

Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法)

产品编号	产品名称	包装
P2541S	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法)	25次
P2541M	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法)	100次
P2541L	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法)	500次

产品简介:

- 碧云天生产的Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法), 即Rapid PNGase F Deglycosylation Kit (Denaturing Method), 是一种高效快速去糖基化试剂盒。与PNGase F去糖基化试剂盒(P2318)去除N-糖基化修饰需要几小时甚至过夜相比, 本试剂盒仅需50°C孵育10分钟即可完成对糖蛋白N-聚糖链的去除, 可有效缩短样品处理时间, 处理后的样品可用于SDS-PAGE、Western、高效液相色谱(HPLC)或质谱分析(Mass spectrometry)等。本试剂盒也可以间接用于抗体、免疫球蛋白融合蛋白或其它糖蛋白的糖基化水平检测。
- 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[1-3]。最新的研究表明, 核酸也存在糖基化修饰。
- 抗体药物的生产中调节和控制糖基化修饰对抗体的活性、药代动力学和免疫原性都有着重要影响。例如在IgG的Fc部分Asn297处有一个保守的N-聚糖链, 很多抗体还有额外的N-聚糖链, 这些N-聚糖链可能对抗体的活性、半衰期和免疫反应至关重要; 而且细胞培养过程中的变量, 可能进一步增加抗体糖基化修饰的多样性, 因此N-聚糖链的表征和质量控制是抗体药物的关键质量属性(Critical quality attributes, CQAs)之一[4]。
- Rapid PNGase F与PNGase F功能相同, 通过*E.coli*重组表达, 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(Asparagine, 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)[5]。本试剂盒提供的Rapid PNGase F的N端带有His-tag, 反应后通过相应的His抗体琼脂糖凝胶、磁珠或镍柱吸附去除。

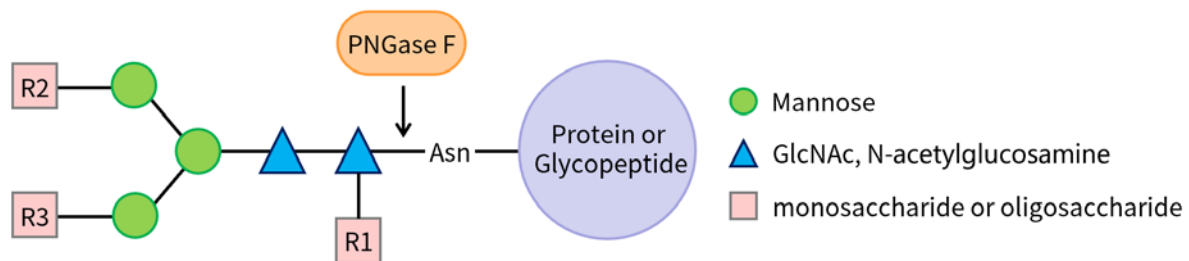


图1. 碧云天Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法) (P2541)移除N-糖苷(N-linked oligosaccharides)的示意图。糖链可以在图中戊糖(Pentasaccharide)的R1、R2和R3位置延伸。R1位置只能是空缺或 α -6 fucose, 不能是 α -3 fucose, 否则就不能被Rapid PNGase F切割。R2和R3位置可以是任意的单糖或多糖。

- 本试剂盒去除不同种属IgG的N-糖基化修饰效果如图2所示。

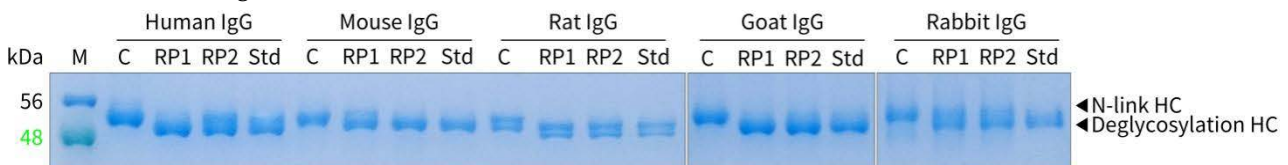


图2. Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法) (P2541)去除不同种属IgG的N-糖基化修饰效果图。IgG蛋白经过变性处理后内部二硫键全部破坏, 抗体重链(Heavy chain, HC)和轻链(Light chain, LC)发生分离。图中为抗体重链部分的电泳条带。C (Control)为未处理的对照。RP1为使用Rapid PNGase F一步法反应, RP2为两步法反应。在20 μ l反应体系中, 10 μ g不同种属的IgG分别加入1 μ l Rapid PNGase F, 50°C孵育10分钟。Std (Standard denaturing reaction with SDS)为10 μ g不同种属的IgG加入1 μ l PNGase F (P2318), 37°C孵育4小时的结果。经BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(Hepes, 4-15%, 15孔) (P0520)电泳, 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、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 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碧云天Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法) (P2541)和Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(非变性法) (P2543)。

- Rapid PNGase F储存液：20mM Tris (pH7.4), 50mM NaCl, 5mM EDTA。
- 本试剂盒用于移除糖蛋白或糖肽的N-糖苷酶切反应时，如果按照每次使用1μl Rapid PNGase F在50°C反应10分钟，本产品小、中、大包装分别可以用于25、100和500次反应。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P2541S-1	Rapid PNGase F	25μl
P2541S-2	Denaturing Reaction Buffer (5X)	100μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2541M-1	Rapid PNGase F	100μl
P2541M-2	Denaturing Reaction Buffer (5X)	400μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2541L-1	Rapid PNGase F	500μl
P2541L-2	Denaturing Reaction Buffer (5X)	2ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。

注意事项：

- Rapid PNGase F不能水解含有core α1-3 Fucose的N-糖苷(常见于植物及昆虫糖蛋白，此时需要使用PNGase A)。
- 避免使用含有SDS的缓冲液，SDS会抑制Rapid PNGase F的酶活性。
- Tween、Triton X-100、NP-40、辛基葡萄糖苷(Octyl glucoside)、非去垢剂磺基甜菜碱(Non-detergent sulfobetaine)，以及有机溶剂都会抑制Rapid PNGase F的酶活性。
- 超纯水推荐选购BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- 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：

通常采用一步法反应，即可高效完成去N-糖基化修饰反应，但是部分糖蛋白(例如某些IgG的Fab部分存在N-糖基化修饰)需要在80°C加热2分钟进行预变性充分暴露N-糖基化修饰位点，才能有效去除全部N-聚糖链。建议用户优先采用一步法反应，如果后续SDS-PAGE电泳或蛋白质组学分析表明蛋白仍旧有N-聚糖链残留，再采用两步法反应。

1. 一步法反应(One-step protocol)：

- a. 按下表在1.5ml离心管中配制反应体系，并充分混匀。

Reagent	Volume
Protein (10-100μg)	x μl
Ultrapure Water	(15-x)μl
Denaturing Reaction Buffer (5X)	4μl
Rapid PNGase F	1μl
Total	20μl

- b. 50°C孵育10分钟。
c. 后续即可进行SDS-PAGE、Western等常规分析。也可以根据需要酌情对N-聚糖进行衍生化(例如Reductive amination)，以便进行下游分析。如果后续采用质谱分析去糖基化蛋白，推荐使用碧云天的BeyoDesalt™脱盐柱对溶液进行置换。

2. 两步法反应(Two-step protocol)：

- a. 按下表在1.5ml离心管中配制反应体系，并充分混匀。

Reagent	Volume
Protein (10-100μg)	x μl
Denaturing Reaction Buffer (5X)	4μl

Ultrapure Water	To 19µl
-----------------	---------

- b. 80°C加热2分钟。
- c. 冷却至室温，加入1µl Rapid PNGase F，混匀后50°C孵育10分钟。
- d. 后续即可进行SDS-PAGE、Western等常规分析。也可以根据需要酌情对N-聚糖进行衍生化(例如Reductive amination)，以便进行下游分析。如果后续采用质谱分析去糖基化蛋白，推荐使用碧云天的BeyoDesalt™脱盐柱对溶液进行置换。

参考文献：

1. Drickamer K, Taylor ME. Introduction to Glycobiology. Oxford University Press, USA. 2006. ISBN: 978-0-19-928278-4.
2. Lechner J, Wieland F. Annu Rev Biochem. 1989. 58:173-94.
3. Messner P. Glycoconj J. 1997. 14(1):3-11.
4. Liu L. J Pharm Sci. 2015. 104(6):1866-1884.
5. Elder JH, Alexander S. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982. 79(15):4540-4.

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
P2541S	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法)	25次
P2541M	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法)	100次
P2541L	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(变性法)	500次
P2543S	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(非变性法)	25次
P2543M	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(非变性法)	100次
P2543L	Rapid PNGase F去糖基化试剂盒(非变性法)	500次
P2603-20pcs	BeyoDesalt™ G-10 Spin脱盐柱	20个
P2603-100pcs	BeyoDesalt™ G-10 Spin脱盐柱	100个
P2605-5pcs	BeyoDesalt™ G-10 Mini脱盐柱	5个
P2605-20pcs	BeyoDesalt™ G-10 Mini脱盐柱	20个
P2607-5pcs	BeyoDesalt™ G-10 Midi脱盐柱	5个
P2607-20pcs	BeyoDesalt™ G-10 Midi脱盐柱	20个
P2613-20pcs	BeyoDesalt™ G-25 Spin脱盐柱	20个
P2613-100pcs	BeyoDesalt™ G-25 Spin脱盐柱	100个
P2615-5pcs	BeyoDesalt™ G-25 Mini脱盐柱	5个
P2615-20pcs	BeyoDesalt™ G-25 Mini脱盐柱	20个
P2617-5pcs	BeyoDesalt™ G-25 Midi脱盐柱	5个
P2617-20pcs	BeyoDesalt™ G-25 Midi脱盐柱	20个

Version 2023.09.10