

# PNGase F Fly (Glycerol-free) 肽N-糖苷酶F (快速版无甘油)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: LG101

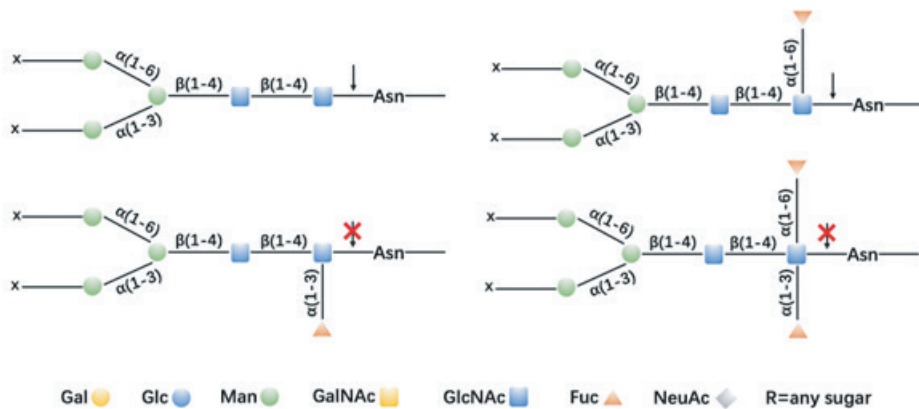
版本号: Version 1.0

保存: -18°C及其以下温度下保存两年。冻融次数不超过5次, 建议首次解冻后小剂量分装保存。

## 产品说明

PNGase F (肽N-糖苷酶F) 是一种来源于米尔伊丽莎白菌 (*Elizabethkingia miricola*), 经基因工程改造并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达的酰胺酶。该酶是去除糖蛋白中几乎所有N-连接糖链的最有效的酶促法, 在糖蛋白研究中发挥重要作用。PNGase F可切割糖蛋白上的N-连接糖链, 可切割的糖型有: 高甘露糖型、杂合型和复杂型寡糖。切割位点为: 糖链最内侧的N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和天冬酰胺残基之间的糖苷键。在抗体糖基化研究中, 尽可能短时间内获得准确的N-糖链分布至关重要。通常使用普通版PNGase F水解释放抗体N-糖链需要几个小时的孵育时间, 然后进行液相色谱或质谱分析。肽N-糖苷酶F (快速版) 是一种改进版的试剂, 可以在几分钟内完成抗体的快速去糖基化。所有的N-糖链都能快速无偏好地释放出来, 进而可快速地确定糖基化抗体的糖型。本产品PNGase F (快速版) 的储存液中不含甘油, 有助于在下游HPLC和质谱分析中获得最佳结果。

## PNGase F作用原理图



当最内侧的GlcNAc残基与 $\alpha$ 1-6岩藻糖残基连接时, PNGase F可切割糖蛋白的N-连接糖链。当最内侧的GlcNAc残基与 $\alpha$ 1-3岩藻糖残基连接时, PNGase F不能切割糖蛋白的N-连接糖链 (这种修饰常见于植物和一些昆虫糖蛋白)。

## 产品组成

Component	LG101-01 (50 rxns)
PNGase F Fly (Glycerol-free)	50 $\mu$ l
5 $\times$ PNGase F Fly Buffer	200 $\mu$ l

## 酶储存缓冲液

20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH7.5 @25°C



## 使用方法

### 一、一步法操作步骤

1. 用去离子水溶解100  $\mu\text{g}$ 抗体或糖蛋白，加入去离子水补足至16  $\mu\text{l}$ ；
2. 加入4  $\mu\text{l}$ 的5 $\times$ PNGase F Fly Buffer，总体积至20  $\mu\text{l}$ ，轻轻吹打混匀；
3. 加入1  $\mu\text{l}$ 的PNGase F Fly (Glycerol-free)，轻轻吹打混匀；
4. 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min；
5. 后续可进行SDS-PAGE等常规分析，也可以根据需要对N-聚糖进行衍生（如还原性胺化）用于下游分析。若后续用于质谱分析，需要使用透析或超滤交换缓冲液。

### 二、两步法操作步骤：

有些抗体（如Fab N-聚糖）需要进行预加热步骤实现有效的去糖基化。

1. 用去离子水溶解100  $\mu\text{g}$ 抗体或糖蛋白，加入去离子水补足至16  $\mu\text{l}$ ；
2. 加入4  $\mu\text{l}$ 的5 $\times$ PNGase F Fly Buffer，总体积至20  $\mu\text{l}$ ，轻轻吹打混匀；
3. 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 min后在冰上冷却；
4. 加入1  $\mu\text{l}$ 的PNGase F Fly (Glycerol-free)，轻轻吹打混匀；
5. 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min；
6. 后续可进行SDS-PAGE等常规分析，也可以根据需要对N-聚糖进行衍生（如还原性胺化）用于下游分析。若后续用于质谱分析，需要使用透析或超滤交换缓冲液。

## 注意事项

- 使用前确保PNGase F Fly Buffer彻底融化、充分混匀。
- 孵育前确保PNGase F Fly Buffer、抗体或糖蛋白和PNGase F Fly (Glycerol-free)混合均匀。
- 根据需要，反应体系可等比放大或缩小，按比例调整PNGase F Fly (Glycerol-free)的用量。调整组分比例会影响酶切效果（如更大的反应体系中仍加入1  $\mu\text{l}$ 酶）。
- 通常50 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3-5分钟即完成反应，超过15 min及更长的孵育时间不会提升去糖基化效果。若仍未完全反应，可尝试两步法（即加入80 $^{\circ}\text{C}$ 预变性步骤）。

## 适用范围

1. 蛋白质组学研究  
研究糖基化对蛋白质功能、稳定性或相互作用的影响。  
质谱分析前去除糖链，简化蛋白质结构，提高鉴定准确性。
2. 生物制药（如抗体药物）  
分析单克隆抗体（如IgG）的糖型，评估糖基化对药物效应的影响。  
质量控制中检测糖基化异质性。
3. 糖工程与重组蛋白生产  
验证糖基化位点或制备无糖基化蛋白对照。
4. 疾病研究  
分析癌症、免疫疾病等异常糖基化标志物。

## 常见问题&解决方案

1. PNGase F Fly和PNGase F之间的区别是什么？

PNGase F Fly可以在几分钟内实现对抗体和糖蛋白的去糖基化。该酶反应流程方便、反应时间快速，这使其可以在治疗性单克隆抗体的开发和质量控制方面实现高通量的应用。



2. 该如何选择使用“一步法”还是“两步法”操作流程？

PNGase F Fly (Glycerol-free)可以实现50°C条件下使用一步法对抗体有效、快速的去糖基化。但是有些IgG（如携带Fab糖基化）需要80°C下2 min的预变性。我们推荐先尝试一步法操作流程，如有证据表明N-糖链仍未去除（如凝胶迁移或组学研究），接下来尝试两步法操作流程。

3. 如何判断PNGase F Fly (Glycerol-free)在10分钟内反应完成？

对单克隆抗体而言，去除N-糖链后可观察到SDS-PAGE的条带迁移。通常，需要在同一块SDS-PAGE胶上对比对照和实际样品的条带位置，判断是部分还是完全去糖基化。若需要检测是否还存在少量的糖基化抗体，需要更灵敏的方法。例如，使用LS-ESI-TOF可呈现不同糖基化和非糖基化形式。

项目	标准
产品外观	无色透明
分子量	36 kDa
等电点	7.64
纯度	≥95% (SDS-PAGE)
糖苷外切酶	未检出
糖苷内切酶F1	未检出
糖苷内切酶F2	未检出
糖苷内切酶F3	未检出
糖苷内切酶H	未检出
蛋白酶	未检出

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202512

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

