

# N-Glycosidase F\*, rekombinant

Peptid-N-Glycosidase F, PNGase F, Peptid-N<sup>4</sup>-(Acetyl-β-Glucosaminyl) Asparagin Amidase kloniert aus *Flavobacterium meningosepticum* und exprimiert in *E. coli*, EC 3.2.218; 3.5.1.52

**Best. Nr. 1 365 185** 100 Einheiten

**Best. Nr. 1 365 193** 250 Einheiten

**Best. Nr. 1 643 045** 1250 Einheiten

Version 3, Juli 2002

Stabil bei 2-8° C

<b>Handelsform</b>	Lyophilisat. Lösen des Inhalts in 0,1 ml bidest. Wasser (100 Einheiten Packung) bzw. 0,25 ml bidest. Wasser (250 Einheiten Packung) resultiert in einer Konzentration von 100 mM Natriumphosphat-Puffer, 25 mM EDTA, pH 7,2.
<b>Hinweis</b>	N-Glycosidase F, rekombinant ist auch als Lösung mit 50% Glycerin erhältlich (100 Einheiten, Best. Nr. 1 365 169; 250 Einheiten, Best. Nr. 1 365 177; 1250 Einheiten, Best. Nr. 1 643 037).
<b>Spezifische Aktivität</b>	Ca. 25 000 Einheiten/mg Protein. Eine Einheit ist die Enzymaktivität, die 1 nmol Dabsyl-Fibringlycopeptid oder 0,2 nmol Dansyl-Fetuinglycopeptid in 1 min bei 37° C und pH 7,8 hydrolysiert.
<b>Molekulargewicht</b>	34,6 kD, berechnet aus der DNA-Sequenz (1).
<b>Stabilität und Versand</b>	N-Glycosidase F, rekombinant (Lyophilisat) wird bei 15-25° C verschickt und soll bei 2-8° C gelagert werden. Die rekonstituierte Lösung ist bei 2-8° C stabil.

## Abwesenheit von Fremdaktivitäten

**Endoglycosidase F** nicht vorhanden.

**β-Galactosidase, β-Glucosidase, α- und β-Mannosidase, β-N-Acetylhexosaminidase, α-L-Fucosidase:** Nach 17 h Inkubation von 100 Einheiten N-Glycosidase F mit den entsprechenden 10 mM 4-Nitrophenylglycosiden bei 37° C in 100 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5, in 0,2 ml Endvolumen ist keine Aktivität der obengenannten Enzyme nachweisbar.

**Sialidase** Nach 17 h Inkubation von 100 Einheiten N-Glycosidase F mit 6 mM N-Acetyl-neuraminosyl-D-lactose bei 37° C in 100 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5, in 0,2 ml Endvolumen wird keine Sialidase-Aktivität gefunden.

**Proteasen** Nach 17 h Inkubation von 100 Einheiten N-Glycosidase F mit 200 µg Casein, Resorufin-markiert\*\*, in 200 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,8, bei 37° C [nach der Methode von Twining (2)] ist keine Protease-Aktivität nachweisbar.

**Isolierung und Eigenschaften** Das Enzym wurde erstmals von Plummer et al. (3) in der von Elder und Alexander beschriebenen Endoglycosidase F-Präparation (4) aus dem Kulturfiltrat von *Flavobacterium meningosepticum* isoliert. Das Gen für die N-Glycosidase F wurde kloniert, in *E. coli* exprimiert (1) und die rekombinante N-Glycosidase F zur Homogenität gereinigt.

N-Glycosidase F spaltet alle Typen Asparagin-gebundener N-Glycanketten, vorausgesetzt, daß sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen und daß das Oligosaccharid die Mindestgröße der Chitobiose core Einheit aufweist (5, 6).

Die Reaktionsprodukte sind Ammoniak, Asparaginsäure (in der Peptidkette) und das komplette Oligosaccharid. Der Reaktionsmechanismus unterscheidet sich von dem der Endoglycosidasen D, H und F. Letztere spalten die glycosidische Bindung zwischen den beiden N-Acetylglucosamin-Molekülen. Diese Endoglycosidasen zeigen auch eine engere Substrat-Spezifität als N-Glycosidase F. Peptid-N-

Glycosidase A aus Mandeln hat eine ähnliche Substratspezifität wie N-Glycosidase F, ist aber oft nicht geeignet, alle spaltbaren Oligosaccharid-Ketten auch effizient abzuspalten (7).

Das pH-Optimum von N-Glycosidase F liegt bei pH 7-9, aber auch im Bereich von pH 5-7 ist das Enzym noch aktiv (3, 8).

## Deglycosylierung

Umfang und Geschwindigkeit der Deglycosylierung von Glycoproteinen hängen in hohem Maße von der Art der Glycoproteine ab. Daher können keine allgemein gültigen Inkubationsbedingungen angegeben werden.

N-Glycosidase F Deglycosylation Kit (Best. Nr. 1 836 552) enthält alle notwendigen Reagenzien und Kontrollen, um bei fast allen Glykoproteinen eine effiziente Deglycosylierung zu erreichen. N-Glycosidase F deglycosyliert viele Glycoproteine, die in nativer Form vorliegen (5), jedoch wird die Deglycosylierungsrate durch Denaturierung des Substrates (z. B. durch Erhitzen auf 100°C in Gegenwart von SDS) beträchtlich gesteigert. Um zu verhindern, daß N-Glycosidase F durch SDS gehemmt wird, ist die Zugabe eines zweiten Detergens [z. B. N-Octylglucosid\*\*, Triton<sup>1</sup> X-100\*\*, Nonidet<sup>2</sup> P-40\*\*, Octanoyl-N-methylglucamid (MEGA 8) oder CHAPS\*\*] zur denaturierten Probe notwendig, bevor N-Glycosidase F zugegeben wird (8). Dieses Detergens sollte in 5 bis 10fachem Überschuß bezogen auf die SDS-Konzentration vorliegen.

Im Standardansatz werden die meisten Glycoproteine nach Denaturierung in 1% SDS in Gegenwart von 0,5% Nonidet P-40 vollständig deglycosyliert (SDS-Konzentration während der N-Glycosidase F-Inkubation: 0,1%).

Falls bestimmte Glycoproteine unter diesen Bedingungen nicht oder nur unvollständig deglycosyliert werden, kann anstelle von Nonidet P-40 MEGA 8 oder CHAPS verwendet werden (9).

Diese beiden Detergenzien verhalten sich unterschiedlich bei der Deglycosylierung; deshalb sollte im Einzelfall geprüft werden, welches für die Behandlung einer Probe am besten geeignet ist.

Wenn nach der Deglycosylierung die Glycoproteine mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht werden sollen, stören nichtionische Detergenzien wie Triton<sup>5</sup> X-100 oder Nonidet P-40 – falls sie in Konzentrationen über 1% in der Probe vorliegen – die elektrophoretische Auftrennung. Octylglucosid und MEGA 8 hingegen stören auch bei höheren Konzentrationen nicht.

Auch bei der Deglycosylierung von nicht denaturierten Glycoproteinen kann der Zusatz von nichtionischen Detergenzien einen positiven Einfluß haben (8, 10).

Mercaptoethanol hat keinen Einfluß auf die N-Glycosidase F-Aktivität.

N-Glycosidase F ist frei von Proteasen; zur Inaktivierung evtl. in der Substratpräparation befindlicher Proteasen können jedoch Proteasen-Inhibitoren, wie EDTA\*\* und Complete<sup>3</sup>) zugesetzt werden.

Die abgespaltenen Glykane können z. B. durch high-pH Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAE-PAD) oder durch Kapillarelektrophorese (CE) mit UV-Detektion bei 190 nm erfolgen, wobei letztere Methode etwa 4000 mal empfindlicher ist. Dabei wurde im Gegensatz zur hydrazinolytischen Deglykosylierung keine Desialylierung beobachtet (11). Zur Isolierung der abgespaltenen Oligosaccharide und Abtrennung von Detergenzien wie SDS wird eine Präzipitation mit einem 10fachen Überschuß an kaltem Aceton vorgeschlagen. Alternativ kann der Verdau mit N-Glycosidase F auf PVDF Membranen erfolgen (12).

N-Glycosidase F kann auch in Kombination mit anderen Glycosidasen eingesetzt werden, z. B. mit der O-Glycosidase\*\* und Neuraminidasen\*\*, die zur Abspaltung O-glycosidisch gebundener Kohlenhydrat-Ketten nötig sind.

Glycoproteine mit N- und O-verknüpften Kohlenhydrat-Ketten, wie z. B. einige Serumproteine (z. B. Erythropoietin), können nach Denaturierung (siehe oben) durch gleichzeitige Inkubation mit N-Glycosidase F, O-Glycosidase und Neuraminidase (z. B. aus *Arthrobacter ureafaciens*\*\*) vollständig deglycosyliert werden. Als Puffer wird dazu 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2 empfohlen. 2 Einheiten N-Glycosidase F; 2,5 mU O-Glycosidase und 2 mU Neuraminidase sind normalerweise ausreichend für die Deglycosylierung von 10 µg Glycoprotein in einem Gesamtvolumen von 100 µl.

Eine Arbeitsvorschrift zur Deglycosylierung von denaturierten Glycoproteinen sowie Literaturzitat 8 sind auf Anfrage von Roche Applied Science erhältlich.

Die benötigte Enzymmenge ist von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig und sollte für diese vorliegenden Bedingungen bestimmt werden. Der Einsatz von 3–300 Einheiten N-Glycosidase F/ml zur Deglycosylierung von Glycoprotein bis zu 0,5 mg/ml bei Inkubation über Nacht wurde beschrieben (5). Zur vollständigen Deglycosylierung von z. B. Fetuin, Human-Transferrin, Ribonuclease B und  $\alpha_1$ -saurem Glycoprotein werden beim Einsatz von 0,5 mg/ml bis zu 300 Einheiten N-Glycosidase F bei Inkubation über Nacht benötigt (5).

Die vollständige Deglycosylierung kann mit Hilfe des Glycan Detection Kit\*\* verfolgt werden.

#### Inkubations-Puffer

20–250 mM Kalium- oder Natriumphosphat-Puffer, pH 6–8,5; 10–50 mM EDTA, Detergens (z. B. n-Octylglucosid, Triton X-100, Nonidet P40, MEGA 8 oder CHAPS) 0,5–2%; Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,1% (w/v); 2-Mercaptoethanol, 1% (v/v).

#### Anmerkung

Dieses Präparat eignet sich besonders für Anwendungen, bei denen in Lösung enthaltenes Glycerin stört, z. B. die Markierung der reduzierenden Enden der freigesetzten Oligosaccharide oder die Digoxigenin-Markierung von Glycoproteinen in Lösung (Glycan Detection Kit\*\*, Methode A).

#### Literatur

- Lemp, D., Haselbeck, A. & Klebl, F. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15606–15610.
- Twining, S. S. (1984) *Anal. Biochem.* **143**, 30–34.
- Plummer, T. H. et al. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10700–10704.
- Elder, J. H. & Alexander, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4540–4544.
- Tarentino, A. L. et al. (1985) *Biochemistry* **24**, 4665–4671.
- Chu, E. K. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 172–177.
- Maley F. (1989) *Anal. Biochem.* **180**, 195–204.
- Haselbeck, A. & Hösel, W. (1988) Topics in Biochemistry Nr. 8 (Boehringer Mannheim GmbH).
- Nuck, R. et al. (1990) *Glycoconjugate J.* **7**, 279–286.
- Steube, K. et al. (1985) *Biochemistry* **24**, 5587–25592.
- Hermentin, P. et al. (1992) *Anal. Biochem.* **206**, 419–429.
- Weitzhändler, M. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5121.

\* vorher „Glycopeptidase F“

\*\* zu beziehen von Roche Applied Science

<sup>1)</sup> Triton X-100 ist ein Warenzeichen der Rohm & Haas Company, Philadelphia, USA.

<sup>2)</sup> Nonidet P-40 ist ein Warenzeichen der Shell International Petroleum Company Limited, U.K.

<sup>3)</sup> Complete ist eine Marke eines Unternehmens der Roche Gruppe.

#### Produkte im Umfeld, erhältlich von Roche Applied Science

Produkt	Best. Nr.	Packungsgröße
<b>Glycosidasen</b>		
N-Glycosidase F, rekombinant, Lösung	1 365 169	20 U
	1 365 177	50 U
	1 643 037	250 U
N-Glycosidase F, Lösung	903 337	100 U
	913 782	500 U
N-Glycosidase A	1 642 955	5 mU
O-Glycosidase, RSA-frei	1 347 101	25 mU
	1 643 061	100 mU
Endoglycosidase F1, rekombinant	1 981 099	25 mU
Endoglycosidase D	752 991	100 mU
Endoglycosidase H	1 088 726	200 mU
	1 643 053	500 mU
	1 088 734	1 U
Neuraminidase aus <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	269 611	1 U
Neuraminidase aus <i>Clostridium perfringens</i>	107 590	1 mg
Neuraminidase aus <i>Clostridium perfringens</i> , < 0,3% Proteasen	1 585 886	5 U
	1 585 894	25 U
Neuraminidase aus Newcastle disease virus	1 521 845	100 mU
Neuraminidase aus <i>Vibrio cholerae</i>	1 080 725	1 U
<b>Detergenzien, Inhibitoren</b>		
Natriumdodecylsulfat, spezielle Qualität für die Proteinchemie	1 028 685	100 g
	1 028 693	500 g
n-Octylglucoside	411 434	1 g
	737 062	2 g
	1 585 401	5 g
	634 425	10 g
	737 674	20 g
	1 359 088	50 g
CHAPS	810 100	1 g
	810 118	10 g
	810 126	50 g
Nonidet P40, wäßrige Lösung, 10% (w/v)	1 332 473	5 × 10 ml
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	1 697 498	20 Tabletten
<b>Kits</b>		
DIG Glycan Detection Kit	1 142 372	1 kit
DIG Glycan Differentiation Kit	1 210 238	1 kit

Diese Zusammenstellung zeigt nur die wichtigsten Produkte im Umfeld des beschriebenen Produktes. Bitte entnehmen Sie unser aktuelles Produktangebot dem jeweils gültigen Katalog, oder nehmen Sie direkt mit unserer lokalen Roche Applied Science Vertretung Kontakt auf.

[www.roche-applied-science.com/pack-insert/1365185b.pdf](http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1365185b.pdf)

Please visit our new Online Technical Support Site



Roche Diagnostics GmbH  
Roche Applied Science  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany