

Instructions

Rhinogen[®] O-Glycosidase

适用于蛋白质组学及糖生物学研究中糖蛋白上 O-连寡糖链的有效释放

产品货号：QPF-004-A, QPF-004-B

目 录

目 录	1
产品包装及保藏条件	2
试剂包装	2
产品来源	2
产品质量	2
产品特性	2
酶活定义	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
变性条件下糖蛋白去糖基化	5
非变性条件下糖蛋白去糖基化	5
数据分析	5
操作说明	6
常见问题	7
相关产品	8
联系我们	9
参考文献	9

产品包装及保藏条件

试剂包装

Rhinogen® *O*-Glycosidase 包装规格如下:

目录号	规格	浓度
QPF-004-A	1,200,000U/30μl	40,000,000U/ml
QPF-004-B	5 × 1,200,000U/30μl	40,000,000U/ml

Rhinogen® *O*-Glycosidase 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

QPF-004 储存在缓冲液中, 以液体的形式提供。缓冲液的组成为: 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5。

产品来源

Rhinogen® *O*-Glycosidase 是一种将来源于 *Enterococcus Faecalis* 的 *O*-Glycosidase 基因重组并表达于大肠杆菌 BL21 中的重组酶, 分子量大小约为 147kDa。

产品质量

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

产品特性

最适反应 pH 为 7.5; 热失活条件: 65 °C 处理 10 min。

酶活定义

1个酶活力单位定义: 在100 μl反应体系中, 37 °C, pH7.5条件下, 1hr内从5mg唾液酸酶消化后的非变性fetuin 上催化释放0.68nmol *O*-连二糖所需要的酶量。

1U Rhinogen® *O*-Glycosidase =1 unit NEB *O*-Glycosidase。

保藏条件

采用冰袋运输, 收到产品后请立即将酶及配套试剂储存在-20°C条件下, 避免反复冻融。

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^[1]。蛋白质糖基化作为生物体内最重要的蛋白质翻译后修饰形式之一^[2]，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^[3]、免疫应答等等在内的各种重要生命活动^[4]。在多种疾病，如肿瘤^[5]（FDA 已批准的用于癌症疾病诊断和监控的生物标志物中大部分是糖蛋白^[6]）、神经退行性疾病、心血管病、代谢性疾病、免疫性疾病^[7]及感染性疾病^[8]的发生发展中均伴随着蛋白质糖基化程度及糖链结构异常的发生。此外，糖基化还显著影响生物治疗剂的生物活性、靶标、运输、血清半衰期、清除率及受体识别等性质。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，而单克隆抗体通过 ADCC 介导功效的能力受 Fc 区岩藻糖含量的影响^[9]，因此蛋白质糖基化研究是继核酸、蛋白质之后生命科学中又一极具潜力的研究领域，具有重要理论及应用意义。FDA 要求所有类型的糖蛋白都需要进行糖型分析。

概述

来源于 *Streptococcus Pneumoniae*（或 *Enterococcus Faecalis*）的 *O*-糖苷酶（*O*-Glycosidase, EC 3.2.1.97）是一类重要的糖基化研究的工具酶。Rhinogen® *O*-Glycosidase 是将来源于 *Enterococcus Faecalis* 的 *O*-Glycosidase 基因重组并表达于大肠杆菌 BL21 中的重组酶，能够将糖蛋白中 Ser 或 Thr 残基的羟基连接的 Core 1（Gal-β(1-3)-GalNAc-）及 Core 3（GlcNAc-β(1-3)-GalNAc-）*O*-连双糖释放下来^[10]，如图 1。该酶对 α-GalNAc 结合是特异性的，但对于 Ser 或 Thr 残基没有明显的偏好，同时糖蛋白的变性与否也不显著影响 *O*-去糖基化的效率。核心结构的任何修饰都可以阻断 *O*-Glycosidase 的作用，最常见的修饰是核心结构的单、二或三唾液酸化。除此以外，核心结构还可能被岩藻糖，N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺残基进一步取代修饰，核心结构以外的单糖必须通过一系列外切糖苷酶依次切割，直到仅保留 Core 1 或 Core 3 二糖核心。然后 *O*-Glycosidase 才能够完整的从 Ser 或 Thr 残基上释放二糖核心，如图 2。通常 *O*-Glycosidase 的使用都需要配合唾液酸酶^[11]。

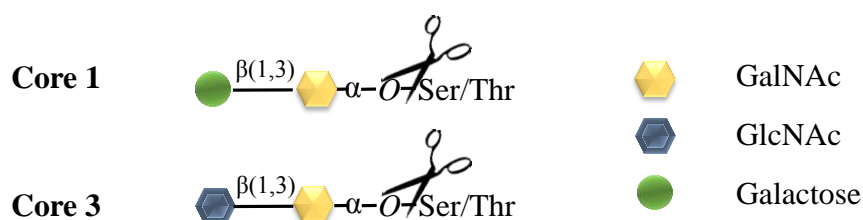


图 1 Rhinogen® *O*-Glycosidase, Recombinant 作用 *O*-连二糖核心的类型

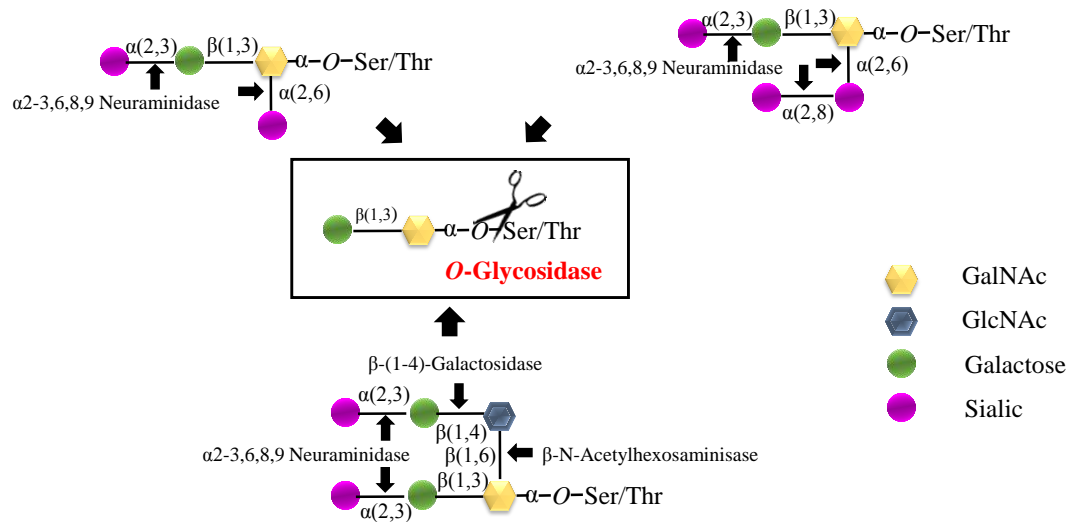


图 2 复杂 O-聚糖结构的糖链释放

应用

1. O-聚糖结构分析；
2. 糖蛋白生物合成分析；
3. 涉及 O-聚糖的病理生理学研究；
4. 治疗性重组蛋白的表征及质量控制；
5. 癌症研究和异常 O-糖基化的鉴定及体外诊断。

特性

Rhinogen® O-Glycosidase 是一种高度纯化和非常稳定的内切糖苷酶，具有稳定性高、比活性高等特点。适用于蛋白质组学及糖生物学研究中糖蛋白上 O-连寡糖链的有效释放。

- ✓ **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 Rhinogen® O-Glycosidase 产品都经过严格的质量控制，以实现产品批间稳定性；
- ✓ **高比活性：** 有效和完全的释放 O-连聚糖。

操作方法

试剂准备

使用前，请将 Rhinogen® *O*-Glycosidase 试剂取出，10000rpm 离心 10 秒，确保所有试剂都在管底。

注意：准备同时使用的 Neuraminidase。

瑞安提供 Rhinogen® α -2,3,6,8,9 Neuraminidase（货号 QPF-005），详情请咨询 techserv@rhinobio.com，或者登录公司官网 www.rhinobio.com 查询。

反应试剂：将-20℃储存的 10×Denaturing 缓冲液、10×Glyco 缓冲液 2 及 10%NP-40 溶液取出，待用。

注意：根据实验需要，准备相应的试剂，如非变性条件下进行去糖基化反应，不需要准备 10×Denaturing 缓冲液及 10% NP-40 溶液。

变性条件下糖蛋白去糖基化

1. 取 10-100 μ g 糖蛋白溶液，加入 1 μ l 10×Denaturing 缓冲液，补加纯化水使得反应体系为 10 μ l；
2. 将上述 10 μ l 体系在 100℃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，加入 2 μ l 10×Glyco 缓冲液 2、2 μ l 10% NP-40 溶液、2 μ l Neuraminidase、纯化水及 1-4 μ l Rhinogen® *O*-Glycosidase，使得总反应体积为 20 μ l，轻柔混匀；
5. 37℃条件下反应 1-4hr。

注意：对于不同的糖蛋白样品，需要实验摸索最适的酶浓度及反应时间。

非变性条件下糖蛋白去糖基化

1. 取 10-100 μ g 糖蛋白底物溶液，加入 2 μ l 10×Glyco 缓冲液 2，2 μ l Neuraminidase、纯化水及 1-4 μ l Rhinogen® *O*-Glycosidase，使得总反应体积为 20 μ l，轻柔混匀；
2. 37℃条件下反应 1-4hr。

注意：通常情况下，糖蛋白变性与否不显著影响 *O*-连糖链去除的效率，但也不排除个别，建议根据自己的底物特性，选择合适的方法。

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. 如果天然及脱-*O*-糖基化蛋白质分子大小在凝胶上的差异足以进行区分，则 SDS-PAGE 可以用来评估糖蛋白糖基化程度及去糖基化程度；
2. 对于大多数糖蛋白，*O*-糖链数目相对较少，此时可以考虑通过去蛋白沉淀、浓缩、过柱脱盐、再浓缩后利用 HPAEC-PAD 色谱法检测游离糖。

操作说明

- 上述操作方法旨在为 Rhinogen® *O*-Glycosidase 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；
- 去糖基化体系可以线性放大或缩小；
- 由于变性缓冲液中含有 SDS，而 SDS 会抑制 Rhinogen® *O*-Glycosidase 的活性，因此在变性糖蛋白反应体系中需加入终浓度为 1% 的 NP-40，其能有效解除 SDS 对 *O*-Glycosidase 酶活的抑制；
- 必须先去除 *O*-连寡糖非还原末端唾液酸残基，以使 *O*-Glycosidase 有效切割 *O*-连接的二糖核心，因此必须同时用 Neuraminidase 及 *O*-Glycosidase 处理糖蛋白。瑞安同时提供单独包装的 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase (QPF-005) 及 Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit I (for *O*-linked Glycans) (QPF-008)；
- 本产品适用于天然或者变性糖蛋白，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；
- EDTA、对氯丙基苯磺酸、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对 *O*-Glycosidase 的酶活有一定的抑制作用，1mM 各物质存在条件下，酶活回收率分别为 63%、60%、44%、66%；
- 本产品仅供研究使用，不适用于人或动物的诊断及治疗用途。

常见问题

使用 O-Glycosidase 处理糖蛋白后，没有看到糖链的去除，可能的原因？

蛋白质的糖基化修饰有 N-糖基化及 O-糖基化修饰，O-Glycosidase 适用于释放附着于 Ser / Thr 的 Core 1 和 Core 3 O-连接的二糖核心。如果底物中确定含有 O-糖链，请确保同时使用 Neuraminidase，以释放末端的唾液酸修饰基团。同时由于空间位阻效应（蛋白质的二级结构和三级结构）可以阻碍内切糖苷酶到达其底物作用位点，在去糖基化之前进行变性，同时按实验操作加入 NP-40 溶液有助于 O-连聚糖有效的释放。如果不想变性处理，则考虑添加更多的酶或延长孵育时间。

在天然条件下释放糖蛋白的糖链，需要使用多少 Rhinogen® O-Glycosidase？

当蛋白质不变性时，O-Glycosidase 因为空间位阻效应可能难以到达糖链的切割位点（因为二级和三级蛋白质结构）。添加更多的酶量及延长反应时间可能有助于糖链释放效率的提高，但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。

如何抑制 O-Glycosidase 的活性？

SDS 是 O-Glycosidase 酶活的有效抑制剂。

是否可以同时使用 PNGase F、O-Glycosidase 及 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase？

是的。Rhinogen® PNGase F 及 O-Glycosidase 采用相同的缓冲液及反应条件，而 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 具有非常宽 pH 适用范围（pH4.5-8.5），在 PNGase F 及 O-Glycosidase 反应体系中具有较好的活性，三者可以同时使用。

相关产品

产品名称	货号
Rhinogen® PNGase F (Glycerol-free)	QPF-001
Rhinogen® PNGase F	QPF-002
Rhinogen® Quick™ PNGase F	QPF-003
Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase	QPF-005
Rhinogen® β 1-4 Galactosidase	QPF-006
Rhinogen® β -N-Acetylhexosaminidase	QPF-007
Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit I (for <i>O</i> -linked Glycans)	QPF-008
Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit II (for N-linked & Simple <i>O</i> -linked Glycans)	QPF-009
Rhinogen® Protein Deglycosylation Kit III (for N-linked & Complex <i>O</i> -linked Glycans)	QPF-010

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: [+86 \(0\)21-60878333-8093](tel:+86(0)21-60878333-8093)
- 技术支持: bio@titansci.com

参考文献

-
- [1] Kazuaki, O., Jamey, D, M. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease [J]. Cell, 2006, 126(5): 855-867.
- [2] 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.
- [3] Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct [J]. Glycobiology, 1993, 3(2): 97-130.
- [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] Hua, S., Saunders, M., Dimapasoc, L. M., et al. Differentiation of cancer cell origin and molecular subtype by plasma membrane N-glycan profiling [J]. J Proteome Res, 2014, 13(2): 961-8
- [6] Pan, S., Chen, R., Aebersold, R. & Brentnall, T.A. Mass spectrometry-based glycoproteomics—from a proteomics perspective. Mol. Cell Proteomics 10, R110 003251 (2011).
- [7] Waldmann, T. A. Immunotherapy: past, present and future [J]. Nature medicine, 2003, 9(3): 269-77.
- [8] Peracaula, R., Barrabes, S., Sarrats, A., et al. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis [J]. Dis Markers, 2008, 25(4-5): 207-18.
- [9] Li, H., d'Anjou, M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. Curr.Opin. Biotechnol. 2009,, 20, 678-84.
- [10] Fujita K, et al. Identification and Molecular Cloning of Novel Glycoside Hydrolase Family of Core 1 Type O-Glycan-Specific Endo-Alpha-N-Acetylgalacto-saminidase from *Bifidobacterium longum* [J]. Biol. Chem. 280(45) 2005:37415-37422; doi: 10. 1074/jbc. M506874200.
- [11] 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).
-