

Pfu N-acetyl Deblocking Aminopeptidase (Ac-DAP)

Code No. 7340

Size: 50 μ g

Supplied Reagent:
5X Ac-DAP Buffer

1 ml

Description :

Pfu N-acetyl Deblocking Aminopeptidase (Ac-DAP) is a unique exo-type aminopeptidase that liberates the N-terminal acyl-type blocking group and following free amino acid residues from proteins and peptides. This enzyme has a wide range of substrate specificity and is applicable to analyze the amino acid sequence of N-termini or near region of N-termini of a small amount of the N-terminal blocked proteins or peptides, which are not suitable for the usual analysis. Since N-termini of this enzyme is acetylated by genetic engineering procedure, amino acid sequence of this enzyme can not be analyzed by Edman degradation. Therefore, even if using this enzyme in the high E/S ratio (for example, E/S=1/2-1/1), amino acid sequence of only target proteins or peptides can be analyzed easily and clearly.

Source :

Yeast carrying the plasmid which contains the gene encoding *Pyrococcus furiosus* DAP.

Form:

Solution in 50 mM N-Ethylmorpholine-AcOH buffer (pH 8.0).

Supplied buffer (5X) :

250 mM N-Ethylmorpholine-AcOH buffer (pH 8.0) containing 0.5 mM CoCl₂. Once thawed, the buffer should be stored at 4°C. Avoid freeze-thaw cycles.

Storage : -20°C

Once thawed, the enzyme solution should be stored at 4°C. Enzyme and buffer are stable at least 3 months at 4°C.

Protein Concentration : 1 mg/ml

Quality Control Data :

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Reactivity :

This enzyme cleaves all the peptide bonds except X-Pro binding. The enzyme activity is remarkably increased in the presence of Co²⁺ ion.

Specific Activity : > 8 U/mg

Definition of Activity :

One unit of the enzyme activity corresponds to the amount required to hydrolyze 1 μ mol of Leucine-*p*-nitroanilide at 75°C, pH 8.0, in one minute.

Properties :

Molecular weight: 38,639 (mass spectrometry)
451,000 (by sedimentation equilibrium method)

Activator: CoCl₂

Inhibitor: Amastatin, EDTA

Optimum pH: pH 6.5-9.0

Optimum temperature: 85 - 95°C

Thermal stability: It was confirmed that the enzyme retains 100% activity after 48 hrs at 50°C in the supplied buffer. (pH 8.0, with 0.1 mM Co²⁺)

Application :

Analysis of CM-SOD (superoxide dismutase, bovine);
Ac-DAP was added to the CM-COD (500 pmol), denatured by carboxymethylation, in the E/S ratio of 1/1 and incubated at 50°C for 48 hours in 50 mM N-ethylmorpholine buffer (pH 8.0) with 0.1 mM CoCl₂. After the reaction was finished, formic acid was added at 5% of final concentration and the sample was analyzed directly by protein-sequencer. As the result, the amino acid sequence from the 12th glycine to the 36th leucine of N-termini of bovine SOD (underlined) was detected.

Sequence;

Ac-ATKAVVCLKGDGPVQGTIHFEAKGDTVVVTSITGL

Note :

Since this enzyme can not react with the protein keeping the higher-order structure, the protein sample should be denatured by chemical procedure such as carboxymethylation.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6973 or from our website at www.takara-bio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

v201902Da

Pfu N-acetyl Deblocking Aminopeptidase (Ac-DAP)

Code No. 7340

容量： 50 μ g

添付試薬：

5×Ac-DAP Buffer

1 ml

● 製品説明

Pfu N-acetyl Deblocking Aminopeptidase (Ac-DAP) は、タンパク質やペプチドのミリスチル基等を含む N 末端修飾アシル基およびそれに続くアミノ酸を順次遊離する exo 型のアミノペプチダーゼである。幅広い基質特異性を有し、N 末端が修飾されているために今まで解析が困難であった微量タンパク質の N 末端あるいは N 末端近傍のアミノ酸配列を容易に解析することができる。

本酵素は、遺伝子工学的手法により DAP の N 末端にアセチル基を導入しているため、通常のエドマン法では本酵素のアミノ酸配列は解析されない。従って、DAP と異なり本酵素を酵素 / 基質比 (E/S 比) = 1/2 ~ 1/1 という高比率で用いても、目的とするタンパク質やペプチドの配列のみをプロテインシークエンサーで明瞭かつ簡便に解析することができる。

● 由来

Pyrococcus furiosus 由来の DAP を遺伝子組換え技術により酵母で生産

● 形状

50 mM N-エチルモルホリン - 酢酸緩衝液 (pH8.0) に溶解後、凍結。

● 添付緩衝液 (5×)

0.5 mM CoCl₂ を含む 250 mM N-エチルモルホリン - 酢酸緩衝液 (pH8.0) 解凍後は 4°C 保存が好ましい。凍結・融解は繰り返さない。

● 保存

- 20°C
解凍後は 4°C で保存することが好ましい。酵素・緩衝液は解凍後 4°C で少なくとも 3 ヶ月は安定。

● 濃度

1 mg/ml

● 品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトのドキュメントセンターからダウンロードできます。

● 反応

タンパク質、ペプチドの N 末端から exo 型にアシル型 N 末端修飾基およびそれに続くアミノ酸を順次遊離する。ただし X-Pro 結合は加水分解しない。Co²⁺ イオンにより顕著に活性化する。

● 比活性

> 8 U/mg

● 活性の定義

75°C、pH8.0 で、1 分間に 1 μ mol の Leucine-p-nitroanilide を分解する酵素量を 1 U とする。

● 一般的性質

分子量： 38,639 (質量分析法)
約 451,000 (沈降平衡法)

活性化剤： CoCl₂

阻害剤： Amastatin, EDTA

至適 pH： pH6.5 ~ 9.0

至適温度： 85 ~ 95°C

温度安定性： 50°C (0.1 mM CoCl₂ を含む 50 mM N-エチルモルホリン - 酢酸緩衝液 (pH8.0) 中)、48 時間で 100% の活性を保持。

● 使用例

CM 化ウシスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を用いた分析例；
CM 化したスーパーオキシドジスムターゼ (500 pmol) に E/S = 1/1 の比率で Ac-DAP を加え、0.1 mM CoCl₂ 含有 50 mM N-エチルモルホリン緩衝液 (pH8.0) 中で 50°C、48 時間反応を行った。反応終了後、終濃度 5% となるようにギ酸を添加し、そのままプロテインシークエンサーで分析した。その結果、N 末端配列の 12 残基目のグリシン以降 36 残基目のロイシンまでのアミノ酸配列 (下線で示す) が確認された。

配列： Ac-ATKAVVCLKGDGPVQGTIHFEAKGDTVWVTGSITGL

● 使用上の注意

本酵素は高次構造を保ったタンパク質には作用しません。試料タンパク質は必ずカルボキシメチル化 (CM 化) など化学的手法で変性させてください。

● 参考文献

蛋白質・核酸・酵素 (2000) 45: 186-192.

● 注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。