

# PNGase F (Glycerol-free) 肽N-糖苷酶F (无甘油)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: LG103

版本号: Version 1.0

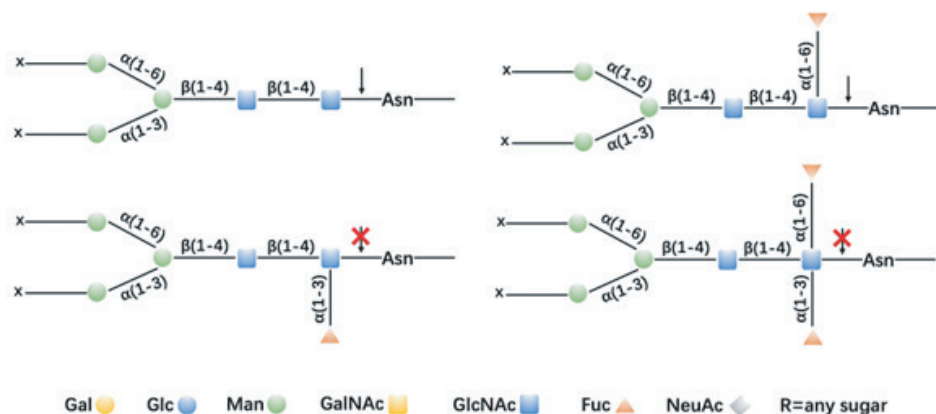
保存: -18°C及其以下温度下保存两年。冻融次数不超过5次, 建议首次解冻后小剂量分装保存。

浓度: 500 units/ $\mu$ l

## 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。可用于抗体或其它糖蛋白的体外去除N-糖基化修饰的反应。本产品PNGase F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	LG103-01	LG103-02
PNGase F (Glycerol-free)	25000 units	75000 units
Denaturing Buffer (10 $\times$ )	1 ml	1 ml
10 $\times$ PNGase F Reaction Buffer	1 ml	1 ml
10% NP-40	1 ml	1 ml

## 活性定义

在下述反应条件下, 10  $\mu$ l反应体系中, 37°C反应1小时从10  $\mu$ g变性RNase B中去除超过95%的糖链所需的酶量。

## 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、变性反应条件

1. 用去离子水溶解1-20  $\mu\text{g}$ 的糖蛋白，加入1  $\mu\text{l}$  Denaturing Buffer (10 $\times$ )，用去离子水补足至10  $\mu\text{l}$ ；
2. 100 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min使糖蛋白变性；
3. 在冰上冷却糖蛋白并离心10 sec；
4. 加入2  $\mu\text{l}$  10 $\times$  PNGase F Reaction Buffer，2  $\mu\text{l}$  10% NP-40和6  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O，总体积为20  $\mu\text{l}$ ，轻轻吹打混匀（注意：SDS会抑制PNGase F的活性，因此在变性条件下反应体系中必须加入NP-40，不加入NP-40会导致酶活损失）；
5. 加入1  $\mu\text{l}$  PNGase F (Glycerol-free)，轻轻吹打混匀；
6. 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时；
7. 用于下游SDS-PAGE分析。

### 二、非变性反应条件：

对非变性糖蛋白进行去糖基化时，推荐同时取一份样品按照变性条件的流程进行切割，作为完全去糖基化的阳性对照，以确定非变性条件下反应的完全程度。

1. 去离子水溶解1-20  $\mu\text{g}$ 的糖蛋白，加入2  $\mu\text{l}$  10 $\times$  PNGase F Reaction Buffer，去离子水补足至20  $\mu\text{l}$ ；
2. 加入2-5  $\mu\text{l}$  PNGase F (Glycerol-free)，轻轻吹打混匀；
3. 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4-24小时；  
（注意：对非变性糖蛋白的去糖基化，需要增加酶用量和延长孵育时间）
4. 用于下游SDS-PAGE分析。

## 注意事项

- 使用前确保Denaturing Buffer (10 $\times$ )，10 $\times$  PNGase F Reaction Buffer，10% NP-40均彻底融化、充分混匀。
- 若反应不完全，可增加酶量、延长反应时间或添加变性剂（如SDS）。

## 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去除糖链后，天冬酰胺发生了什么变化？

该酶是一种糖苷酶，去除糖链后，天冬酰胺会转化为天冬氨酸。

### 2. PNGase F，Endo H和O-糖苷酶之间有什么区别？

PNGase F可以去除几乎所有N-连接（Asn连接）的糖基化，高甘露糖型、杂合型、复杂型寡糖等，若目标是去除所有N-连接的糖链（不考虑类型），可以选择PNGase F。Endo H只能去除高甘露糖和一些N-连接的杂合糖链，可以选择该酶来确定N-连接的糖基化类型，或如果确定蛋白有对Endo H敏感的糖链。O-糖苷酶只能从糖蛋白上释放Ser或Thr残基连接的 $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -GalNAc（核心1型O-聚糖）。



3. 该PNGase F (Glycerol-free)是否与下游分析（如HPLC或质谱）兼容？

若下游需要进行HPLC或质谱分析，推荐使用该无甘油版本。Denaturing Buffer (10×)中含有SDS和DTT，也与下游HPCL和质谱不兼容，因此通常需要从反应体系中去掉。因此我们推荐使用该无甘油版本在非变性条件下反应用于下游分析。非变性条件需要更多的酶量和更长的反应时间。

4. 当在非变性条件或DTT变性条件下去除糖链时，需要加入多少PNGase F (Glycerol-free)？

当底物不使用SDS进行变性时，PNGase F (Glycerol-free)更难以接触到糖链切割位点（由于蛋白二级或四级结构的存在）。这时需要增加酶用量和延长反应时间，不同的蛋白需要根据经验摸索合适的酶用量和反应时间。

质量控制

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)
酶活	≥500 units/μl
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

