



产品使用说明书

Rhinogen[®] Protein Deglycosylation Kit III

(for N-linked & Complex O-linked Glycans)

货号：QPF-010



目 录

目 录	1
产品信息	2
试剂包装	2
产品来源	2
产品质量	2
保藏条件	2
产品综述	3
背景	3
概述	3
应用	4
特性	4
操作方法	5
试剂准备	5
变性条件下去糖基化方案	5
非变性条件下去糖基化方案	5
数据分析	5
操作说明	5
常见问题	6
相关产品	7
联系我们	8
参考文献	8

产品信息

试剂包装 Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III(for N-Linked & Complex O-Linked Glycans)包装规格如下:

目录号	组成	规格	体积
QPF-010	PNGase F (Glycerol-free)	15,000U	30µl
	O-Glycosidase	1,200,000U	30µl
	α2-3,6,8,9 Neuraminidase	0.6U	30µl
	β1-4 Galactosidase	0.06U	30µl
	β-N-acetylhexosaminidase	1.5 U	30µl

配套提供的试剂如下:

试剂	成分
• 10×Denaturing 缓冲液	5%SDS, 0.4M DTT
• 10×Glyco 缓冲液 2	0.5M Sodium Phosphate (pH7.5 at 25°C)
• 10%NP-40 溶液	10%NP-40

产品来源 本试剂盒中的所有酶都是大肠杆菌 BL21中表达并分离纯化的重组酶: PNGase F分子量为36kDa; O-Glycosidase分子量为147kDa; α2-3,6,8,9 Neuraminidase分子量为66kDa; β1-4 Galactosidase分子量为94kDa; β-N-Acetylhexosaminisase分子量为55kDa。

产品质量 SDS-PAGE分析, 纯度≥95%; 没有检测到污染的外切糖苷酶、糖苷内切酶及蛋白酶活性。

保藏条件 采用冰袋运输, 收到产品后请立即将PNGase F酶置于2~8°C储存, 严禁冻存; 其它酶及配套试剂置于-20°C储存。
本品不含防腐剂, 务必确保无菌操作取用, 避免污染。

产品综述

背景

科学研究表明，人体中存在的蛋白质超过 50%是以糖蛋白的形式存在。N-糖基化（N-连聚糖以三甘露五糖核心与蛋白质上的天冬酰胺（Asn）残基的酰胺侧链相连）及 O-糖基化（O-连聚糖以 Core 1 或 Core 3 的二糖核心与 Ser 或 Thr 残基的羟基侧链相连）是两种主要的糖基化修饰形式，具有重要的生物学功能。不仅影响蛋白质的空间构象、生物活性、运输及定位等，而且还参与分子识别、细胞通信、细胞分化、信号转导、免疫应答、炎症介导等等在内的各种重要生命活动。寡糖结构的多样性通常会导致糖蛋白的质量、电荷及生物学活性的改变。目前越来越多的糖蛋白被用作生物治疗剂，这些生物治疗剂的性质又显著受其糖基化状态的影响。例如，重组促红细胞生成素的药代动力学和效力受其糖基化状态的严重影响，IgG 的 Fc 区 Asn297 处的保守 N-连聚糖对其功能活性至关重要。此外，一些抗体还具有额外的 N-连聚糖，其与 Fc 区 Asn297 处的保守 N-聚糖一起影响抗体的识别、半衰期和免疫应答反应。然而在细胞培养过程中的各种变量都可能会导致蛋白质糖基化的程度改变及增加其聚糖多样性，美国 FDA 要求所有类型的糖蛋白都需要进行糖型分析。因此在生产及质控过程中监测糖蛋白的糖基化状态对于获得正确的糖蛋白形式至关重要。

概述

Rhinogen[®] Protein Deglycosylation Kit III 包含去除所有 N-连和部分复杂 O-连聚糖所需要的酶及试剂。其中的酶试剂是五种糖苷酶的混合物，包括 PNGase F(Glycerol-free)、O-Glycosidase、 α -2-3,6,8,9Neuraminidase、 β -1-4 Galactosidase、 β -N-Acetylhexosaminisase。该试剂盒包含的所有酶及试剂均与下游 HPLC 及 MS 兼容。PNGase F 是从糖蛋白中特异性除去 N-连聚糖的糖苷内切酶，能够将绝大多数 N-连聚糖（除最内测 GlcNac 上连有 α -1,3 岩藻糖残基，常见于植物及昆虫糖蛋白）完整地从其所连接的蛋白分子上释放下来，可以在 N-连糖肽或糖蛋白的高甘露糖、杂合和复杂寡糖部分最内侧的 N-乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）和天冬酰胺残基（Asn）之间进行切割，释放出完整的寡糖链，如图 1。

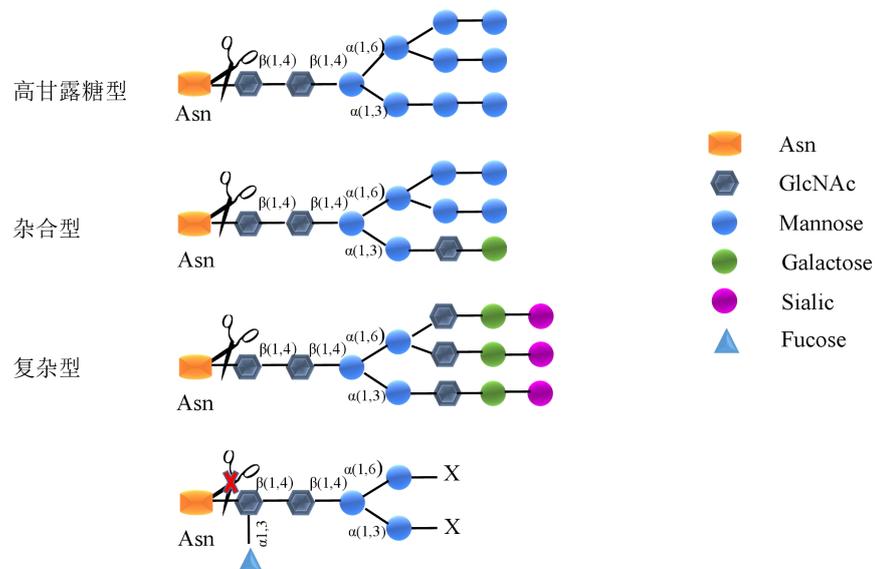


图 1. PNGase F 可以从糖蛋白或糖肽上切割释放几乎所有类型的 N-连糖链

但是对于 O-连聚糖，由于结构复杂多样且数量更多，其需要一系列糖苷酶组合使用从糖

链末端逐一切除修饰的单糖， α 2-3.6.8.9 Neuraminidase 释放所有直链或支链非还原末端的唾液酸残基， β 1-4 Galactosidase 水解寡糖链上的 β 1-4 连接的半乳糖残基， β -N-Acetylhexosaminisase 催化聚糖末端 β -D-N-乙酰半乳糖胺和葡萄糖胺残基的水解，直到将 *O*-连聚糖修剪成 Core 1 (Gal-GalNAc-*O*-S/T) 或和 Core 3 (GlcNAc-GalNAc-*O*-S/T) 结构，然后 *O*-Glycosidase 才能酶切释放 Gal-GalNAc 或和 GlcNAc-GalNAc 核心二糖结构，如图 2。此五种酶的组合不能酶切释放所有的 *O*-连聚糖，如罕见的 α -连接的半乳糖、 α -连接的岩藻糖、直接与蛋白质 *O*-连接的 N-乙酰葡萄糖胺（在核蛋白质上发现）、直接与蛋白质 α -连接的 N-乙酰半乳糖胺（在粘蛋白中发现）、直接与蛋白质 *O*-连接的岩藻糖及甘露糖等。

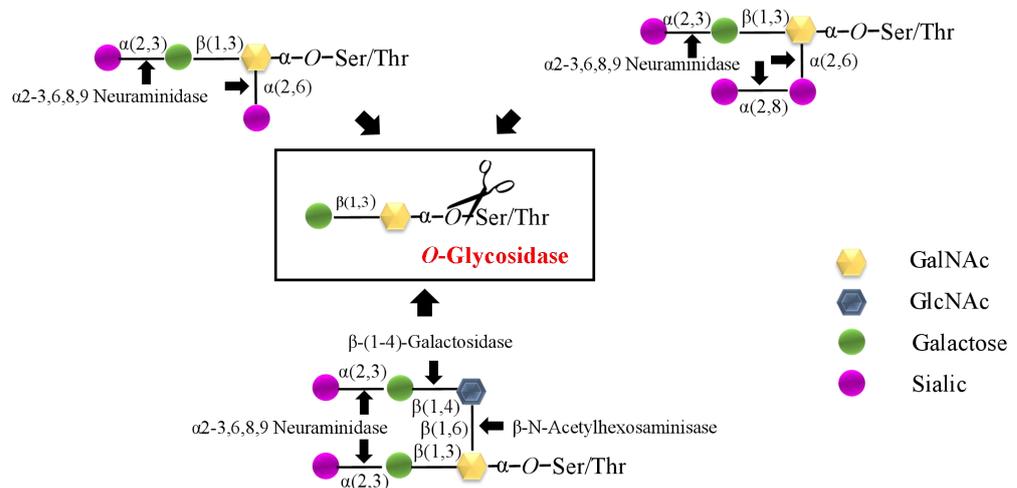


图 2. *O*-连糖链的释放需要通过一系列糖苷酶除去单糖，直到将它们修剪成 Core 1 (Gal-GalNAc-*O*-S/T) 或和 Core 3 (GlcNAc-GalNAc-*O*-S/T) 结构

应用

1. 聚糖结构分析
2. 结合位点及功能分析
3. 治疗性糖蛋白的表征及质量控制
4. 蛋白质组学分析，消除糖蛋白的异质性

特性

Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 具有稳定性高、比活性高等特点，是五种高度纯化和非常稳定的糖苷内切酶的组合，适用于蛋白质组学及糖生物学研究中糖蛋白上所有 N-连聚糖及相对比较复杂 *O*-连聚糖的有效释放。

- ✓ **高纯度：**没有污染蛋白酶/其它糖苷酶，纯度 $\geq 95\%$ ；
- ✓ **高稳定性：**每批 Kit III 试剂盒中酶及试剂都经过严格的质量控制，以实现高稳定性；
- ✓ **高比活性：**有效和完全的释放所有 N-连聚糖及部分相对比较复杂 *O*-连聚糖；
- ✓ **HPLC、MS 兼容：**试剂盒中所有的酶及试剂与下游 HPLC 及 MS 兼容；

操作方法

试剂准备

使用前, 请将 Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 及缓冲液试剂 10000rpm 离心 10 秒, 确保所有试剂都在管底。

变性条件下去糖基化方案

1. 取 10-100 μ g 糖蛋白溶液, 加入 3 μ l 10 \times Denaturing 缓冲液, 补加纯化水使得反应体系为 30 μ l;
2. 将上述 30 μ l 体系 100 $^{\circ}$ C 处理 10min, 使糖蛋白完全变性;
3. 室温冷却 5min;
4. 在上述变性体系中, 分别加入 5 μ l 10 \times Glyco 缓冲液 2、5 μ l 10% NP-40 溶液、1-2 μ l PNGase F(Glycerol-free)、1-2 μ l *O*-Glycosidase、1-2 μ l α 2-3.6.8.9Neuraminidase、1-2 μ l β 1-4 Galactosidase 及 1-2 μ l β -N-Acetylhexosaminisase, 补加纯化水至反应总体积为 50 μ l, 轻柔混匀;
5. 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 1-5hr;

注: 大多数糖蛋白样品在 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 1-5hr 后能够被完全去糖基化; 然而对于一些复杂的糖蛋白样品可能需要更长的反应时间。

非变性条件下去糖基化方案

1. 取 10-100 μ g 糖蛋白溶液, 加入 5 μ l 10 \times Glyco 缓冲液 2、1-2 μ l PNGase F(Glycerol-free)、1-2 μ l *O*-Glycosidase、1-2 μ l α 2-3.6.8.9Neuraminidase、1-2 μ l β 1-4 Galactosidase 及 1-2 μ l β -N-Acetylhexosaminisase, 补加纯化水至反应总体积为 50 μ l, 轻柔混匀;
2. 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 4-24hr;

注: 当对天然糖蛋白去糖基化时, 建议将等量糖蛋白样品进行变性后再同步进行酶切去糖基化实验, 作为阳性对照, 以确定非变性条件下去糖基化反应的程度。

数据分析

- 1) 评估糖蛋白糖基化程度及去糖基化程度最简单的方法是 SDS-PAGE, 去糖基化产物在凝胶上的迁移速度比糖基化底物快;
- 2) 试剂盒中提供的酶及缓冲试剂与下游 HPLC 及 MS 兼容, 如用于下游分析, 建议 MS 分析以前通过透析或微量离心进行脱盐处理。

操作说明

- 上述操作方法旨在为 Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 作为去糖基化试剂操作的一般指南, 对于不同的糖蛋白样品, 去糖基化活性高度依赖于反应条件, 建议进行适当优化或根据经验确定最优的操作方法;
- 反应体系可以线性放大或缩小;
- 本产品适用于天然或者变性糖蛋白, 当变性时, 大多数糖蛋白能更有效地去糖基化。对于天然糖蛋白的去糖基化, 可能需要更多的酶及更长的反应时间;
- 变性及非变性条件下的去糖基化处理方案得到的样品均与下游质谱兼容;
- Fetuin 是含有唾液酸化的 N-连及 *O*-连糖链的糖蛋白, 可用作有效的糖苷酶的阳性对照。
- 本试剂盒不建议用于粘蛋白样底物 (Mucin-like substrates) 的去糖基化;
- 本产品仅供研究使用, 不适用于人或动物诊断或治疗用途。

常见问题

此试剂盒与下游 HPLC 和/或质谱兼容吗？

Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 中所有酶的制剂配方均与下游 HPLC 和/或质谱应用兼容。配套糖蛋白变性缓冲液 (EB01) 含有 SDS, 与 HPLC 和/或质谱不能兼容, 且难以从反应体系中除去, 因此如果使用 HPLC 和/或质谱进行寡糖链或蛋白分析, 建议在非变性条件下进行去糖基化反应, 非变性条件下通常需要更多的酶及更长的反应时间。

用 Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 进行去糖基化反应后没有糖链释放, 是什么原因呢？

Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 包含了释放几乎所有 N-连糖链及常见的 core 1 及 core 3 O-连糖链的必要酶及缓冲试剂。

- 1) 当与 Asn 连接的核心 N-GlcNAc 被 α 1-3 岩藻糖 (通常在植物或昆虫蛋白质中发现) 修饰时, 会导致寡糖链对 PNGase F 有抗性作用, 此时需要使用 PNGase A;
- 2) 由于空间位阻效应 (蛋白质的二级或三级结构) 会阻碍 PNGase F 及 O-Glycosidase 到达正确的切割位点, 此时可能需要变性或者加入更多的酶及延长反应时间;
- 3) 样品缓冲体系的 pH 不宜过酸或过碱, 过酸过碱的 pH 环境均可能导致酶的失活, 建议使用低摩尔浓度、pH 中性的缓冲体系。
- 4) 确认您的靶标蛋白有被糖基化, 在不同组织, 生物体和/或生长阶段及不同的表达系统的各种变量都可能会导致蛋白糖基化程度的改变;
- 5) 如果释放的寡糖链分子量低, 尤其是从分子量大的蛋白质上释放较小分子量的寡糖链, 此时糖蛋白与去糖基化后的蛋白在 SDS-PAGE 上的迁移率很难区分。

对于天然糖蛋白样品的去糖基化, 应该采用多少 Protein Deglycosylation Kit III？

对于特定的糖蛋白底物, 由于糖基化的程度、多样性以及蛋白质的空间构象复杂性的不同, 在非变性条件下, 建议设计实验进行适当优化, 可能需要更多的酶及延长反应时间。对于一些复杂的糖蛋白样品, 在非变性条件下即使延长反应时间可能也只能部分去糖基化, 此时需要加入其它的酶。

Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 理想的对照底物是什么？

Fetuin 由于同时包含有唾液酸化的 N-连及 O-连糖链, 是使用本试剂盒理想的对照底物。

是否可以在 Protein Deglycosylation Kit III 去糖基化反应体系中加入蛋白酶抑制剂？

蛋白酶会干扰去糖基化实验的结果, 当蛋白质处于变性状态时, 它更容易被蛋白酶切割。因此, 以下蛋白酶抑制剂中的任何一种均可用于 Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III 去糖基化反应体系中:

抑肽酶 (终浓度 10 μ g/ml); 苯脲 (终浓度 1mM); 胃蛋白酶抑制剂 (终浓度 10 μ g/ml); 亮肽素 (终浓度 1 μ M); EGTA (终浓度 1mM); EDTA (终浓度 1mM);

各种蛋白酶抑制剂建议配制成 1000 \times 的浓缩母液。胃蛋白酶抑制剂溶解在甲醇溶液中, 其余均溶解在水中。

相关产品

产品名称	货号
PNGase F(Glycerol-free)	QPF-001
O-Glycosidase	QPF-004
α 2-3,6,8,9 Neuraminidase	QPF-005
β 1-4 Galactosidase	QPF-006
β -N-Acetylhexosaminidase	QPF-007
Protein Deglycosylation Kit I (for O-linked Glycans)	QPF-008
Protein Deglycosylation Kit II (for N-linked & Simple O-linked Glycans)	QPF-009
EndoS endoglycosidase	QPF-011
α 1-2 Fucosidase	QPF-013
α 1-2,4,6 Fucosidase	QPF-014
α 1-3,4 Fucosidase	QPF-015
Endo F1	QPF-016
Endo F3	QPF-017
α -N-乙酰半乳糖苷酶	QPF-018
Quick™ PNGase F -Plus	QPF-019
Immobilized PNGase F, Microspin	QPF-101
TransCOUPER™ 糖链重塑试剂盒	QPF-102
TransCOUPER™ 去岩藻糖链重塑试剂盒	QPF-103
TransCOUPER™ 叠氮活化试剂盒	QPF-104

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话: [0512-87663137](tel:0512-87663137)
- 技术支持: techserv@rhinobio.com

参考文献

-
- [1] Khoury, G.A., Baliban R.C., Floudas C.A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci. Rep.* 2011, 1, 1-5.
 - [2] Parekh, R.B., Dwek, R. A., Sutton, B. J, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG[J]. *Nature*, 1985(316): 452.
 - [3] Uchida, Y., Tsukada, Y. and Sugimori, T. Distribution of neuraminidase in *Arthrobacter* and its purification by affinity chromatography [J]. *Biochem*, 1977(82): 1425-33.
 - [4] Lazar, I. M., Lee, W., Lazar, and A.C. Glycoproteomics on the rise: Established methods, advanced techniques, sophisticated biological applications. *Electrophoresis*. 2013, 34, 113-25.
 - [5] Larsson EA, Olsson U, Whitmore CD, et al. Synthesis of reference standards to enable single cell metabolomic studies of tetramethylrhodamine-labeled ganglioside GM1 [J]. *Carbohydr Res.* 2007 Feb 26;342(3-4):482-9
 - [6] Epp A, Hobusch J, Bartsch YC, et al. Sialylation of IgG antibodies inhibits IgG-mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* [J]. 2017 Jul 18. pii: S0091-6749(17)31101-6. doi: 10.1016/j.jaci. 2017.06.021.
 - [7] Singh AK, Osman AS, Woodiga SA, et al. Defining the role of pneumococcal neuraminidases and *O*-glycosidase in pneumococcal hemolytic uremic syndrome [J]. *Journal of Medical Microbiology*. 2016, 65 (9).
 - [8] Cohen M, Elkabets M, Perlmutter M, et al. Sialylation of 3-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma determines antitumor immune responses during immunoediting[J]. *Immunol.* 2010, 185(10):5869-78.
 - [9] Malakhov MP, Aschenbrenner LM, Smee DF, et al. Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection[J]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, 50(4):1470-9.
 - [10] Kazuaki, O., Jamey, D, M. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease [J]. *Cell*, 2006, 126(5): 855-867.
 - [11] Wilkins, P.P., et al. Structures of the *O*-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells [J]. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 18732-18742.
 - [12] Glasgow, L.R., et al. Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus pneumonia* [J]. *J. Biol. Chem.* 1977, 252: 8615-8623.
 - [13] Jiang, M.S., and Hart, G. W. A subpopulation of estrogen receptors are modified by *O*-linked N-acetylglucosamine [J]. *J. Biol. Chem.* 1977, 272: 2421-2428.
 - [14] Stults, N.L., and Cummings, R.D. *O*-linked fucose in glycoprotein from Chinese hamster ovary cells [J]. *Glycobiology*, 1993, 3: 589-596.
 - [15] Chiba, A., et al. Structures of sialylated *O*-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve a-dystroglycan. The role of a novel *O*-Mannosyl-type oligosaccharide in the binding of a-dystroglycan with laminin[J]. *J. Biol. Chem.*, 1977, 272: 2156-2162.
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址: www.rhinobio.com
电 话: 0512-87663137
邮 箱: techserv@rhinobio.com



公众号



联系客服

