

Glycopeptidase F

(Peptide: *N*-glycosidase F)

Code No. 4450

Size: 25 mU/ vial

Supplied Reagent :

(A) Denature Buffer	500 μ l
(B) Native Buffer	500 μ l
(C) Stabilizer Solution	500 μ l
(D) Control glycoprotein	10 μ l

Common name :

Peptide-*N*⁴- (*N*-acetyl- β -glucosaminyl) asparagine amidase

Enzyme code: 3.5.1.52

Source :

Escherichia coli carrying the plasmid containing Glycopeptidase F gene

Conc.: 500 mU/ ml

Form :

Solution in 20 mM sodium phosphate (pH 7.2), 50 mM EDTA and 0.05% sodium azide.

Substrate specificity :

Specific cleavage of *N*-glycans (GluNAc-Asn bonds) in glycopeptides or glycoproteins. In the case Asn-linked GlcNAc contains α -1,3 fucosidic linkage, this enzyme do not cleavage the *N*-glycan.

Definition of activity :

One unit is the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of dansyl fetuin glycopeptide within 1 minute at 37°C, pH 8.5.

Quality Control Data :

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Properties :

- Molecular weight : approx. 36,500 (SDS-PAGE)

(Note)

Depending on proteolytic activity of host bacteria, the recombinant Glycopeptidase F (GPF) may have 15 or 18 additional amino acid residues at its amino terminal (1). However, its activity on glycoproteins was confirmed to be identical to that of native GPF, by the experiments using RNase B and Fetuin as its substrates.

- Optimum pH : pH 8.6

Storage: -20°C

Once thawed, this product should be stored at 4 °C.
Avoid freeze-thaw cycles.

Protocol :

There are 2 ways of De-*N*-glycosylation of Glycoprotein by GPF, native condition and denature condition. Please choose the either native or denature condition that is suited to the purpose of each experiment.

Supplied Reagents :

(A) Denature Buffer	: 1% SDS/1 M Tris-HCl (pH 8.6)
(B) Native Buffer	: 1 M Tris-HCl (pH 8.6)
(C) Stabilizer Solution	: 5% NP-40
(D) Control glycoprotein	: 10 mg/ml Bovine fetuin

Sample :

The buffer concentration of samples should be lower than 50 mM. If it is higher than 50 mM, change the buffer concentration less than 50 mM by appropriate method (ex. dialysis) or adjust pH to nearly 8.6 (optimum pH of GPF) by addition of acid or alkaline. It is recommended to check pH when adding sample into buffer to make sure.

Samples should not contain citrate buffer and urea.

Reaction Condition :

GPF is useful for 3 purposes ; **1.** to check whether the protein sample has *N*-Glycan or not, **2.** to examine the effect of removing *N*-Glycan from protein sample for its activity, and **3.** to remove *N*-Glycan from protein sample and analyze the structure of sugar chain. The reaction condition should be chosen suited for each purpose.

For purpose 1:

Use 1 mU of GPF per 25 μ g of glycoprotein and incubate overnight under denature condition.

For purpose 2:

Incubate under native condition. Under native condition, the cleavage efficiency depends on the kind of glycoprotein. At first, try to use 10 mU of GPF and incubate overnight. If not cleaved, add GPF further and incubate overnight.

For purpose 3:

Under denature condition, sugar chain is completely removed and it costs the small amount of GPF, but it is necessary to remove detergent. If avoid removing detergent, perform the reaction under native condition while checking the cleavage.

When the amount of glycoprotein is small, the amount of the enzyme may be decreased, but it is not recommended to decrease the amount of GPF less than 0.5 mU per 1 reaction (25 μ l).

SDS - PAGE :

For Coomassie staining, the cleavage can be detected when 1 - 5 μ g of the sample is loaded per lane. For silver staining, the cleavage can be detected when 10 - 50 ng of the sample is loaded per lane.

Choose the appropriate concentration of acrylamide gel for the molecular weight of glycoprotein sample. 10% acrylamide gel is appropriate for control glycoprotein, fetuin. If the content of *N*-Glycan of glycoprotein is less than 5%, it may be necessary to extend the electrophoresis time, as it is difficult to detect the change of molecular weight by the cleavage of sugar chain.

Note :

This product contains sodium azide as preservative. Sodium azide reacts with many heavy metals to form explosive compounds. It is critical that a large amount of water be used when disposing.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takara-bio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

Glycopeptidase F

(Peptide: *N*-glycosidase F)

Code No. 4450

容量： 25 mU/ vial

添付試薬：

(A) Denature Buffer	500 μ l
(B) Native Buffer	500 μ l
(C) Stabilizer Solution	500 μ l
(D) Control glycoprotein	10 μ l

● **酵素名** Peptide-^N- (*N*-acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase

● **酵素番号** 3.5.1.52

● **由来**
Escherichia coli carrying the plasmid containing Glycopeptidase F gene

● **濃度** 500 mU/ ml

● **形状** 溶液品
組成；50 mM EDTA および 0.05% アジ化ナトリウムを含む
20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2)

● **基質特異性**
N-グリコシド型糖鎖とタンパク質との結合部位 (GlcNAc-Asn 結合) を特異的に切断する。ただし、Asn に結合している GlcNAc に Fuc α 1-3 が結合している糖鎖には作用しない。

● **活性の定義**
37°C、pH8.5 において、フェツイン由来のダンシル化糖ペプチドから 1 時間に 1 μ mol の糖鎖を遊離させる酵素活性を 1 U とする。

● **品質管理データ**
性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

● **一般的性質**
分子量 約 36,500 (SDS-PAGE)
注) ホスト菌のアミノ末端の Cleavage site の違いにより、組換え体は Native 体に比べ 15 あるいは 18 アミノ酸分長いとされている (文献 1)。組換え体酵素の糖蛋白質に対する作用は、Native 体と同じであることを、RNase B および Fetuin を用いた実験で確認している。

至適 pH pH8.6

● **保存** - 20°C
ただし融解後は 4°C で保存してください。
(凍結融解を繰り返さない)

● **使用方法**
Glycopeptidase F (GPF) による糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-Glycan) の遊離の条件には変性条件と非変性条件との 2 通りがある。本製品には変性、非変性条件の両方の Buffer が添付されているのでそれぞれの実験目的に合った条件を選択する。

● **添付試薬について**
(A) Denature Buffer : 1% SDS/1 M Tris-HCl (pH8.6)
(B) Native Buffer : 1 M Tris-HCl (pH8.6)
(C) Stabilizer Solution : 5% NP-40
(D) Control glycoprotein : 10 mg/ml Bovine fetuin

● **サンプルについて**
・ サンプルの緩衝液の濃度は低い方が望ましい。
・ 50 mM 以上の緩衝液に溶解している場合には透析等によって低い濃度の緩衝液に置換するか、あるいは酸、アルカリの添加によって GPF の至適 pH8.6 付近にしておく。
・ サンプル溶液に buffer を加えた時点で念のために pH 試験紙で pH をチェックしておくことよい。
・ クエン酸緩衝液や urea を含んだサンプルは避ける。

● **酵素量および反応条件**
GPF には主に、1. タンパク質が *N*-glycan をもつことを証明する、2. 糖タンパク質から *N*-glycan を除去して活性などに対する影響を調べる、3. 糖タンパク質から *N*-glycan を切り出して糖鎖構造を解析する、の 3 つの目的に使用できる。それぞれの目的によって反応条件を選択する必要がある。

[1.の場合]
変性条件で糖タンパク質 25 μ g あたり 1 mU の GPF を用いて一晚反応を行う。

[2.の場合]
非変性条件で反応を行う。非変性条件ではタンパク質によって切れ易さが大きく異なるため、とりあえずは 10 mU の GPF を用いて一晚反応させ、切れていなければさらに酵素を添加してさらに一晚反応させるのが適当である。

[3.の場合]
変性条件の方が糖鎖を完全に遊離でき、酵素の使用量も少量ですむが、界面活性剤を除去する必要がある。それを避けるなら、非変性条件で様子を見ながら反応を行う。また、糖タンパク質量が少ない場合、添加酵素量を減らすことが可能だが、1 反応 (25 μ l) あたり 0.5 mU が下限である。

● **SDS-PAGE について**
・ クーマシー染色では 1 レーンあたり 1 ~ 5 μ g、銀染色では 10 ~ 50 ng 程度で検出できる。
・ ゲルは、各サンプル糖タンパク質の分子量に適切な濃度のものを選択する。なお、コントロール糖タンパク質の fetuin には 10% アクリルアミドゲルが適当である。
・ *N*-glycan の含量が 5% 未満の糖タンパク質では糖鎖遊離による分子量変化がわかりにくいので、泳動時間を長くするなどの工夫が必要な場合がある。

● **使用上の注意**
本製品は防腐剤としてアジ化ナトリウムを含有しています。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性の高い金属アジドを生成することがありますので、廃棄の際は大量の水とともに洗い流してください。

● **注意**
本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

Glycopeptidase F - Protocol

< Reagents and Equipments (not provided) >

- 2-mercaptoethanol
- Purified water
- Pippette, microcentrifuge tubes, microcentrifuge, heat block or water bath, apparatus for SDS-PAGE

Procedure :

1. Digest Control glycoprotein (D) and samples according to the following flow chart. (Use purified water instead of GPF and perform the same reaction as Negative control.)
2. Analyze the reaction mixture by SDS-PAGE. Fetuin [Control glycoprotein] binds to 3 *N*-Glycan per 1 molecule, so when it is deglycosylated, the band is shifted by SDS-PAGE. (Since fetuin binds to 3 or 4 *O*-glycan in addition to 3 *N*-Glycan, the apparent molecular weight becomes higher than accurate molecular weight.

1) Denature Condition

- Prepare 2.5 μ l of sample (glycoprotein, about 25 μ g) or (D)
- 2.5 μ l of Denature Buffer (A) with 0.2 M 2-mercaptoethanol
 - heat at 100°C for 3 min
 - add 5 μ l of Stabilizer Solution (C)
 - mix
 - add 13 μ l of purified water
 - mix
 - add 2 μ l (1 mU) of Glycopeptidase F
 - mix
 - incubate at 37°C for 15 - 20 hours
- Analyze for SDS-PAGE (10% acrylamide gel)

2) Native Condition

- Prepare 2.5 μ l of sample (glycoprotein, about 25 μ g) or (D)
- 2.5 μ l of Native Buffer (B)
 - add 20 μ l (10 mU) of Glycopeptidase F
 - mix
 - incubate at 37°C for 15 - 40 hours
- Analyze for SDS-PAGE (10% acrylamide gel)

Application : (Experiment with the native enzyme)

Glycoprotein (human α 1-AGP, bovine fetuin, hen ovalbumin, human transferrin, human IgG ; Table 1) and human plasma were cleaved by GPF both under denature and native condition, and analyzed the removal of sugar chain by SDS-PAGE (10% acrylamide gel).

Table 1

Glycoprotein	Source	molecular weight	Number of <i>N</i> -Glycan
α 1-AGP	human	44,100	5
fetuin	bovine	48,400	3
ovalbumin	hen	45,000	1
transferrin	human	75,000	2
IgG	human	150,000 (H chain, 50,000)	2 (1/mol H chain)

Result :

Under denature condition, when 25 μ g of glycoprotein was incubated with 1 mU of GPF for 17 hours, *N*-Glycan was removed from all of glycoprotein completely (Figure 1, lane 2, 6, 10, 14, 17). On the other hand, under native condition, there was a remarkable difference in the cleavage efficiency between the kinds of glycoprotein.

Transferrin and IgG were cleaved completely with 10 mU of GPF for 17 hours (Figure 1, lane 15, 18), but α 1-AGP, fetuin and ovalbumin were not cleaved completely (Figure 1, lane 3, 7, 11). So it is proved that the extension of incubation time more than 17 hours had no effect on the cleavage.

Human plasma was cleaved completely under both denature and native condition (Figure 1, lane 20, 21, 22). It was observed that some bands except the band corresponded to transferrin and IgG were shifted.

References :

- 1) Barsomian G D, Johnson T L, Borowski M, Denman J, Ollington J F, Hirani S, McNeilly D S, and Rasmussen J R. *J Biol Chem.* (1990) **265**: 6967-6972.
- 2) Tarentino A L and Plummer Jr T H. *Methods Enzymol.* (1994) **230**: 44-57.
- 3) Tretter V, Altmann F, and Marz L. *Eur J Biochem.* (1991) **199**: 647-652.
- 4) Maley F, Trimble R B, Tarentino A L, and Plummer Jr T H. *Anal Biochem.* (1989) **180**: 195-204.
- 5) Tarentino A L, Gomez C M, and Plummer Jr T H. *Biochemistry.* (1985) **24**: 4665-4671.
- 6) Plummer Jr T H, Elder J H, Alexander S, Phelan A W, and Tarentino A L. *J Biol Chem* (1984) **259**: 10700-10704.
- 7) Rasmussen J and Davis J. *J Am Chem Soc.* (1992) **114**: 1124-1126.
- 8) Green E D, Adelt G, Baenziger J U, Wilson S, and Van Halbeek H. *J Biol Chem.* (1988) **263**: 18253-18268.

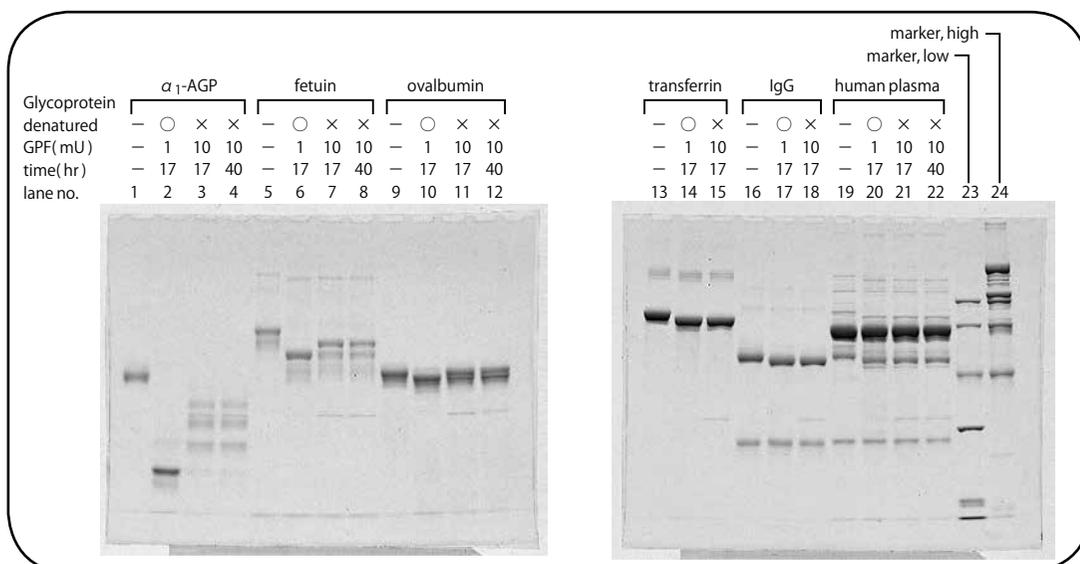


Figure 1. Result

Glycopeptidase F の使用例

■ 実験手順

1. コントロール糖タンパク質溶液と (Control glycoprotein : D) サンプルを下記フローチャートにしたがってそれぞれ処理する (GPF の代わりに純水を加えて同様の処理をしたものを negative control にする)。
2. 反応を SDS-PAGE でチェックする。コントロールの fetuin には *N*-glycan が 1 分子あたり 3 個結合しており、deglycosylate されたければバンドがシフトする。(fetuin には 3 個の *N*-glycan の他に 3、4 個の *O*-glycan が結合しているため、SDS-PAGE での見かけの分子量は、実際の分子量より大きくなる。)

< 本品以外に用意するもの >

- ・ 2-メルカプトエタノール*
- ・ 純水
- ・ 実験器具類 (ピペット、マイクロ遠心チューブ、マイクロ遠心機、ヒートブロックまたは沸騰水浴、SDS-PAGE 器具一式)
- ・ サンプル溶液 (10 mg/ml、のちの SDS-PAGE で検出が可能であればそれ以下でも可)

* : 2-メルカプトエタノールは毒物ですので、取扱い・廃棄にはご注意ください。

■ 実験 (本実験には Native 体を使用しています)

糖タンパク質 (human α_1 -AGP、bovine fetuin、hen ovalbumin、human transferrin、human IgG ; 表 1) およびヒト血漿を変性、非変性の条件でそれぞれ Glycopeptidase F (GPF) によって処理した後、10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により糖鎖の遊離を調べた (図 1)。

表 1. 使用した糖タンパク質

タンパク質	由来	分子量	N-Glycan 数
α_1 -AGP	human	44,100	5
fetuin	bovine	48,400	3
ovalbumin	hen	45,000	1
transferrin	human	75,000	2
IgG	human	150,000 (H chain, 50,000)	2 (1/mol H chain)

■ 結果

変性条件で 25 μ g の糖タンパク質を 1 mU の GPF で 17 時間処理すると、いずれの糖タンパク質からもほぼ完全に糖鎖が遊離した (図 1 レーン 2、6、10、14、17)。一方、非変性条件では糖タンパク質による差異が顕著であった。transferrin および IgG (heavy chain) では、10 mU GPF、17 時間処理ではほぼ完全に糖鎖が遊離したのに対し (図 1 レーン 15、18)、 α_1 -AGP、fetuin および ovalbumin では糖鎖は完全には遊離しなかった (図 1 レーン 3、7、11)。反応時間を 40 時間に延ばしても分解パターンにほとんど変化がないことから (図 1 レーン 4、8、12)、17 時間以上の反応はあまり効果がないことがわかる。ヒト血漿の場合では、泳動バンドで見る限り、変性、非変性条件のいずれにおいてもほぼ完全に消化されていた (図 1 レーン 20、21、22)。transferrin、IgG (heavy chain) に相当するバンドの他にもいくつかのバンドがシフトしていた。

■ 参考文献

英語面をご覧ください。

変性条件

D または サンプル 2.5 μ l

- ← 2.5 μ l の A' を添加 (A: A 100 μ l に対して 2-メルカプトエタノールを 1.5 μ l 加えたもの)
- 100°C, 3 min.
- ← 5 μ l の C を添加
- ← 13 μ l の純水を添加
- mix
- ← 2 μ l の GPF を添加
- mix
- 37°C, 15 ~ 20 hr.

SDS-PAGE (10% acrylamide)

非変性条件

D または サンプル 2.5 μ l

- ← 2.5 μ l の B を添加
- ← 20 μ l の GPF を添加
- mix
- 37°C, 15 ~ 20 hr.

SDS-PAGE (10% acrylamide)

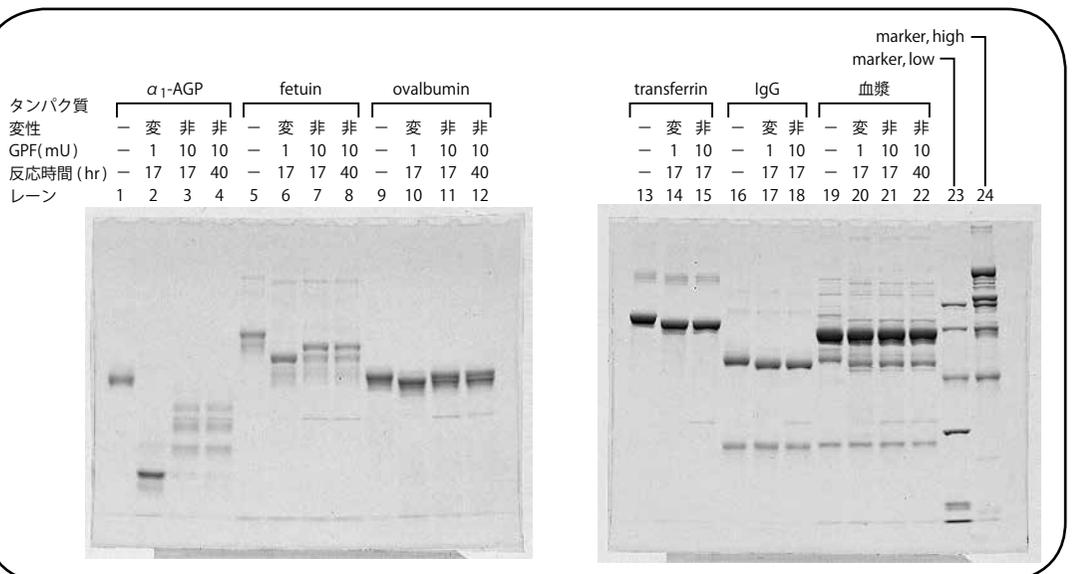


図 1. 実験結果

v201905Da