

PNGase F

1. ОПИСАНИЕ

PNGase F – N-концевая-гликопептид-(N-ацетил-β-D-глюкозаминил)-L-аспарагин амидогидролаза из бактерии *Flavobacterium meningosepticum*. Это фермент, который удаляет N-связанные олигосахариды из гликозилированных белков.

Гидролизует внутреннюю связь между N-ацетилглюкозамином и остатком аспарагина в N-гликозилированных белках.

Структура и последовательность отщепленных олигосахаридных цепей N-гликана остаются неповрежденными и пригодными для дальнейшего анализа.

Используется для контроля и исследования гликозилирования антител и других рекомбинантных белков ^{1,2,3}.

Рекомбинантный фермент, полученный из метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Содержит C-концевой гистиновый таг. Рекомбинантная PNGase F представлена смесью трех гликозилированных форм, молекулярной массой 32, 36.5 и 38 кДа (Рисунок 1) ^{3,4}.

Аминокислотная последовательность белка:

APADNTVNIKTFDKVKNAFGDGLSQAEGTFTFPADVAVKTIKMFIKNECPNKTCEWDRYANVYVKNKTTGEWYEIGRFITPYWVGTEKLPRGLEI
 DVTDfKSLLSGNTELKIYTETWLAKGREYSVDFDIVYGTPDYKYSAVVPVQYNKSSIDGVPYGAHTLALKKNIQLPTNTEKAYLRTTISGWGHAKP
 YDAGSRGCAEWCFRHTHTIAINNSNTFQHLGALGCSANPINNQSPGNWTPDRAGWCPGMAVPTRIDVLNNSLIGSTFSYEYKFQNWNTNNGTNGDAFYA
 ISSFVIAKSNTPI SAPVVTNGSGGGHHHHHHHHHHH

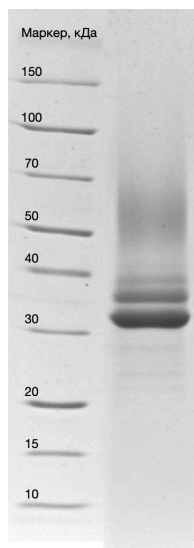


Рисунок 1. Рекомбинантная PNGase F из *Pichia pastoris*, полученная при очистке на металл-аффинной смоле Ni-NTA.

Фермент катализирует гидролиз N-гликозидной связи между остатком аспарагина и присоединенным к нему олигосахаридом. Необходимыми условиями гидролиза являются:

- олигосахарид должен начинаться с двух остатков N-ацетилглюкозамина
- остаток аспарагина не должен быть N- или C-концевой аминокислотой белка.

Аспарагиновый остаток, после удаления гликана, при pH меньше 8 дезаминируется до аспарагиновой кислоты, аммиака и свободного олигосахарида, с N,N'-диацетилхитобиозой на конце (Рисунок 2) ⁵

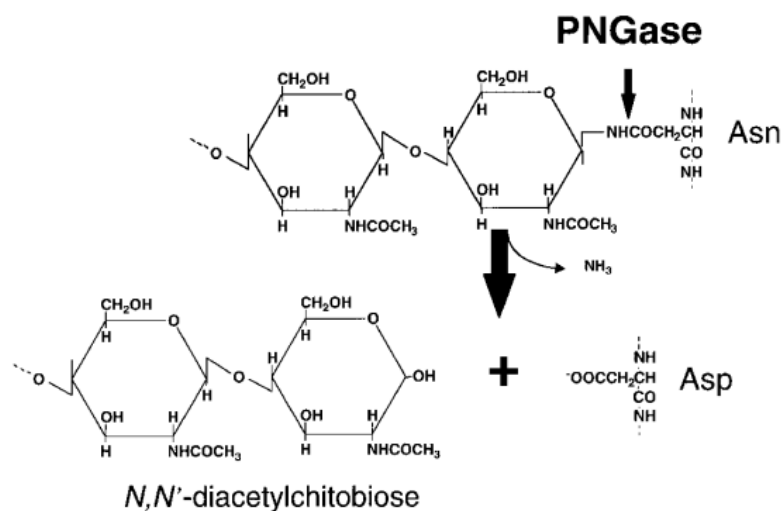


Рисунок 2. Результат действия PNGase F на N-гликозилированный пептид ⁵.

Таким образом, PNGase F пригодна для дегликозилирования белков млекопитающих, дрожжей и некоторых белков растений. Ферментативная реакция не протекает, если коровый N-ацетилглюкозамин содержит присоединенную к нему α -(1-3)-фукозу, в основном присутствующую в гликопротеинах растений и насекомых (Рисунок 3). В то же время, остатки α -(1-6)-фукозы в белках человека и млекопитающих не мешают действию фермента.

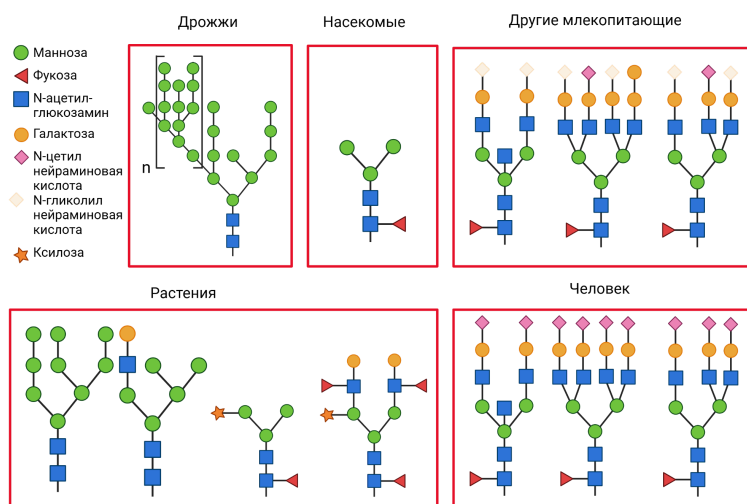


Рисунок 3. Типы гликозилирования в разных организмах. В растениях и насекомых присутствует α -(1-3)-фукоза, мешающая активности PNGase F.

2. АКТИВНОСТЬ

Общепринятого определения единиц активности N-гликозидазы PNGase F не существует. Каждый производитель определяет ее активность индивидуально. Различия наблюдаются в выборе конкретного гликозилированного белка, степени его дегликозилирования, объеме и времени проведения реакции.

Компания New England Biolabs принимает за одну единицу активности количество N-гликозидазы PNGase F необходимой для удаления >95% олигосахаридных остатков 10 мкг денатурированной РНКазы В за 1 час при 37 °C, в общем объеме реакции 10 мкл.

На Рисунке 4 приведено сравнение активности рекомбинантной PNGase F Клонинг Фасилити и PNGase F компании NEB. Сравнение проводилось путем определения накопления дегликозилированной формы фитазы размером 50 кДа относительно ее гликозилированной формы, размером около 100 кДа с использованием денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.

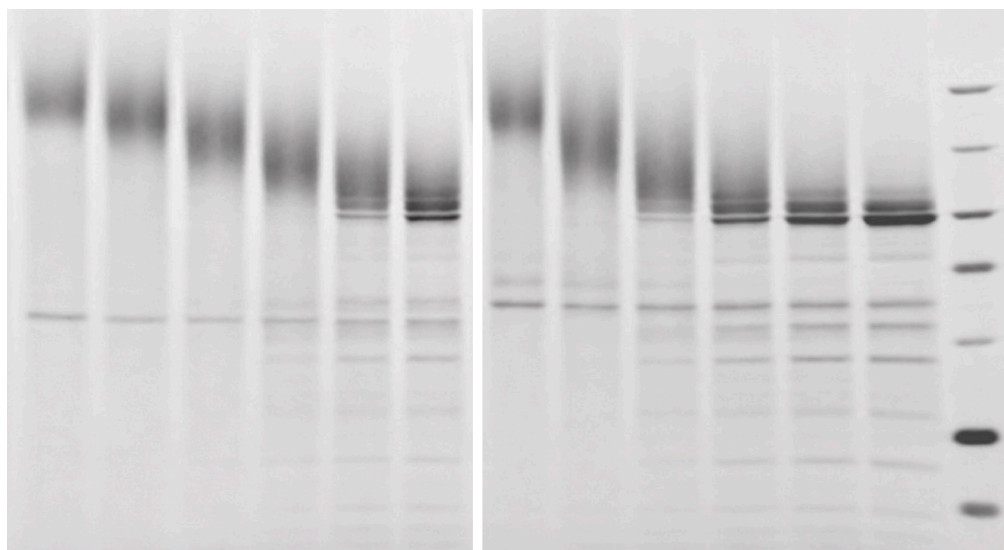


Рисунок 4. Сравнение активности коммерческого препарата N-гликозидазы PNGase F NEB (левая половина) и рекомбинантной N-гликозидазы Клонинг Фасилити (правая половина). На каждую из дорожек нанесены реакционные смеси, которые содержат 500 мкг фитазы с 0.08 мкг N-гликозидазы NEB или с 0.16 мкг N-гликозидазы Клонинг Фасилити после инкубации за разные промежутки времени при 37°C в денатурирующих условиях.

На Рисунке 4 видно, что к 24 минуте PNGase F компании NEB декликозилировала такое же количество фитазы, что и N-гликозидазы Клонинг Фасилити за 12 минут. Активность препарата N-гликозидазы Клонинг Фасилити в два раза выше и составляет 1000 ед.а/мкл. В пересчете на количество фермента накопление дегликозилированного продукта идет с одинаковой скоростью в обоих случаях, таким образом, удельная активность ферментов NEB и Клонинг Фасилити одинакова.

Важно отметить, что рекомбинантная N-гликозидаза из *Pichia pastoris* потенциально может дегликозилировать свои N-гликозилированные формы. Это надо учитывать при необходимости анализа количества или структуры отщепленных олигосахаридных остатков.

3. СПЕЦИФИКАЦИИ

Рекомбинантная PNGase F поставляется в форме раствора в буфере для хранения. Концентрация фермента 1000 ед.а/мкл. Буфер для хранения: 20 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 50 мМ NaCl и 5 мМ EDTA. Хранить при температуре от +2°C до +10°C, не замораживать.

Состав набора:

- Рекомбинантная PNGase F, 150 мкл
10x денатурирующий буфер, 5% SDS, 0.5 М DTT, pH 8.6, 1 мл
10% Тритон x-100, 1 мл
0.5 М Калий-фосфатный буфер, pH 7.5, 1 мл

4. ПРОТОКОЛЫ

Условия проведения реакции

Детергенты и тепловая денатурация исследуемого белка повышают скорость катализируемой реакции на 1-2 порядка. Фермент способен дегликозилировать белки и в отсутствие денатурирующих веществ, но нуждается в более длительной инкубации (12-24 часа) или большем количестве фермента на реакцию для расщепления

нативных неденатурированных белков.

Оптимальный pH 8.6, но фермент сохраняет до 60% активности в диапазоне pH от 6 до 9.5.

Для инактивации фермента применяют нагрев до 98°C в течение 10 минут.

Примечание. Следующие протоколы предназначены в качестве общего руководства по дегликозилированию белков. Активность в отношении различных гликопротеиновых субстратов в значительной степени зависит от условий реакции и должна определяться эмпирическим путем.

Дегликозилирование белков в денатурирующих условиях для электрофореза в полиакриламидном геле

Объем реакционной смеси 50 мкл. Реакция может быть линейно масштабирована для адаптации к большему или меньшему количеству исследуемого гликопротеина или объему реакции.

Необходимые растворы:

- 10x Денатурирующий буфер
- 10% Тритон X-100
- 0.5 М Калий-фосфатный буфер
- Исследуемый гликопротеин 10-50 мкг

Стадия денатурации

1. Приготовить раствор 10-50 мкг исследуемого белка в воде (или совместимом буфере с низкой ионной силой) с конечным объемом 30 мкл. Концентрация соли в образце не должна превышать более 50 mM.
2. Добавить 5 мкл 10x денатурирующего буфера.
3. Нагреть образец до 98°C. Инкубировать 10 мин.
4. Охладить образец 5 мин до комнатной температуры.

Стадия дегликозилирования

1. Добавить 5 мкл 0.5M калий-фосфатный буфера pH 7.5. Можно использовать другие буферы с подходящим pH в диапазоне 6-10 единиц.
2. Добавить 5 мкл 10% Тритон X-100.
3. Добавить 1-2 мкл PNGase F.
4. Инкубировать при 37°C 1-3 часа.

Дегликозилирование белков в нативных условиях для масс-спектрометрического анализа

Объем реакционной смеси 20 мкл.

В качестве положительного контроля рекомендуется провести дегликозилирование аликвоты исследуемого белка в денатурирующих условиях.

Необходимые растворы:

- Бикарбонатный буфер: 50 mM бикарбонат аммония (pH 7.8) или 1x фосфатно-солевой буфер (PBS) pH 7.4
 - Исследуемый гликопротеин 10-50 мкг
1. 1-20 мкг гликопротеина растворяются в 50 mM бикарбонате аммония (pH 7.8) до конечного объема 18 мкл.
 2. Добавить 2-5 мкл PNGase F. Если используется препарат с глицерином, то рекомендуется его добавлять не более, чем 1/10 от общего объема реакции, так чтобы его конечная концентрация не превышала 5%.
 3. Инкубировать 4-24 часа при 37°C.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. Fischler, D. A. & Orlando, R. -linked Glycan Release Efficiency: A Quantitative Comparison between NaOCl and PNGase F Release Protocols. J Biomol Tech 30, 58-63 (2019).

2. Vilaj, M., Lauc, G. & Trbojević-Akmačić, I. Evaluation of different PNGase F enzymes in immunoglobulin G and total plasma N-glycans analysis. *Glycobiology* 31, 2–7 (2021).
3. Wang, J. & Ye, J. Analyzing the topology of N-linked glycans by PNGase F accessibility assay. *STAR Protoc* 4, 102458 (2023).
4. Hua, L. et al. Highly efficient production of peptides: N-glycosidase F for N-glycomics analysis. *Protein Expr Purif* 97, 17–22 (2014).
5. Suzuki, T., Park, H. & Lennarz, W. J. Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *FASEB J* 16, 635–641 (2002).