



PNGase F, with His-tag

产品货号: P2303

储存条件: -20°C

产品组成

组分	15000 U	75000 U
PNGase F (500 U/μl)	30 μl	150 μl
10× Denaturing Buffer	150 μl	750 μl
10× PNGase F Buffer	200 μl	1ml
10% NP-40	200 μl	1ml

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酰胺转化为天冬氨酸。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°C下按照常规程序进行反应, 也可以在50°C下快速完成去糖基化。

酶活定义: 1 个酶活力单位 (U) 指在 10 μl 反应体系中, 37°C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°C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. DNA 快速酶切流程

1.1 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°C下温育使其溶解。

- ② 100°C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°C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°C下温育使其溶解。

- ② 80°C 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°C孵育 10 min。

1.2 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°C 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°C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。

