

Lacto-*N*-biosidase

from *Streptomyces* sp.142

Code No. 4456

包装量: 100 μ U

酶的保存温度由4°C更改为-20°C, 从Lot No. N106AB开始。

制品说明:

Lactose-*N*-biosidase 特异性作用 I 型结构的糖链, 从糖链的非还原末端释放 Lacto-*N*-biose (Gal β 1-3GlcNAc), 不能作用于 II 型结构的糖链, 可以用于判定糖蛋白或糖脂质上的糖链是 I 型还是 II 型。与 α -1,3/4-L-Fucosidase (Code No. 4453) 一起使用, 可以区别 Lewis^a 结构和 Lewis^x 结构。本制品可以用于分析糖蛋白或糖脂质的结构和功能, 1 个包装的酶 (100 μ l) 酶切 10 pmol 的糖链, 可以反应 50-100 次。

起源:

Streptomyces sp. 142

贮存溶液:

50 mM CH₃COONa pH5.5, 0.05% Brij-58

保存:

-20°C

浓度:

1 μ U/ μ l

反应:

特异性水解带有 I 型糖链 (Gal β 1-3GlcNAc) 的寡糖生成 lactose-*N*-biose (Gal β 1-3GlcNAc)。

活性定义:

在 37°C, pH5.5 条件下, 1 分钟水解 1 μ mol 的 PA-lacto-*N*-tetraose 所需要的酶量定义为 1 个活性单位(U)。

活性分析:

本酶同 2 μ M PA-lacto-*N*-tetraose (PA-Sugar Chain 042, Code No. 4142) 在 40 mM CH₃COONa pH5.5 体系下, 37°C 反应 20 分钟, 1% TFA 终止反应, HPLC 分析, 通过 PA-lactose (PA-Sugar Chain 026, Code No. 4126) 的生成量计算酶活性。

纯度:

Protease 污染:

10 μ l Lacto-*N*-biosidase 同 0.4 mM oxidized insulin B chain 在 200 mM CH₃COONa pH5.5 的 10 μ l 体系中, 37°C 反应 16 小时, 没有检测到蛋白分解酶活性。

Endoglycosidase 和 Exoglycosidase 污染:

- 1) p-NP-glycoside: 25 μ l Lacto-*N*-biosidase 同 1.1 mM p-nitrophenyl glycoside 在 40 mM CH₃COONa pH4.5 的 225 μ l 体系中, 37°C 反应 16 小时, 加入 250 μ l 1 M Na₂CO₃ 停止反应, 405 nm 检测, 检测极限 1 μ U/ml。
- 2) PA-Sugar Chain: 2 μ l Lacto-*N*-biosidase 同 2 μ M PA-Sugar Chain 在 40 mM CH₃COONa pH5.5 的 8 μ l 体系中, 37°C 反应 16 小时, 加入 2 μ l 1% TFA 终止反应, HPLC 检测, 检测极限 0.1 μ U/ml。

活性污染	p-NP-glycoside	PA-Sugar Chain
α -Fucosidase	<0.005%	<0.01%
α -Galactosidase	<0.02%	ND
β -Galactosidase	ND	ND
α -Glucosidase	NT	ND
β -Glucosidase	<0.005%	<0.015%
β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase	<0.5%	ND
α - <i>N</i> -Acetylgalactosaminidase	NT	ND
α -Mannosidase	ND	ND
β -Mannosidase	<0.005	NT
Sialidase	NT	ND
Endo- β - <i>N</i> -acetylglucosaminidase	NT	ND

ND: 没有检测到; NT: 没有做检测

特性:

分子量: 60,000 (SDS-PAGE)

稳定剂: 非离子去污剂 (Brij58, NP-40), 牛血清蛋白 (BSA)

抑制剂: Hg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, lacto-*N*-biose

最适 pH: pH5.5 (柠檬酸钠缓冲液、磷酸钠缓冲液)

底物: PA-lacto-*N*-tetraose

pH 稳定性: pH4.0-10.0 (4°C, 16 小时)

米氏常数: Km = 6.80 μ M

(PA-lacto-*N*-tetraose: PA-Sugar 042, Code No. 4142)

Km = 38.9 μ M

(PA-Sugar 003, Code No. 4103)

参考文献

- 1) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *Proc Natl Acad Sc USA*. (1992) **89**: 8512-8516.
- 2) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem*. (1993) **268**: 18560-18566.
- 3) Takasaki S and Kobata A. *Biochemistry*. (1986) **25**: 5709-5715.
- 4) Townsend R R, Hardy M R, Wong T C, and Lee Y C. *Biochemistry*. (1986) **25**: 5716-5725.
- 5) Stroud M R, Levery S B, Nudelman E D, Salyan M E K, Towell J A, Roberts C E, Watanabe M, and Hakomori S. *J Biol Chem*. (1991) **266**: 8439-8446.
- 6) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem*. (1992) **267**: 1522-1527.

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, 请联络我们, 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。

v201902Da

Lacto-*N*-biosidase

from *Streptomyces* sp. 142

Lacto-*N*-biosidase 的底物特异性

Substrate	Relative activity (%)
Gla β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA (PA-Sugar Chain 042)	100
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA (PA-Sugar Chain 041)	0
Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA (PA-Sugar Chain 043)	0
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1- ⁴ (PA-Sugar Chain 044)	0
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA Fuc α 1- ³ (PA-Sugar Chain 045)	0
Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1- ⁶ Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA Gal β 1-3GlcNAc β 1- ⁴ Man α 1- ³ Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA Gal β 1-4GlcNAc β 1- ² (PA-Sugar Chain 003)	0
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA 0	0

PA: Pyridylamino (基团)

根据 Kondo *et al*法, PA-Sugar chain 被衍生。

应用 1: Lacto-*N*-biosidase 对脱唾液酸的牛胎球蛋白的消化

牛胎球蛋白是从牛胎血清中提取出的糖蛋白 (MW48,000), 既有 *N*-连接型糖链也有 *O*-连接型糖链。据报道, *N*-连接型糖链是二糖或三糖型糖链, 在非还原末端同唾液酸结合。20%~30%的三糖链在非还原末端有 I 型结构。从胎球蛋白上去除唾液酸获得脱唾液酸胎球蛋白, 再用 Lacto-*N*-biosidase 处理获得的糖链结构, HPLC 进行分析。

[实验操作]

Lacto-*N*-biosidase 和 100 pmol asialofetuin 在 40 mM CH₃COONa pH5.5 的 10 μ l 体系中, 37°C 反应 2 小时, 然后 100°C 加热终止反应, 溶液蒸干, 加入 2.5 mU Glycopeptidase F(Code No. 4450) 在 40 mM 磷酸钠 pH8.5 的 10 μ l 体系中, 37°C 反应 2 小时, 去除 *N*-糖苷, 100°C 加热终止反应, 将溶液冻干, HPLC 检测释放出的 *N*-连接型糖链。分别使用 PALPAK Type N (已终卖) 和 PALPAK Type R (已终卖) 进行分析。

[结果]

在 Lacto-*N*-biosidase 的作用下, 脱唾液酸胎球蛋白的糖链结构被改变。从 PALPAK Type R 的分析结果来看, 没有处理过的脱唾液酸中的 PA-Sugar Chain 001.002.003 的比率是 1:6:3, 而处理过的脱唾液酸中的 PA-Sugar Chain 001.002.003 的比率是 3:6:1。结果显示, 带有 I 型糖链的三糖链很少不被改变成二糖链。

应用 2: Lacto-*N*-biosidase 对 Le^a/Le^a 糖脂的消化

Le^a/Le^a 糖脂是一种标记系列的糖脂, 它的结构中包含重复的 I 型糖链。神经酰胺内切酶 (EGCase) 能作用这种糖脂并释放糖链, 使用 GlycoTAG 对糖链进行 PA 化标记。PA-Sugar Chain 在 α -1,3/4-L-Fucosidase (Code No. 4453) 和 Lacto-*N*-biosidase 的作用下, 得到的产物使用 PALPAK Type N 进行 HPLC 检测。

[实验操作]

所有的反应都是在 30 mM CH₃COONa pH5.5 体系中, 37°C 反应 30 分钟, 每个反应的酶添加量是 0.05 μ U/pmol (α -1,3/4-L-Fucosidase/糖链)或 0.05 μ U/pmol (Lacto-*N*-biosidase/糖链)。

- 1) α -1,3/4-L-Fucosidase 作用于 PA-Le^a/Le^a, 100°C 加热终止反应, 取 10 pmol 用于 HPLC 检测。
- 2) 将 Lacto-*N*-biosidase 加入 1) 溶液中继续反应, 100°C 加热终止反应, 取 10 pmol 用于 HPLC 检测。
- 3) 将 α -1,3/4-L-Fucosidase 加入 2) 溶液中继续反应, 100°C 加热终止反应, 取 10 pmol 用于 HPLC 检测。
- 4) 将 Lacto-*N*-biosidase 加入 3) 溶液中继续反应, 100°C 加热终止反应, 取 10 pmol 用于 HPLC 检测。

[结果]

HPLC 分析结果表明在 α -1,3/4-L-Fucosidase 和 Lacto-*N*-biosidase 的作用下, PA-Le^a/Le^a 被连续消化。

