

PNGase F去糖基化试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P2318S	PNGase F去糖基化试剂盒	25次
P2318M	PNGase F去糖基化试剂盒	100次
P2318L	PNGase F去糖基化试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天生产的PNGase F去糖基化试剂盒(PNGase F Deglycosylation Kit), 又称PNGase F聚糖切割试剂盒(PNGase F Glycan Cleavage Kit)或PNGase F释放试剂盒(PNGase F Releasing Kit), 是一种去糖基化试剂盒, 可在天然或变性条件下从糖蛋白或糖多肽中切割N-糖苷键, 从而去除N-聚糖链。
- PNGase F, 即Peptide N-Glycosidase F, 中文名称为N-糖酰胺水解酶F, 简称糖基肽酶F, 是一种通过*E.coli*重组表达来源于*Elizabethkingia miricola* (formerly *Flavobacterium meningosepticum*)的糖基肽酶。糖基肽酶F可以在几乎所有类型的N-多糖如高甘露糖(High mannose)、混合型和复杂寡聚糖(Hybrid and complex oligosaccharides)的最内端N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc, N-acetylglucosamine)和天冬酰胺(Asn)残基的连接处切割, 从而移除N-寡聚糖(N-linked oligosaccharides), 将蛋白和糖链修饰分开(图1) [1], 可用于抗体、免疫球蛋白融合蛋白或其它糖蛋白的体外去除N-糖基化修饰反应。另外Concanavalin A磁珠分离细胞或膜蛋白后, 可使用PNGase F酶进行糖基的切除, 从而使糖蛋白从Concanavalin A磁珠上解离下来, 对于后续膜蛋白的质谱分析有很大帮助[2]。本糖基肽酶F的N端带有His-tag, 可以通过相应的His抗体琼脂糖凝胶、磁珠或镍柱吸附去除。

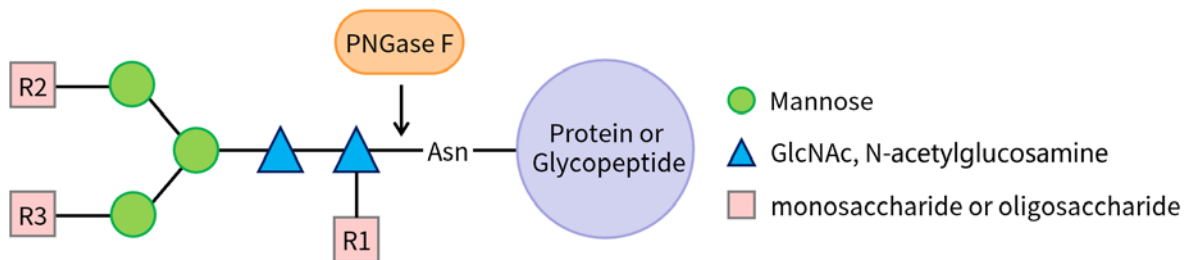


图1. 碧云天PNGase F去糖基化试剂盒(P2318)移除N-糖苷(N-linked oligosaccharides)的示意图。糖链可以在图中戊糖(pentasaccharide)的R1、R2和R3位置延伸。R1位置只能是空缺或 α -6 fucose, 不能是 α -3 fucose, 否则就不能被PNGase F切割。R2和R3位置可以是任意的单糖或多糖。

- 糖基化修饰(Glycosylation)是一种蛋白质翻译后修饰(Post-translational modification, PTM), 几乎存在于所有生物体中, 包括真核生物、真细菌(Eubacteria)和古细菌(Archaea)。糖基化修饰的多样性会改变蛋白的质量和电荷, 在蛋白质分类、免疫识别、受体结合、炎症、致病性和许多其他过程中发挥着关键的生物功能[3-5]。最新的研究表明, 核酸也存在糖基化修饰。
- 本试剂盒中PNGase F的基本信息如下表:

蛋白信息(About this protein)	
名称(Name)	Peptide N-Glycosidase F (PNGase F), 糖基肽酶F
别名(Synonyms)	N-糖酰胺水解酶F, N-糖苷酶 F, Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl) asparagine amidase F, Glycopeptide N-glycosidase, N-glycanase
CAS号(CAS No.)	83534-39-8
分子量(MW)	36kDa
外观 (Physical appearance)	Liquid
活性 (Biological activity)	500U/ μ l
活力单位 (Unit definition)	One unit is defined as the amount of enzyme required to remove >95% of the carbohydrate from 10 μ g of denatured RNase B in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 10 μ l.
纯度(Purity)	\geq 95% by SDS-PAGE, protease-free.

产品用途 (Applications)	1. 抗体、免疫球蛋白融合蛋白或其它糖蛋白的体外去N-糖基化修饰； 2. 表征蛋白是否存在N-糖基化修饰。
------------------------	--

- PNGase F最佳酶切温度为37°C，在较宽的pH范围(6.0-10.0)，在较宽的温度范围(4-50°C)，较宽的离子强度范围(0-1M NaCl)内均具有较高的酶活性。本产品与国外同类产品Competitor N相比，去除蛋白糖基的效果基本一致(图2)。

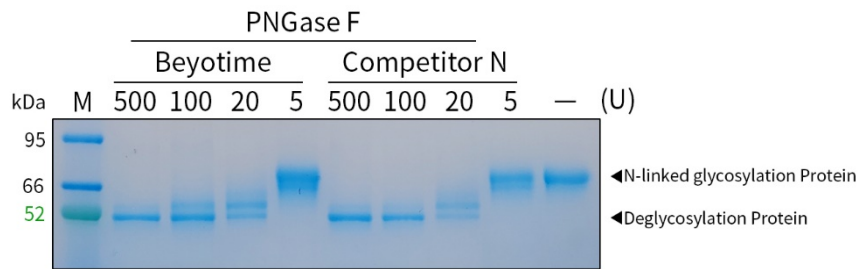


图2. 碧云天的PNGase F去糖基化试剂盒(P2318)去除蛋白糖基化修饰的效果图。在20 μ l反应体系中，加入10 μ g N-糖基化修饰蛋白及相应量的本产品或国外同类产品Competitor N，37°C孵育1小时后，加入4 μ l SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6X) (P0289)，混匀后95°C加热5分钟，使用BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 10孔) (P0468)电泳，蛋白Marker为BeyoColor™彩色预染蛋白分子量标准(6.5-270kD) (P0071/P0072)，并经BeyoBlue™考马斯亮蓝超快染色液(P0017F)染色。图中可见PNGase F处理后，糖基化蛋白的迁移率发生变化，蛋白条带大小从略大于66kDa转变为约52kDa。实际效果会因样品种类、检测条件等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- **PNGase F储存液:** 10mM Tris (pH7.4), 50mM NaCl, 5mM EDTA。储存液不含甘油，便于HPLC方法优化色谱条件。
- **Reaction Buffer (10X):** 500mM Sodium Phosphate (pH7.5)。
- 本试剂盒用于去除糖蛋白或糖肽的N-糖苷(N-linked oligosaccharides)的酶切反应时，如果按照每100 μ g糖蛋白使用1 μ l (500U/ μ l)在37°C反应1小时，本产品小、中、大包装分别可以用于2.5mg、5mg和25mg糖蛋白的N-糖苷移除，相当于25、100和500次反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2318S-1	PNGase F (500U/ μ l)	25 μ l
P2318S-2	Reaction Buffer (10X)	100 μ l
P2318S-3	Denaturing Buffer (10X)	50 μ l
P2318S-4	Renaturing Buffer (10X)	100 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2318M-1	PNGase F (500U/ μ l)	100 μ l
P2318M-2	Reaction Buffer (10X)	400 μ l
P2318M-3	Denaturing Buffer (10X)	200 μ l
P2318M-4	Renaturing Buffer (10X)	400 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2318L-1	PNGase F (500U/ μ l)	500 μ l
P2318L-2	Reaction Buffer (10X)	2ml
P2318L-3	Denaturing Buffer (10X)	1ml
P2318L-4	Renaturing Buffer (10X)	2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存，一年有效。

注意事项:

- PNGase F不能水解含有core α 1-3 Fucose的N-糖苷(常见于植物及昆虫糖蛋白，此时需要使用PNGase A)。
- 超纯水推荐选购ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

体外酶解去糖基化修饰反应根据对糖蛋白或糖肽的处理方式不同,可分为变性去糖基化修饰反应(Denaturing deglycosylation)和非变性去糖基化修饰反应(Non-denaturing deglycosylation)。**变性去糖基化修饰反应:**蛋白质变性导致三级结构被破坏,内部序列暴露可以去除所有糖基化修饰;**非变性去糖基化修饰反应:**蛋白原始构象被保留,三级结构中暴露在外的糖苷被移除,但是处于内部的糖苷被保留,蛋白的酶活性或抗原性很可能不受影响。用户可根据实验目的选择相应的去糖基化修饰反应。本试剂盒去除变性和非变性蛋白的N-糖基化修饰的效果如图3所示。

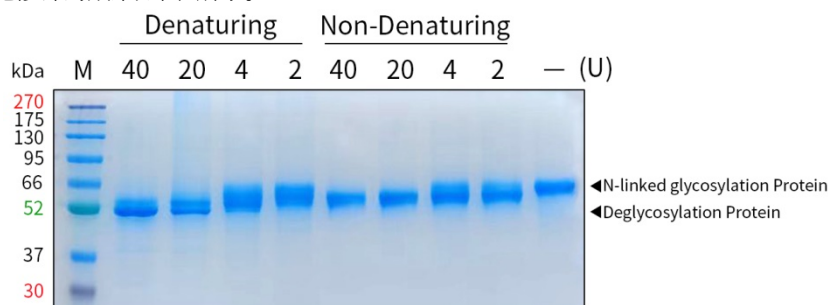


图3. 碧云天PNGase F去糖基化试剂盒(P2318)去除蛋白N-糖基化修饰效果图。在20 μ l反应体系中,加入10 μ g变性(Denaturing)或非变性(Non-Denaturing)的N-糖基化修饰蛋白(含有4个N-linked糖基化修饰)及相应量的PNGase F, 37 $^{\circ}$ C孵育1小时后,加入4 μ l SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6X) (P0289),混匀后95 $^{\circ}$ C加热5分钟,经BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 10孔) (P0468)电泳,Marker为BeyoColor™彩色预染蛋白分子量标准(6.5-270kD) (P0071/P0072),并经BeyoBlue™考马斯亮蓝超快染色液(P0017F)染色。实际效果会因样品种类、检测条件等的不同而存在差异,图中效果仅供参考。

1. 变性去N-糖基化修饰反应(Denaturing deglycosylation):

a. 按下表在1.5ml离心管中配制反应体系,并充分混匀。

Component	Volume (μ l)
Protein (10-100 μ g)	X
Denaturing Buffer (10X)	1
Ultrapure Water	To 10

注:因不同蛋白质所带有的N-linked糖基化修饰数目不同,可视情况调整蛋白加入量,以获得最佳的实验方案。

b. 100 $^{\circ}$ C加热10分钟,使蛋白充分变性。

c. 置于冰浴,冷却至少10秒,10,000g离心3-5秒,确保所有溶液聚集于管底。

d. 向上述10 μ l变性体系中,加入2 μ l Reaction Buffer (10X), 2 μ l Renaturing Buffer (10X)和6 μ l H₂O,充分混匀。

e. 加入1 μ l PNGase F (500U/ μ l),充分混匀,37 $^{\circ}$ C孵育1-4小时。

注1:如果蛋白量比较少,也可以用1X Reaction Buffer对PNGase F进行适当稀释后使用。

注2:因蛋白质本身以及糖基化修饰的不同,N-糖苷移除效率可能存在差异,可视情况适当调整PNGase F用量和反应时间,以获得最佳的实验效果。

f. 加入4 μ l SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6X) (P0289),混匀后95 $^{\circ}$ C加热5分钟,使用BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(P0468)进行电泳检测和考马斯亮蓝(P0017F)染色。

g. 观察考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE胶,对比PNGase F处理前后蛋白样品分子量变化,观察蛋白样品去N-糖基化修饰效果。后续大量蛋白去糖基化修饰时,可以等比例放大酶切反应体系。

2. 非变性去N-糖基化修饰反应(Non-denaturing deglycosylation):

进行非变性去N-糖基化修饰反应时,建议平行做一组变性去N-糖基化修饰反应,以便提供完全去除N-糖基化修饰蛋白的阳性对照。可以通过比较非变性反应与变性反应,以确定非变性反应的去N-糖基化程度。

a. 按下表在1.5ml离心管中配制反应体系,并充分混匀。

Component	Volume (μ l)
Protein (10-100 μ g)	X
Reaction Buffer (10X)	2
PNGase F (500U/ μ l)	1
Ultrapure Water	To 20

注:因不同蛋白质所带有的N-linked糖基化修饰数目不同,可视情况调整蛋白加入量,以获得最佳的实验方案。

b. 37 $^{\circ}$ C孵育4-24小时。

注:因蛋白质本身以及糖基化修饰的不同,N-糖苷移除效率可能存在差异,可视情况适当调整PNGase F用量和反应时间,以获得最佳的实验效果。

c. 加入4 μ l SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6X) (P0289),混匀后95 $^{\circ}$ C加热5分钟,使用BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(P0468)进行电泳检测和考马斯亮蓝(P0017F)染色。

d. 观察考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE胶,对比PNGase F处理前后蛋白样品分子量变化,观察蛋白样品去N-糖基化修饰效果。后续大量蛋白去糖基化修饰时,可以等比例放大酶切反应体系。

参考文献:

1. Elder JH, Alexander S. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982. 79(15):4540-4.
2. Lee YC, Srajer Gajdosik M, Josic D, Lin SH. Methods Mol Biol. 2012. 909:29-41.
3. Drickamer K, Taylor ME. Introduction to Glycobiology (2nd ed.). Oxford University Press, USA. 2006, ISBN: 978-0-19-928278-4.
4. Lechner J, Wieland F. Annu Rev Biochem. 1989. 58:173-94.
5. Messner P. Glycoconj J. 1997. 14(1):3-11.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P2318S	PNGase F去糖基化试剂盒	25次
P2318M	PNGase F去糖基化试剂盒	100次
P2318L	PNGase F去糖基化试剂盒	500次

Version 2023.06.28