

Glycopeptidase F

(Peptide: *N*-glycosidase F)

Code No. 4450

包装量: 25 mU/vial

附带试剂:

(A) Denature Buffer	500 μ l
(B) Native Buffer	500 μ l
(C) Stabilizer Solution	500 μ l
(D) Control glycoprotein	10 μ l

酶名称:

Peptide-*N*-(*N*-acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase

酶编码: 3. 5. 1. 52

起源:

Escherichia coli carrying the plasmid containing Glycopeptidase F gene.

浓度: 500 mU/ml

制品形态: 溶液

组成: 20 mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2, 50 mM EDTA, 0.05% NaN_3 溶液。

底物特异性:

特异性切断糖蛋白或糖肽的 *N*-糖苷键(GlcNAc-Asn)。不能作用于还原末端 GlcNAc 与 Fucosidic 以 α -1,3 键结合的糖链。

活性定义:

在 37°C, pH8.5 条件下, 每分钟水解 1 μ mol dansyl fetuin glycopeptide 所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制:

请查阅各批次 Certificates of Analysis。产品 CoA 请在 Takara Bio Inc.网站中下载:

http://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc_index.php。

特性:

- 分子量: 约 36,500 (SDS-PAGE)
(注)取决于宿主菌的蛋白水解酶活性, 在重组体 Glycopeptidase F (GPF) 的氨基末端有 15-18 个额外的氨基酸残基(1)。使用 RNase B 和 Fetuin 作为底物, 作用于蛋白的活性与天然体的 GPF 是一样的。
- 最适 pH: pH8.6

保存:

-20°C
融化后 4°C 保存, 避免反复冻融。

方法:

GPF 作用糖蛋白有 2 种脱-*N*-糖基化方法, 非变性条件和变性条件。根据实验的目的选择适合的条件。

附带试剂:

- (A) Denature Buffer : 1% SDS/1 M Tris-HCl (pH8.6)
- (B) Native Buffer : 1 M Tris-HCl (pH8.6)
- (C) Stabilizer Solution : 5% NP-40
- (D) Control glycoprotein : 10 mg/ml Bovine fetuin

样品:

样品的溶液浓度应低于 50 mM。如果高于 50 mM, 通过适当的方法使溶液浓度低于 50 mM (例如透析), 也可以加酸或碱调整 pH 值接近 8.6 (GPF 最适 pH)。当样品加入到溶液中时, 建议检测 pH。样品中不可含有柠檬酸缓冲液和尿素。

反应条件:

GPF 用于三个目的: 1.检测蛋白样品中是否有 *N*-Glycan; 2.检测从蛋白中去除 *N*-Glycan 的效果; 3.从蛋白样品中去除 *N*-Glycan 并分析糖链结构。选择适用于每个实验目的的反应条件。

适用于目的 1. 每 25 μ g 的糖蛋白使用 1 mU 的 GPF 在变性条件下过夜反应。

适用于目的 2. 在非变性条件下反应, 糖蛋白的切断效率取决于糖蛋白的种类。首先, 试着使用 10 mU 的 GPF 进行过夜反应, 如果没有切断, 增加 GPF 添加量, 继续过夜反应。

适用于目的 3. 在变性条件下, 使用少量的 GPF 就能将糖链完全去除, 但是必须去除去污剂。如果要避免去污剂去除的步骤, 那么在非变性条件下进行反应检测切断效果。

当糖蛋白的量小时, 酶量可以减少, 但是每个反应 (25 μ l) 的 GPF 量不能少于 0.5 mU。

SDS-PAGE:

考马斯亮蓝染色时, 每泳道上样 1-5 μ g 样品能检测到切断的条带。银染时, 每泳道上样 10-50 ng 样品能检测到切断的条带。根据糖蛋白的分子量选择适合的丙烯酰胺凝胶的浓度。10%的丙烯酰胺凝胶适用于对照糖蛋白——胎球蛋白。如果糖蛋白的 *N*-Glycan 含量低于 5%, 由于很难检测到糖链切断后的分子量变化, 所以必须延长电泳时间。

使用注意:

产品使用 NaN_3 作为防腐剂。 NaN_3 与许多重金属反应形成爆炸化合物, 当泄漏时, 请使用大量水处理。

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品, 或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联系我们, 或访问我们网站 www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术(北京)有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

v201908Da

Glycopeptidase F-Protocol

<试剂和设备 (未提供) >

- 2-mercaptoethanol (2-ME 巯基乙醇)
- 灭菌水
- 移液枪、微量 tube、微型离心机、加热器、水浴槽、SDS-PAGE 装置

操作步骤:

1. 根据图 1 消化 Control Glycoprotein (D)和样品。(使用灭菌水代替 GPF 做相同的反应作为负对照)
2. 通过 SDS-PAGE 分析反应混合液, 每 1 个分子胎球蛋白(对照糖蛋白)结合 3 个 N-Glycan, 当被脱糖基化时, SDS-PAGE 显示条带发生变化, 因为胎球蛋白除了结合 3 个 3N-Glycan 外, 还结合 3 或 4 个 O-Glycan, 所以 SDS-PAGE 上显示的分子量比实际分子量要大。

1)变性条件

准备 2.5 μ l 样品 (糖蛋白, 约 25 μ g)

- 加入含有 0.2 M 2-ME 的 Denature Buffer (A) 2.5 μ l
- 100°C, 3 min
- 加入 Stabilizer Solution (C): 5 μ l
- 混合均匀
- 加入灭菌水: 13 μ l
- 混合均匀
- 加入 Glycopeptidase F: 2 μ l (1 mU)
- 混合均匀
- 37°C, 15-20 小时

SDS-PAGE 分析 (10%丙烯酰胺胶)

2)非变性条件

准备 2.5 μ l 样品 (糖蛋白, 约 25 μ g)

- 加入 Native Buffer (B) 2.5 μ l
- 加入 Glycopeptidase F: 20 μ l (10 mU)
- 混合均匀
- 37°C, 15-40 小时

SDS-PAGE 分析 (10% 丙烯酰胺胶)

应用实验: (使用本体酶实验)

在变性和非变性条件下, GPF 都能将糖蛋白(人 α 1-AGP, 牛胎球蛋白, 鸡卵清蛋白, 人转铁蛋白, 人免疫球蛋白 G; 表 1)和人血浆切断。通过 10% SDS-PAGE 分析糖链的切除效果。

表 1

糖蛋白	来源	分子量	N-Glycan 数量
α 1-AGP	人	44,100	5
Fetuin	牛	48,400	3
Ovalbumin	鸡	45,000	1
Transferrin	人	75,000	2
IgG	人	150,000 (H 链, 50,000)	2(1/mol H 链)

结果:

在变性条件下, 当 25 μ g 的糖蛋白与 1 mU 的 GPF 反应 17 小时, N-Glycan 能从糖蛋白中完全去除(图 1: lane2, 6, 10, 14, 17)。另一方面, 在非变性条件下, 对不同种糖蛋白的切断效率明显不同。在 10 mU GPF 作用 17 小时条件下, Transferrin 和 IgG 能被完全切断(图 1: lane15, 18), 而 α 1-AGP、Fetuin 和 Ovalbumin 不能被完全切断(图 1: lane3, 7, 11)。即使延长反应时间也没有改善切断效果。

无论在变性条件下还是在非变性条件下, 人血浆都能被完全切断(图 1: lane20, 21, 22)。除了相当于 Transferrin 和 IgG 条带外, 其他条带都明显被去除了。

参考文献

- 1) Barsomian G D, Johnson T L, Borowski M, Denman J, Ollington J F, Hirani S, McNeilly D S, and Rasmussen J R. *J Biol Chem*. (1990) **265**: 6967-6972.
- 2) Tarentino A L and Plummer Jr T H. *Methods Enzymol*. (1994) **230**: 44-57.
- 3) Tretter V, Altmann F, and Marz L. *Eur J Biochem*. (1991) **199**: 647-652.
- 4) Maley F, Trimble R B, Tarentino A L, and Plummer Jr T H. *Anal Biochem*. (1989) **180**: 195-204.
- 5) Tarentino A L, Gomez C M, and Plummer Jr T H. *Biochemistry*. (1985) **24**: 4665-4671.
- 6) Plummer Jr T H, Elder J H, Alexander S, Phelan A W, and Tarentino A L. *J Biol Chem* (1984) **259**: 10700-10704.
- 7) Rasmussen J and Davis J. *J Am Chem Soc*. (1992) **114**: 1124-1126.
- 8) Green E D, Adelt G, Baenziger J U, Wilson S, and Van Halbeek H. *J Biol Chem*. (1988) **263**: 18253-18268.

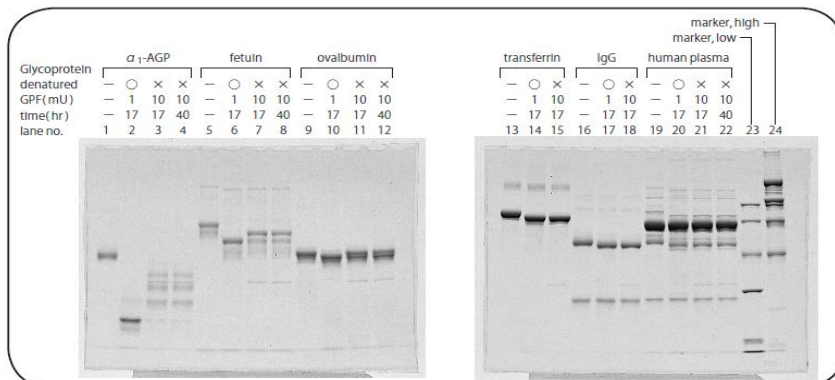


图 1 结果

v201908Da