

PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法)

产品编号	产品名称	包装
P2330S	PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法)	25次
P2330M	PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法)	100次
P2330L	PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法)	500次

产品简介:

- 碧云天生产的PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法) (PNGase F Deglycosylation Kit with Magnetic Beads), 又称PNGase F聚糖切割试剂盒(磁珠法) (PNGase F Glycan Cleavage Kit with Magnetic Beads)或PNGase F释放试剂盒(磁珠法) (PNGase F Releasing Kit with Magnetic Beads), 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。本试剂盒中的PNGase F带有Biotin标记(Biotinylated PNGase F), 可与链霉亲和素(Streptavidin)磁珠结合, 后续可以借助磁力架等磁分离设备非常便捷地从反应体系中快速去除Biotinylated PNGase F, 无需传统的柱纯化, 极大地简化了样品处理的步骤。
- 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), 将蛋白质和糖链修饰分开(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。

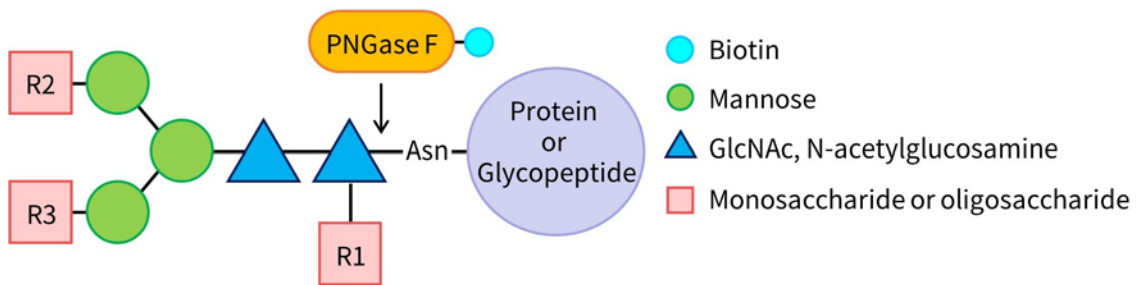


图1. 碧云天PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法) (P2330)移除N-糖苷(N-linked oligosaccharides)的示意图。糖链可以在图中戊糖(pentasaccharide)的R1、R2和R3位置延伸。R1位置只能是空缺或 α -6 fucose, 不能是 α -3 fucose, 否则就不能被Biotinylated PNGase F切割。R2和R3位置可以是任意的单糖或多糖。

- 生物素(Biotin)与链霉亲和素(Streptavidin)是一种天然存在的生物分子相互作用体系, 亲和常数为 $K_a=10^{15}M$, 是已知的几乎是最强的蛋白与配体的相互作用。Streptavidin是一种4聚体蛋白, 可以同时高度特异地结合4个生物素分子。
- 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[2-4]。最新的研究表明, 核酸也存在糖基化修饰。
- Biotinylated PNGase F最佳酶切温度为 $37^{\circ}C$, 在较宽的pH范围(6.0-10.0), 在较宽的温度范围($4-50^{\circ}C$), 较宽的离子强度范围(0-1M NaCl)内均具有较高的酶活性。
- **Biotinylated PNGase F储存液:** 10mM Tris (pH7.4), 50mM NaCl, 5mM EDTA。储存液不含甘油, 便于HPLC分析时优化色谱条件。
- **Reaction Buffer (10X):** 500mM Sodium Phosphate (pH7.5)。
- 本试剂盒用于移除糖蛋白或糖肽的N-糖苷(N-linked oligosaccharides)酶切反应时, 如果按照每 $100\mu g$ 糖蛋白使用 $1\mu l$ Biotinylated PNGase F ($500U/\mu l$)在 $37^{\circ}C$ 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, 相当于约25、100和500次反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2330S-1	Biotinylated PNGase F ($500U/\mu l$)	$25\mu l$
P2330S-2	Reaction Buffer (10X)	$100\mu l$
P2330S-3	Denaturing Buffer (10X)	$50\mu l$

P2330S-4	Renaturing Buffer (10X)	100μl
P2330S-5	链霉亲和素磁珠	400μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2330M-1	Biotinylated PNGase F (500U/μl)	100μl
P2330M-2	Reaction Buffer (10X)	400μl
P2330M-3	Denaturing Buffer (10X)	200μl
P2330M-4	Renaturing Buffer (10X)	400μl
P2330M-5	链霉亲和素磁珠	1.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2330L-1	Biotinylated PNGase F (500U/μl)	500μl
P2330L-2	Reaction Buffer (10X)	2ml
P2330L-3	Denaturing Buffer (10X)	1ml
P2330L-4	Renaturing Buffer (10X)	2ml
P2330L-5	链霉亲和素磁珠	7.5ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。为避免Biotinylated PNGase F过多的反复冻融，首次使用时建议适当进行分装。

注意事项：

- Biotinylated 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)。
- 超纯水推荐选购ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。
- 链霉亲和素磁珠使用前要适当充分重悬，即颠倒若干次使磁珠混合均匀，混匀操作须轻柔，不宜剧烈涡旋震荡。
- 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2所示。

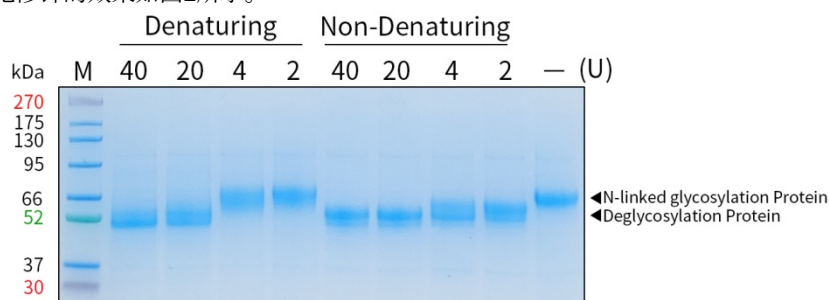


图2. 碧云天PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法) (P2330)去除蛋白N-糖基化修饰的效果图。在20μl反应体系中，加入10μg变性(Denaturing)或非变性(Non-Denaturing)的N-糖基化修饰蛋白(含有4个N-linked糖基化修饰)及相应量的Biotinylated PNGase F，37°C孵育1小时后，加入15μl链霉亲和素磁珠室温孵育10分钟，置于磁力架(FMS009/FMS015/FMS025)上分离1分钟，吸取上清加入4μl SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(6X) (P0289)，混匀后95°C加热5分钟，经BeyoGel™ Plus PAGE预制胶(Tris-Gly, 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、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

1. 链霉亲和素磁珠准备。

- 取磁珠并去除上清。**用移液器轻轻吹打以充分重悬链霉亲和素磁珠，按照每1μl Biotinylated PNGase F使用15μl链霉亲和素磁珠，取相应量的链霉亲和素磁珠悬浊液置于1.5ml离心管中待用。使用前置于磁力架(FMS009/FMS015/FMS025)上分离1分钟，去除上清。
- 洗涤磁珠。**加入1X TBS (ST661/ST665)至最终体积为约100-500μl，用移液器轻轻吹打重悬链霉亲和素磁珠。置于磁力架上

分离10秒，去除上清，完成一次洗涤步骤。然后再按照前述洗涤步骤，洗涤2次。

- c. **磁珠重悬**：用H₂O稀释Reaction Buffer (10X) 10倍后即可得到Reaction Buffer (1X)，用原始磁珠体积的Reaction Buffer (1X)重悬链霉亲和素磁珠。

2. 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
Protein (10-100µg)	Xµl
Denaturing Buffer (10X)	1µl
Ultrapure Water	To 10µl

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°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10µl变性体系中，加入2µl Reaction Buffer (10X)，2µl Renaturing Buffer (10X)和6µl H₂O，充分混匀。
e. 加入1µl Biotinylated PNGase F (500U/µl)，充分混匀，37°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Biotinylated 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Biotinylated PNGase F的用量和反应时间，以获得最佳的实验效果。

- f. 孵育结束后，加入15µl步骤1c中充分重悬于Reaction Buffer (1X)中的链霉亲和素磁珠，置于振荡器或旋转混合仪上，室温孵育10分钟。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortex™基础型旋转混合仪(E6800)。
g. 样品反应管在台式离心机上瞬时离心后置于磁力架上分离1分钟，吸取上清到新的离心管中，即可进行后续检测。
h. SDS-PAGE检测蛋白样品去N-糖基化修饰效果(选做)：吸取5µl上清，加入1µl 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(P0520)进行电泳检测和考马斯亮蓝(P0017F)染色，对比Biotinylated 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，可等比例放大应用到后续的酶切反应中。

3. 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
Protein (10-100µg)	Xµl
Reaction Buffer (10X)	2µl
Biotinylated PNGase F (500U/µl)	1µl
Ultrapure Water	To 20µl

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°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Biotinylated PNGase F (500U/µl)用量和反应时间，以获得最佳的实验效果。
c. 孵育结束后，加入15µl步骤1c中充分重悬于Reaction Buffer (1X)中的链霉亲和素磁珠，置于振荡器或旋转混合仪上，室温孵育10分钟。
d. 样品反应管在台式离心机上瞬时离心后置于磁力架上分离1分钟，吸取上清到新的离心管中，即可进行后续检测。
e. SDS-PAGE检测蛋白样品去N-糖基化修饰效果(选做)：吸取5µl上清，加入1µl 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(P0520)进行电泳检测和考马斯亮蓝(P0017F)染色，对比Biotinylated 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，可等比例放大应用到后续的酶切反应中。

参考文献：

1. Elder JH, Alexander S. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982. 79(15):4540-4.
2. Drickamer K, Taylor ME. Introduction to Glycobiology (2nd ed.). Oxford University Press, USA. 2006, ISBN: 978-0-19-928278-4.
3. Lechner J, Wieland F. Annu Rev Biochem. 1989. 58:173-94.
4. 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
P2330S	PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法)	25次
P2330M	PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法)	100次
P2330L	PNGase F去糖基化试剂盒(磁珠法)	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

Version 2023.11.08