

PNGase F (with His-tag)

REF: EG23303-S/M

储运条件

-20℃

产品组成

组分	规格 S	规格 M
PNGase F (500 U/μl)	30 μl	150 μl
10× Denaturing Buffer	150 μl	750 μl
10× PNGase F Buffer	200 μl	1 ml
10% NP-40	200 μl	1 ml

产品简介

PNGase F (肽 N-糖苷酶 F) 来源于 *Elizabethkingia miricola*, 是一种高效的酰胺水解酶, 可以裂解由天冬酰胺连接的高甘露糖、杂合和复杂的寡糖糖蛋白。PNGase F 的切割位点为糖蛋白内侧 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和天冬酰胺残基之间的酰胺键, 同时将酶解后蛋白上的天冬氨酰转化为天冬氨酸。

本产品通过大肠杆菌重组表达, 带有 His 标签, 含有 50% 甘油, 常应用于抗体及其相关蛋白去糖基化。本品既可以在 37℃ 下按照常规程序进行反应, 也可以在 50℃ 下快速完成去糖基化。

酶活单位定义

1 个酶活力单位 (U) 指在 10 μl 反应体系中, 37℃ 下反应 1 h 从 10 μg 变性 RNase B 中除去超过 95% 碳水化合物所需要的酶量。

失活条件

75℃ 温育 10 min。

质量控制

蛋白纯度检测

使用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白纯度不低于 95%。

糖苷酶与蛋白酶活性检测

无可检出的内切糖苷酶 F1、F2 或 F3 活性; 无可检出的蛋白酶活性。

使用方法

1. 变性条件下去糖基化

(1) 常规步骤

① 将 1~20 μg 糖蛋白, 1 μl 10× Denaturing Buffer 和 ddH₂O (如有必要) 混合至总体积 10 μl;

注: 10× Denaturing Buffer 在低温储存时可能出现白色沉淀, 使用前可先在 37℃ 下温育使其溶解。

② 100℃ 反应 10 min 使糖蛋白变性后, 冰上冷却, 离心 10 s;

③ 加入 2 μl 10× PNGase F Buffer, 2 μl 10% NP-40, 补充 ddH₂O 使总反应体积为 20 μl;

④ 加入 1~2 μl PNGase F, 轻轻混匀, 37℃ 孵育 1~3 h。

(2) 快速步骤

① 将 1~20 μg 糖蛋白, 1 μl 10× Denaturing Buffer 和 ddH₂O (如有必要) 混合至总体积 10 μl;

注: 10× Denaturing Buffer 在低温储存时可能出现白色沉淀, 使用前可先在 37℃ 下温育使其溶解。

② 80℃ 反应 2 min 使糖蛋白变性后, 冰上冷却, 离心 10 s;

③ 加入 2 μl 10× PNGase F Buffer, 2 μl 10% NP-40, 补充 ddH₂O 使总反应体积为 20 μl;

④ 加入 1 μl PNGase F, 轻轻混匀, 50℃ 孵育 10 min。

2. 非变性条件下去糖基化

(1) 常规步骤

① 将 1~20 μg 糖蛋白, 2 μl 10× PNGase F Buffer 和 ddH₂O (如有必要) 混合至总体积 20 μl;

② 加入 2~5 μl PNGase F, 轻轻混匀;

③ 37℃ 孵育 4~24 h。

(2) 快速步骤

① 将 1~20 μg 糖蛋白, 2 μl 10× PNGase F Buffer 和 ddH₂O (如有必要) 混合至总体积 20 μl;

② 加入 1 μl PNGase F, 轻轻混匀;

③ 50℃ 孵育 10 min。

PNGase F 的去除

本产品带有 His 标签, 反应后可选择与目标糖蛋白不同的标签, 通过亲和层析将 PNGase F 去除。