

# Lacto-*N*-biosidase from *Streptomyces* sp. 142

Code No. 4456

Size: 100  $\mu$ U

## Note:

The storage temperature of enzyme has been changed to -20°C from 4°C. (Lot. N106AB -)

## Description:

This product specifically hydrolyzes oligosaccharides with type I chain and produces lacto-*N*-biose (Gal  $\beta$  1-3GlcNAc) but does not hydrolyze oligosaccharides with type II chain. So it can be used to judge the structure of type I, II glycoprotein and glycolipid sugar chain. Also as it can distinguish Lewis<sup>s</sup> structure from Lewis<sup>x</sup> structure in conjunction use with  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase (Cat. #4453), this enzyme is useful in analyzing structure and function of glycoprotein and glycolipid sugar-chain. One vial of this product (100  $\mu$ l) allows 50 - 100 reactions of enzyme digestion of sugar chain up to 10 pmol.

**Source:** *Streptomyces* sp.142

**Form:** Solution in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 0.05% Brij-58.

**Storage:** -20°C

**Concentration:** 1  $\mu$ U/ $\mu$ l

## Reaction:

Specific hydrolysis of oligosaccharides with type I chain (Gal  $\beta$  1-3GlcNAc) and production of lacto-*N*-biose (Gal  $\beta$  1-3GlcNAc).

## Definition of activity:

One unit is the amount of enzyme required to hydrolyze 1  $\mu$ mol of pyridylamino lacto-*N*-tetraose within 1 minute at 37°C at pH 5.5.

## Assay of activity:

Incubated with 2  $\mu$  M PA-lacto-*N*-tetraose (PA-Sugar Chain 042; Cat. #4142) as a substrate in 40 mM sodium acetate, pH 5.5, at 37°C for 20 min. Stop the reaction by adding 1% trifluoroacetic acid. Analyze the reaction mixture by HPLC and calculate the enzyme activity from the amount of the product; PA-lactose (PA-Sugar Chain 026; Cat. #4126).

## Properties:

Molecular weight; 60,000 (SDS-PAGE)

Stabilizer; non-ionic detergent (Brij58, NP-40)  
bovine serum albumin

Inhibitors; Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, lacto-*N*-biose

Optimum pH; pH 5.5 (Sodium citrate buffer, Sodium phosphate buffer) Substrate: PA-lacto-*N*-tetraose

pH stability; pH 4.0 - 10.0 (4°C, 16 hours)

Michaelis constant; Km=6.80  $\mu$  M  
(PA-lacto-*N*-tetraose: PA-Sugar Chain 042, Cat. #4142)  
Km=38.9  $\mu$  M  
(PA-Sugar Chain 003, Cat. #4103)

## Purity:

Protease Contamination:

No protease activity is detected after incubation of 10  $\mu$ l Lacto-*N*-biosidase with 0.4 mM oxidized insulin B chain for 16 hours at 37°C, in 10  $\mu$ l of 200 mM sodium acetate buffer, pH 5.5.

Endoglycosidase and Exoglycosidase Contamination:

Substrate:

1) *p*-NP-glycoside:

25  $\mu$ l of Lacto-*N*-biosidase is incubated with 1.1 mM *p*-nitrophenyl glycoside for 16 hours at 37°C, in 225  $\mu$ l of 40 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. Then 250  $\mu$ l of 1 M sodium carbonate is added to the reaction mixture to stop the reaction, measured at 405 nm. The detection limit is 1  $\mu$ U/ml.

2) PA-Sugar Chain:

2  $\mu$ l of Lacto-*N*-biosidase is incubated with 2  $\mu$  M PA-Sugar Chain for 16 hours at 37°C, in 8  $\mu$ l of 40 mM sodium acetate buffer, pH 5.5. Then 2  $\mu$ l of 1% trifluoroacetic acid is added to the reaction mixture to stop the reaction. The reaction mixture is analyzed by HPLC. The detection limit is 0.1  $\mu$ U/ml.

Contaminating activity	<i>p</i> -NP-glycoside	PA-Sugar Chain
$\alpha$ -Fucosidase	< 0.005%	< 0.01%
$\alpha$ -Galactosidase	< 0.02%	ND
$\beta$ -Galactosidase	ND	ND
$\alpha$ -Glucosidase	NT	ND
$\beta$ -Glucosidase	< 0.005%	< 0.015%
$\beta$ - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase	< 0.5%	ND
$\alpha$ - <i>N</i> -Acetylgalactosaminidase	NT	ND
$\alpha$ -Mannosidase	ND	ND
$\beta$ -Mannosidase	< 0.005	NT
Sialidase	NT	ND
Endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminidase	NT	ND

ND; Not detected, NT; Not tested

## References:

- 1) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *Proc Natl Acad Sc USA.* (1992) **89**: 8512-8516.
- 2) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem.* (1993) **268**: 18560-18566.
- 3) Takasaki S and Kobata A. *Biochemistry.* (1986) **25**: 5709-5715.
- 4) Townsend RR, Hardy M R, Wong T C, and Lee Y C. *Biochemistry.* (1986) **25**: 5716-5725.
- 5) Stroud M R, Levery S B, Nudelman E D, Salyan M E K, Towell J A, Roberts C E, Watanabe M, and Hakomori S. *J Biol Chem.* (1991) **266**: 8439-8446.
- 6) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem.* (1992) **267**: 1522 -1527.

## 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 6973 or from our website at [www.takara-bio.com](http://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.

# Lacto-*N*-biosidase from *Streptomyces* sp. 142

Code No. 4456

容量： 100  $\mu$ U

## ご注意

本製品は、Lot. N106AB より保存温度が4℃から-20℃に変更されました。

## ●製品説明

Lacto-*N*-biosidase は、I型糖鎖構造に特異的に作用して糖鎖の非還元末端から Lacto-*N*-biose (Gal  $\beta$  1-3GlcNAc) を遊離するが、II型糖鎖には全く作用しない。<sup>1,2)</sup> 糖タンパク質や糖脂質糖鎖のI型、II型構造の判別に利用できる。また、 $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase (製品コード 4453) と組み合わせることで、Lewis<sup>x</sup> 構造と Lewis<sup>y</sup> 構造を識別することができる。糖タンパク質や糖脂質糖鎖の構造と機能の解明に有用である。本酵素 100  $\mu$ U (1 vial 分) で、糖鎖 $\sim$ 10 pmol に対して、およそ 50 $\sim$ 100 回分の酵素消化が行える。

●由来 *Streptomyces* sp.142

●形状 溶液  
[0.05% Brij 58 を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5)]

●保存 -20℃

●濃度 1  $\mu$ U/ $\mu$ l

●反応 非還元末端に I 型糖鎖構造 (Gal  $\beta$  1-3GlcNAc-) を持つ糖鎖に作用して Lacto-*N*-biose (Gal  $\beta$  1-3GlcNAc) を遊離する。<sup>1)</sup>

## ●活性の定義

37℃、pH5.5 において PA-lacto-*N*-tetraose から 1 分間に 1  $\mu$ mol の PA-lactose を生成する酵素量を 1 U とする。

## ●活性測定法

2  $\mu$ M の PA-lacto-*N*-tetraose (PA-Sugar Chain 042; 製品コード 4142) を含む 40 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中、37℃で 20 分間酵素反応を行わせた後、1% のトリフルオロ酢酸を加えて反応を止める。反応液を HPLC で分析して、生成物 [PA-lactose、(PA-Sugar Chain 026; 製品コード 4126)] の量から酵素活性を算出する。

## ●一般的性質

分子量： 約 60,000 (SDS-PAGE)

安定化剤： 非イオン性界面活性剤 (Brij 58、NP-40)、Bovine serum albumin

阻害剤： Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、lacto-*N*-biose

至適 pH： pH5.5 (クエン酸ナトリウム緩衝液、酢酸ナトリウム

緩衝液) 基質： PA-lacto-*N*-tetraose

pH 安定領域： pH4.0 $\sim$ 10.0 (4℃、16 hours)

ミカエリス定数： Km = 6.80  $\mu$ M

基質： PA-lacto-*N*-tetraose (PA-Sugar Chain 042 ; 製品コード 4142)

Km = 38.9  $\mu$ M

基質： PA-Sugar Chain 003 (製品コード 4103)

## ●純度

1. 残存エキソグリコシダーゼ活性およびエンドグリコシダーゼ活性  
合成基質：

p-NP-glycoside 1.1 mM を含む 40 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 225  $\mu$ l に本酵素標品 25  $\mu$ l を加えて 37℃で 16 時間反応を行わせた後、1 M 炭酸ナトリウム 250  $\mu$ l を加えて反応を停止し、405 nm における反応液の吸光度を測定する。活性の検出限界は 1  $\mu$ U/ml。

糖鎖基質：

適当な PA-Sugar Chain 2  $\mu$ M を含む 40 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 8  $\mu$ l に本酵素標品 2  $\mu$ l を加えて 37℃で 16 時間反応を行わせた後、1% のトリフルオロ酢酸を加えて反応を止める。

反応液を HPLC で分析して、生成物の有無を調べる。活性の検出限界は 0.1  $\mu$ U/ml。

残存グリコシダーゼ活性	合成基質	糖鎖基質
$\alpha$ -Fucosidase	< 0.005%	< 0.01%
$\alpha$ -Galactosidase	< 0.02%	ND
$\beta$ -Galactosidase	ND	ND
$\alpha$ -Glucosidase	NT	ND
$\beta$ -Glucosidase	< 0.005%	< 0.015%
$\beta$ - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase	< 0.5%	ND
$\alpha$ - <i>N</i> -Acetylgalactosaminidase	NT	ND
$\alpha$ -Mannosidase	ND	ND
$\beta$ -Mannosidase	< 0.005	NT
Sialidase	NT	ND
Endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminidase	NT	ND

ND; Not detected, NT; Not tested

2. 残存プロテアーゼ活性

酸化インスリン B 鎖 0.4 mM を含む 200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 10  $\mu$ l に本酵素標品 10  $\mu$ l を加えて 37℃で 16 時間反応させた後、反応液を逆相系 HPLC で分析した結果、基質 (酸化インスリン B 鎖) 以外のピークを認めなかった。

## ●参考文献

- 1) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1992) **89**: 8512-8516.
- 2) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem*. (1993) **268**: 18560-18566.
- 3) Takasaki S and Kobata A. *Biochemistry*. (1986) **25**: 5709-5715.
- 4) Townsend RR, Hardy MR, Wong T C, and Lee Y C. *Biochemistry*. (1986) **25**: 5716-5725.
- 5) Stroud M R, Levery S B, Nudelman E D, Salyan M E K, Towell J A, Roberts C E, Watanabe M, and Hakomori S. *J Biol Chem*. (1991) **266**, 8439-8446.
- 6) Sano M, Hayakawa K, and Kato I. *J Biol Chem*. (1992) **267**: 1522-1527.

## ●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。

# Lacto-*N*-biosidase from *Streptomyces* sp. 142

## Substrate specificity of Lacto-*N*-biosidase

Substrate	Relative activity (%)
Glc $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc-PA (PA-Sugar Chain 042)	100
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc-PA (PA-Sugar Chain 041)	0
Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc-PA (PA-Sugar Chain 043)	0
Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc-PA Fuc $\alpha$ 1-4 (PA-Sugar Chain 044)	0
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc-PA Fuc $\alpha$ 1-3 (PA-Sugar Chain 045)	0
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6 Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-4Man $\alpha$ 1-3 Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc-PA (PA-Sugar Chain 003)	0

Neu5Ac  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc-PA 0

PA: Pyridylamino (group)

PA-sugar chain was derivatized according to the method of Kondo, *et al.*

## <Application 1 : Digestion of Bovine Asialofetuin by Lacto-*N*-biosidase>

Bovine fetuin is a bovine fetal serum derived glycoprotein (MW48,000), which has *N*-linked and *O*-linked glycosaccharides. It is reported that the structure of *N*-linked glycosaccharide is biantennary or triantennary sugar chain, combined with sialic acid on nonreducing terminus. 20 - 30% of triantennary sugar chain has type I form on nonreducing terminus. The sugar chain structure was analysed with HPLC when asialofetuin, removed sialic acid from fetuin, was treated by Lacto-*N*-biosidase.

### [Protocol]

Lacto-*N*-biosidase and 100 pmol asialofetuin were incubated for 2 hours at 37°C in 10  $\mu$ l of 40 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, then the reaction mixture was boiled to stop the reaction. After evaporation to dryness, 2.5 mU of Glycopeptidase F (Cat. #4450) in 10  $\mu$ l of 40 mM sodium phosphate buffer, pH 8.5, was added and incubated for 2 hours at 37°C to release *N*-glycans, then the reaction mixture was boiled to stop the reaction. The reaction mixture was lyophilized, then the released *N*-linked glycosaccharides were analyzed by HPLC. PALPAK Type N (discontinued) and PALPAK Type R (discontinued) were used for analysis.

### [Result]

The sugar chain composition of asialofetuin was changed by Lacto-*N*-biosidase treatment. From the analysis result with PALPAK Type R, the rate of PA-Sugar chain 001,002,003 of non-treated asialofetuin was 1 : 6 : 3. But the rate of treated asialofetuin was changed to 3 : 6 : 1. It showed that almost triantennary sugar chains with the type I chain were changed into biantennary sugar chains.

## <Application 2 : Digestion of Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup> glycolipid by Lacto-*N*-biosidase>

Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup> glycolipid is a kind of lact series glycolipid which structure contains type I sugar chain repeat. This glycolipid was digested with endoglycoceramidase to release sugar chains, and it was pyridylaminated by *GlycoTAG*. This pyridylaminated sugar chain was digested by  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase (Cat. #4453) and Lacto-*N*-biosidase. The product was analyzed by HPLC using PALPAK Type N.

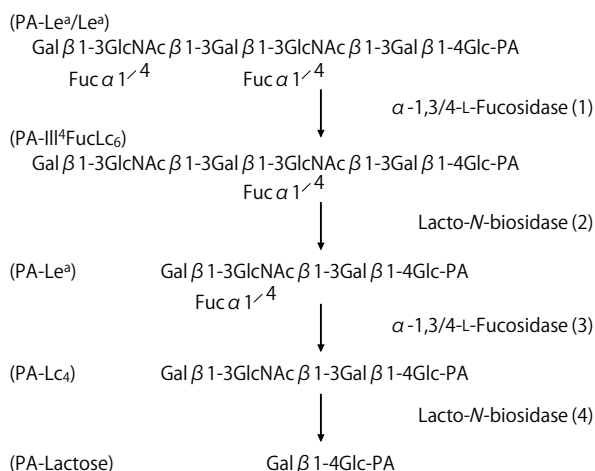
### [Protocol]

All reaction was performed at 37°C for 30 min in 30 mM sodium acetate, pH 5.5. Amount of enzyme for each reaction was 0.05  $\mu$ U/pmol sugar chain of  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase or 0.5  $\mu$ U/pmol sugar chain of Lacto-*N*-biosidase.

- 1) PA-Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup> was digested with  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase, then boiled to stop the reaction. 10 pmol was analyzed by HPLC.
- 2) Lacto-*N*-biosidase was added to the resting solution and performed, then reaction mixture was boiled to stop the reaction. 10 pmol was analyzed by HPLC.
- 3)  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase was added to the resting solution and performed, then the reaction mixture was boiled to stop the reaction. 10 pmol was analyzed by HPLC.
- 4) Lacto-*N*-biosidase was added to the resting solution and performed, then the reaction mixture was boiled to stop the reaction. 10 pmol was analyzed by HPLC.

### [Result]

The result of HPLC analysis showed that PA-Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup> was sequential digested with  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase and Lacto-*N*-biosidase.



# Lacto-*N*-biosidase from *Streptomyces* sp. 142

## ● Lacto-*N*-biosidase の基質特異性

基質 (終濃度 2 μM)	生成物	比活性
PA-Sugar Chain 042	PA-Sugar Chain 026	2683
PA-Sugar Chain 041		0
PA-Sugar Chain 003	PA-Sugar Chain 001	280
PA-Sugar Chain 002		0
PA-Sugar Chain 043		0
PA-Sugar Chain 044		0
PA-Sugar Chain 045		0

(mU/mg)

## < Application 1 : ウシ Asialofetuin の Lacto-*N*-biosidase 消化 >

Bovine fetuin は分子量 48,000 のウシ胎児血清由来糖タンパク質で、*N* 結合型および *O* 結合型糖鎖を含有している。*N* 結合型糖鎖の構造は *N*-Acetylglucosamine type のバイアンテナ、トリアンテナ型糖鎖で非還元末端にシアル酸が結合しており、トリアンテナ型糖鎖のうち 20 ~ 30% は非還元末端に I 型構造を持つことが報告されている。<sup>3,4)</sup> この fetuin からシアル酸を除去した Asialofetuin に Lacto-*N*-biosidase を作用させた時の糖鎖構造の変化を HPLC で分析した。

### ■ 操作手順

Asialofetuin 100 pmol と Lacto-*N*-biosidase を含む 40 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 10 μl を 37°C で 2 時間保持した後煮沸して反応を止める。反応液を濃縮乾固した後 Glycopeptidase F (製品コード 4450) 2.5 mU を含む 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.5) 10 μl を加えて 37°C で 2 時間反応させて *N* 結合糖鎖を遊離させる。煮沸して反応を止めた後凍結乾燥し、*GlycoTAG* で糖鎖を PA 化し HPLC で分析を行った。カラムは PALPAK Type N (終売) および Type R (終売) を用いた。

### ■ 結果

Lacto-*N*-biosidase の作用により Asialofetuin の糖鎖の組成が変化した。PALPAK Type R での分析結果から、未処理の Asialofetuin では PA-Sugar Chain 001、002、003 の割合が 0.1 : 0.6 : 0.3 であるのに対して Lacto-*N*-biosidase 10 μU で処理した場合は 0.3 : 0.6 : 0.1 となり I 型構造を持つトリアンテナ型糖鎖はほとんどがバイアンテナ型糖鎖に変換されたことがわかった。

## < Application 2 : Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup> 糖鎖の Lacto-*N*-biosidase 消化 >

Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup> 糖脂質は最近ヒト結腸腺癌由来細胞株である Colo205 の細胞膜より単離されたラクト系糖脂質で、1 型糖鎖の繰り返し構造を持っている。<sup>5)</sup> この糖脂質をエンドグリコセラミダーゼで消化して糖鎖を遊離させた後 *GlycoTAG* で PA 化したものを基質として、 $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase (製品コード 4453)<sup>6)</sup> と Lacto-*N*-biosidase で逐次酵素消化を行った。反応生成物の分析は PALPAK Type N を用いた HPLC で行った。

### ■ 操作手順

反応は全て 30 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中、37°C で 30 分を行った。用いた酵素量は、 $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase が 0.05 μU/pmol 糖鎖、Lacto-*N*-biosidase は 0.5 μU/pmol 糖鎖である。

- 1) PA-Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup>、40 pmol に  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase を加えて反応後、煮沸して反応を止め 10 pmol 相当量を HPLC で分析した。
- 2) 残りに Lacto-*N*-biosidase を加えて反応後、煮沸して反応を止め 10 pmol 相当量を HPLC で分析した。
- 3) 残りに  $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase を加えて反応後、煮沸して反応を止め 10 pmol 相当量を HPLC で分析した。
- 4) 残りに Lacto-*N*-biosidase を加えて反応後、煮沸して反応を止め 10 pmol 相当量を HPLC で分析した。

### ■ 結果

HPLC 分析の結果、PA-Le<sup>a</sup>/Le<sup>a</sup> は、 $\alpha$ -1,3/4-L-Fucosidase と Lacto-*N*-biosidase によって、下図に示す様に逐次分解されることがわかった。

