 缓冲液 pH 值: 5.5–9.0
- 缓冲液: 醋酸钠、柠檬酸钠、醋酸铵、Tris-HCl、Bis-Tris、碳酸氢铵
- 变性剂浓度: 在 6M 尿素中表现出极佳活性。避免使用盐酸胍。

5.B. 消化复杂蛋白质混合物

以下实验方案仅供参考。必须针对所使用的底物和期望的实验结果进行优化和调整。

在这个示例方案中,我们在最终体积为 100 μ l 的条件下,使用 0.5 μ g 的酶 (1:100) 在 37 $^{\circ}$ C (pH 7.5) 下消化了 50 μ g 的 K562 提取物。这种 20 倍的样本稀释导致消化过程中的最终蛋白质浓度为 0.5 μ g/ μ l, 最终尿素浓度约为 0.3M。您可能希望避免稀释样本。

1. 向试管中加入 5 μ l (50 μ g) 已经还原 / 烷基化的 K562 提取物 (在第 4.A 节中制备)。
 2. 加入 10 μ l 10X 还原剂储备液 (例如, 10 μ l 的 100mM DTT)。
 3. 加入 10 μ l 10X 消化缓冲液 (例如, 10 μ l 的 0.2–0.5M Tris HCl, pH 7.5)。
 4. 加入 72.5 μ l NANOpure[®] 水或等效物。
 5. 加入 2.5 μ l 质谱级的 Arg-C Ultra (0.5 μ g)。
- 注: 在加入还原剂之后再加酶, 以减少当使用了烷基化剂时酶的活性位点发生烷基化的可能性。
6. 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1–2 小时。
 7. 使用 TFA 或甲酸将混合物酸化至 pH 2 以终止消化反应。

5.C. 消化难处理的蛋白质

难处理的蛋白质，如抗体，通常使用盐酸胍进行变性；然而，由于质谱级的 Arg-C Ultra 受到盐酸胍的抑制，我们建议使用替代变性剂。可以使用高浓度的尿素，但应注意避免加热和 / 或使用 Tris 缓冲液，以尽量减少可能的氨基甲酰化。

另外，可以采用 SP3[®] 或 PAC (2,3) 等方法来实现珠子 (beads) 上变性。这些方法与质谱级的 Arg-C Ultra 的蛋白酶解相容。

6. 组合使用质谱级的 Arg-C Ultra 和 Lys-C 的消化

质谱级的 Arg-C Ultra 可以与 Lys-C 组合使用来产生“胰蛋白酶”肽段。鉴于 Lys-C 和特别是质谱级的 Arg-C Ultra 相比胰蛋白酶具有更高的活性，使用质谱级的 Arg-C Ultra 和 Lys-C 的消化效率可以优于单独使用胰蛋白酶或胰蛋白酶 / Lys-C 的消化。

6.A. 顺序消化

1. 在还原条件下使用质谱级的 Arg-C Ultra 消化感兴趣的样品。

通过调整 E:S 比例和消化时间来优化 Arg-C Ultra, Mass Spec Grade 的消化，以实现所需的效率和特异性。我们建议从 1:50–1:200 的 E:S 比例和 1–2 小时的消化时间开始。

2. 通过添加烷基化剂（例如，碘乙酰胺或氯乙酰胺）来终止质谱级的 Arg-C Ultra 的消化。这种方法通过靶向其活性位点半胱氨酸有效地使酶失活，我们推荐用于获得最佳结果。

或者，通过添加 250mM 盐酸胍来终止消化，保持最终的盐酸胍浓度低于 1M，以防止在步骤 3 中抑制 Lys-C 酶。

3. 添加天然 Lys-C 或重组 Lys-C 以完成顺序消化。通过改变 E:S 比例和消化时间来优化消化条件。我们建议使用 1:10–1:50 的 E:S 比例和 2–18 小时的消化时间。
4. 用 TFA 或甲酸将消化反应酸化至 pH 2 以抑制 Lys-C 活性，并为 LC-MS 分析准备样品。

注：如果您在步骤 2 中使用盐酸胍终止了质谱级的 Arg-C Ultra 酶的消化，那么在进行 LC-MS 之前应对样品进行烷基化。

6.B. 同时消化

同时消化时应避免使用高于约 0.5M 的尿素浓度，因为高浓度的尿素可能导致两种蛋白酶相互消化，从而降低消化效率。下面的操作流程示例使用了适用于质谱的完整人类蛋白质提取物（K562 细胞提取物，目录号 V6941），其初始尿素浓度约为 6.5M，在消化过程中稀释至大约 0.3M。

1. 向试管中加入 5 μ l (50 μ g) 已经还原 / 烷基化的 K562 提取物（在第 4.A 节中制备）。
2. 加入 10 μ l 10X 还原剂储备液（例如，10 μ l 100mM L- 半胱氨酸）。
3. 加入 10 μ l 10X 消化缓冲液（例如，10 μ l 0.2–0.5M Tris HCl, pH 8.0）。
4. 加入 72.5 μ l NANOpure[®] 水或等效物。
5. 加入 2.5 μ l 质谱级的 Arg-C Ultra (0.5 μ g)。

注：在加入还原剂之后再加酶，以减少当使用了烷基化试剂时酶活性位点发生烷基化的可能性。

6. 加入大约 1.0 μ g 的天然 Lys-C（例如，目录号 VA1170 或等效物）。
7. 在 37°C 下孵育 1–2 小时。
8. 使用 TFA 或甲酸将混合物酸化至 pH 2 以终止消化反应，使样品准备好进行 LC-MS 分析。

7. 疑难排查

如果您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。

联系方式可于以下网址获取：www.promega.com.cn。电子邮件：chinatechserv@promega.com。

问题	原因和参考建议
消化效率低	确保消化过程中已加入还原剂（以确保酶活性位点半胱氨酸的激活）。
	确保过量的烷基化试剂已被去除或中和（以避免酶活性位点半胱氨酸被烷基化）。
	确保消化前样品中不含盐酸胍。完全避免使用盐酸胍，或与 SP3 [®] /PAC 等方法结合使用，这些方法允许大量去除缓冲组分。非常低的毫摩尔浓度的盐酸胍就足以完全抑制 Arg-C Ultra。
	确保蛋白质在消化 pH 值下可溶。
	确保蛋白质充分展开以使酶能够接触到消化位点（例如，还原、烷基化、加入变性剂）。
	优化消化参数（pH 值、酶用量、消化时间）。

问题	原因和参考建议
特异性低	减少使用的酶量。
	缩短消化时间。
	通过样品酸化（TFA 或甲酸）或使用烷基化剂抑制酶来有效抑制消化后的酶活性。

8. 参考文献

1. Curtis, M.A., et al. (1999) Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.* **34**, 464–72.
2. Hughes, C.S., et al. (2019) Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat. Protoc.* **14**, 68–85.
3. Batth, T.S., et al. (2019) Protein aggregation capture on microparticles enables multipurpose proteomics sample preparation. *Mol. Cell. Proteomics* **18**, 1027–35.

9. 相关产品

产品	规格	目录号
Lys-C, Mass Spec Grade	20µg	VA1170
rLys-C, Mass Spec Grade	15µg	V1671
Arg-C, Sequencing Grade	10µg	V1881
Sequencing Grade Modified Trypsin (lyophilized)	5 × 20µg	V5111
Sequencing Grade Modified Trypsin (frozen)	5 × 20µg	V5113
Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade	20µg	V5071
Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade	100µg	V5280
Trypsin Platinum, Mass Spectrometry Grade	100µg	VA9000
rAsp-N, Mass Spec Grade	10µg	V1160
Glu-C, Sequencing Grade	50µg	V1651
Chymotrypsin, Sequencing Grade	25µg	V1061
DTT, Molecular Grade (DL-Dithiothreitol)	5g	V3151
TCEP	15mg	VB1000
Iodoacetamide	15mg	VB1010

仅供科研使用。不得用于诊断检测。

© 2024 Promega Corporation. All Rights Reserved.

NANOpure is a registered trademark of Barnstead/Thermo Scientific Corporation. Orbitrap Exploris is a trademark of Thermo Fisher Scientific. SP3[®] is a registered trademark of PreOmics GmbH.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our website for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.