PNGase F去糖基化试剂盒

产品货号：BA2980

产品规格：25T/100T/500T

产品简介：

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。

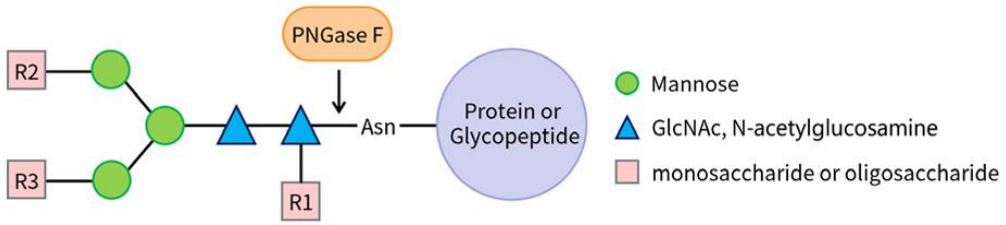

图1. PNGase F去糖基化试剂盒移除N-糖苷(N-linked oligosaccharides)的示意图。

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)	液体
活性(Biological activity)	500U/μl
活力单位(Unit definition)	一个单位被定义为在37°C下，在10μL的总反应体积内，在1小时内去除10μg变性RNase B中>95%的碳水化合物所需的酶量。

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

纯度(Purity)	≥95%，根据SDS-PAGE检测，不含蛋白酶。
产品用途	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37ºC，在较宽的pH范围(6.0-10.0)，在较宽的温度范围(4-50ºC)，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)。

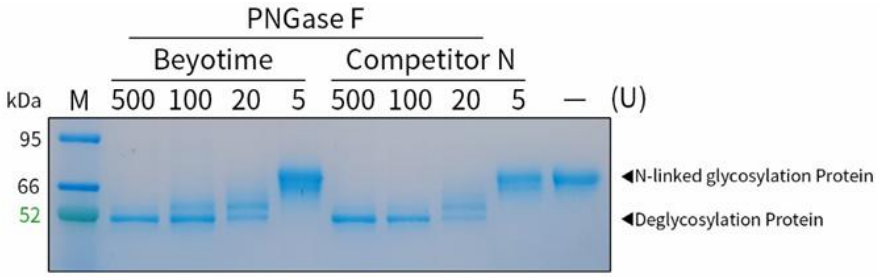

图2. PNGase F去糖基化试剂盒去除蛋白糖基化修饰的效果图。

在20μl反应体系中，加入10μg 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，37ºC孵育1小时后，加入4μl SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6×) ，混匀后95ºC加热5分钟，使用Plus PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 10孔) 电泳，蛋白Marker为彩色预染蛋白分子量标准(6.5-270kD) ，并经考马斯亮蓝超快染色液染色。图中可见经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 (10×): 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100μg糖蛋白使用1μl (500U/ μl)在37ºC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：

产品名称	25T	100T	500T
PNGase F (500U/μl)	25μl	100μl	500μl
Reaction Buffer (10×)	100μl	400μl	2ml
Denaturing Buffer (10×)	50μl	200μl	1ml
Renaturing Buffer (10×)	100μl	400μl	2ml

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。

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

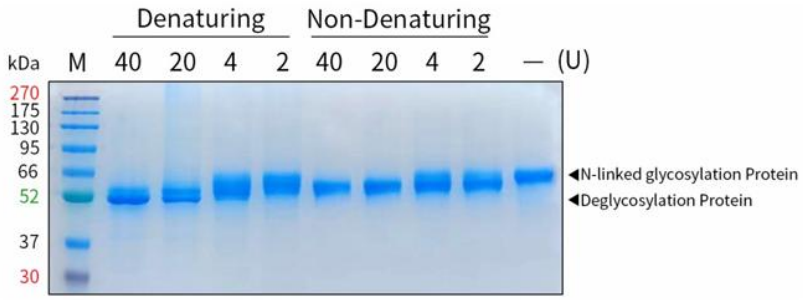

图3. PNGase F去糖基化试剂盒去除蛋白N-糖基化修饰效果图。

在20μl反应体系中，加入10μg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，37ºC孵育1小时后，加入4μl SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6×) ，混匀后95ºC加热5分钟，经Plus PAGE预制胶(Tris-Gly, 4-20%, 10孔) 电泳，Marker为彩色预染蛋白分子量标准(6.5-270kD) ，并经考马斯亮蓝超快染色液染色。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 (μl)
Protein (10-100μg)	X
Denaturing Buffer (10×)	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. 100ºC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10μl变性体系中，加入2μl Reaction Buffer (10×)，2μl Renaturing Buffer (10×)和6μl H2O，充分混匀。

e. 加入1μl PNGase F (500U/μl)，充分混匀，37ºC孵育1-4小时。

注1：如果蛋白量比较少，也可以用1× 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4μl SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6×) ，混匀后95ºC加热5分钟，使用Plus PAGE预制胶进行电泳检测和考马斯亮蓝染色。

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 (μl)
Protein (10-100μg)	X
Denaturing Buffer (10×)	2
PNGase F (500U/μl)	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. 37ºC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4μl SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6×) ，混匀后95ºC加热5分钟，使用Plus PAGE预制胶进行电泳检测和考马斯亮蓝染色。

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。

注意事项：

1. 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)。
2. 超纯水推荐选购Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。
3. 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。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

-20℃，12个月。

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com