

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	P80076
产品名称:	糖基肽酶 F 无甘油, 500U/μL

产品简介:

本产品来源于和平空间站伊丽莎白菌, 采用 E. coli 重组表达, 可以选择性水解蛋白质的 Asn 相连的除含 α 1-3 岩藻糖苷键外所有的 N-糖链, 切割位点为 Asn 和最内侧的 GlcNAc 之间的糖苷键, 使得糖蛋白释放以天冬酰胺连接的糖分子, 并使得天冬酰胺转化为天冬氨酸, 切割的糖型包括高甘露糖、杂合和复杂寡糖。

本产品可用于抗体和糖蛋白的 N-糖基完全去除。

产品组分

组分	组分名称	包装规格 (15KU)	储存
组分 A	PNGase F	30 μl	2-8℃, 避免冷冻。
组分 B	10×糖蛋白变性缓冲液	200 μl	-20℃
组分 C	10×糖苷酶切反应液	200 μl	-20℃
组分 D	10% NP-40	200 μl	2-8℃

酶活定义: 一个单位是指 10 μL 的反应体系中, 37° C 反应 1 小时从 10 μg 变性 RNase B 中除去超过 95% 的碳水化合物所需要的酶量。

储存液: 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM EDTA, pH=7.7。

操作步骤:

一: 变性酶切

方法 A:

用去离子水溶解 10-100 μg 糖蛋白, 加入 1 μl 10×糖蛋白变性缓冲液, 并用去离子水定容至 10 μl。

100° C 孵育 10 min。

转移至冰上, 并离心 10s。

加入 2 μl 10×糖苷酶切反应液, 2 μl 10% NP-40, 1-2 μl PNGase F, 并加去离子水至终体积 20 μl, 混匀。

37° C 孵育 1-3h。

进行酶切效果分析。

方法 B:

用去离子水溶解 10-100 μg 糖蛋白, 加入 1 μl 10×糖蛋白变性缓冲液, 并用去离子水定容至 10 μl。

100° C 孵育 10 min。转移至冰上, 并离心 10s。

加入 2 μl 10×糖苷酶切反应液, 2 μl 10% NP-40, 1-2 μl PNGase F, 并加去离子水至终体积 20 μl, 混匀。

50° C 孵育 10 min。进行酶切效果分析。

如果 50° C 孵育 10min 酶切效果不佳, 可适当延长酶切时间。

二: 非变性酶切

方法 A:

用去离子水溶解 10-100 μg 糖蛋白, 加入 2 μl 10×糖苷酶切反应液, 2-4 μl PNGase F, 并用去离子水定容至 20 μl。

37° C 孵育 2h-过夜。



进行酶切效果分析。

方法 B:

用去离子水溶解 10-100 μ g 糖蛋白，加入 5 μ l 10 $\times$ 糖苷酶切反应液，1-8 μ l PNGase F，并用去离子水定溶至 50 μ l。

50° C 孵育 10min。

进行酶切效果分析。

如果 50° C 孵育 10min 酶切效果不佳，可适当延长酶切时间；对于 50° C 下不稳定的蛋白，可以改在 37° C 下酶切 1-2h。

注意事项:

1: 尽量避免冻融本产品。

2: 变性酶切的效率较高，应首先进行尝试，具体酶切用量和酶切时间应根据预实验确定。如果遇到无法进行变性酶切（例如变性过程中出现沉淀），可尝试非变性酶切，但酶切效率可能会下降，建议增加酶量并延长酶切时间。

3: 糖蛋白变性缓冲液（含 SDS 和 DTT）不适用于高效液相色谱或质谱等实验，其中的成分往往难以从反应体系中彻底去除，需进行脱盐处理后上机。如果想兼容高效液相色谱或质谱，推荐使用非变性条件。

4: 50°C 酶切超过 15min 后不会明显提高酶切效果。

5: 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

储存: 低温运输，按组分储存，36 个月。

