

Instructions

## Rhinogen<sup>®</sup> 固定化 PNGase F 离心柱

Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized PNGaseF · Microspin

不含甘油，酶切体系与 HPLC 及 MS 工作流程环境兼容，适用于蛋白质组学及糖生物学研究中糖蛋白上 N-连寡糖链的有效释放

产品货号：QPF-101-A、QPF-101-B、QPF-101-C

## 目 录

目 录 .....	1
产品信息 .....	2
试剂包装 .....	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
变性条件下糖蛋白样品去糖基化 .....	5
非变性条件下糖蛋白去糖基化 .....	6
反应产物分析 .....	6
操作说明 .....	7
常见问题 .....	8
相关产品 .....	9
联系我们 .....	10
参考文献 .....	10

## 产品信息

试剂包装 Rhinogen® Immobilized PNGase F, Microspin 包装规格如下:

目录号	组成
	<b>Immobilized PNGaseF, Microspin</b>
QPF-101-A	1 支
QPF-101-B	5 支
QPF-101-C	10 支

一支 Immobilized PNGase F, Microspin 可用于 0.2mg 糖蛋白的 N-聚糖去除。

产品储存于 20%乙醇中，不添加防腐剂。

Rhinogen® Immobilized PNGase F, Microspin 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

产品特性 固定化 PNGase F 是一种树脂，其中 PNGase F（肽 N-糖苷酶 F）酶与琼脂糖珠共价偶联，用于去除抗体、融合蛋白和其他 N-糖基化蛋白上的 N-聚糖。该酶重组表达自大肠杆菌中，序列来源于 *Flavobacterium meningsepticum*。  
每支 Immobilized PNGase F, Microspin 柱含有足够的材料来去除 0.2mg 糖蛋白中的 N-聚糖。

酶活定义 在 37°C，pH8.6 的 TBS 中反应 1h，0.05 ml Immobilized PNGase F 能从 0.2 mg 依那西普中水解 ≥95% 的 N-聚糖，通过 SDS-PAGE 检测。

保藏条件 采用冰袋运输，Immobilized PNGase F, Microspin 产品储存于 20%乙醇中，收到产品后请立即将固定化酶置于 2-8°C 保存，避免冻存！配套试剂置于 -20°C 保存

## 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>，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<sup>[3]</sup>、免疫应答等等在内的各种重要生命活动<sup>[4]</sup>。在多种疾病，如肿瘤<sup>[5]</sup>（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<sup>[6]</sup>）、神经退行性疾病、心血管病、代谢性疾病、免疫性疾病<sup>[7]</sup>及感染性疾病<sup>[8]</sup>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<sup>[9]</sup>，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 *Flavobacterium meningsepticum* 的肽 N-糖苷酶 F（PNGase F，EC 3.5.1.52）是从糖蛋白中特异性除去 N-连聚糖的糖苷内切酶，是一类重要的糖基化研究的工具酶<sup>[10,11]</sup>，被广泛用于治疗性蛋白质上 N-连糖链位点、结构信息及功能关系的研究。Rhinogen® PNGase F (Glycerol-free)是表达于大肠杆菌 BL21 中的重组 PNGase F，能够将绝大多数 N-糖链（除含  $\alpha$ -1,3 连接的核心岩藻糖<sup>[12]</sup>，常见于植物及昆虫糖蛋白）完整地从此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<sup>[13]</sup>，释放出完整的寡糖链，如图 1A。在释放糖链的同时将氨基酸特征序列上的天冬酰胺残基转化为天冬氨酸残基，其赋予蛋白质+1Da 质量变化，如图 1B。它对多种底物具有高度活性，包括纯化的糖蛋白和人血清糖蛋白的复合混合物。此外，由于不含甘油，在非变性条件下，酶与 HPLC 及质谱工作流程环境兼容。连接到 N-连寡糖的磷酸盐，硫酸盐和唾液酸基团不影响 N-糖链的释放<sup>[14]</sup>。

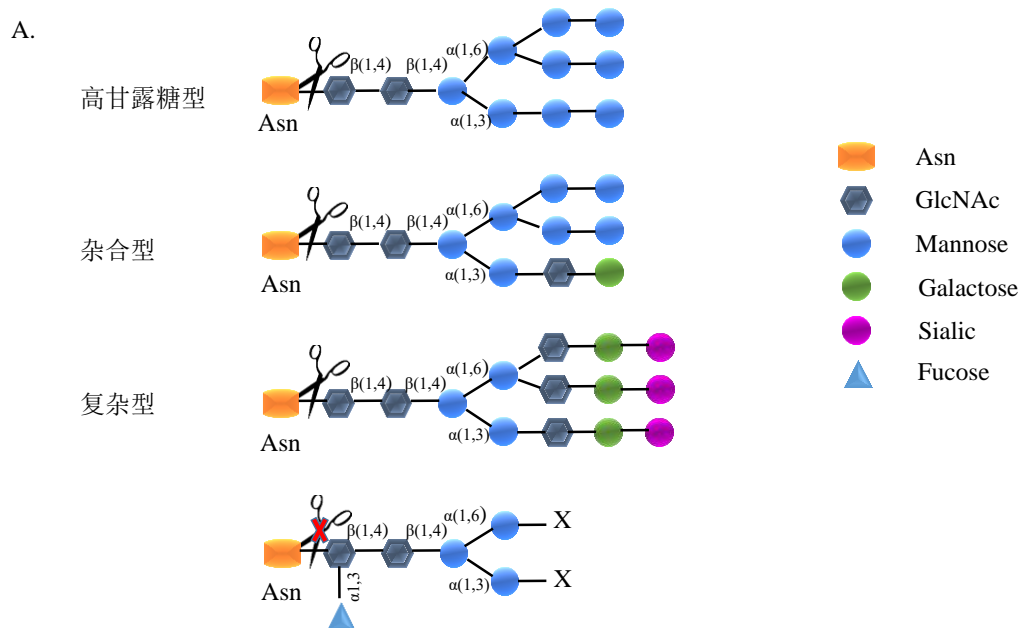


图 1A. PNGase F 切割位点

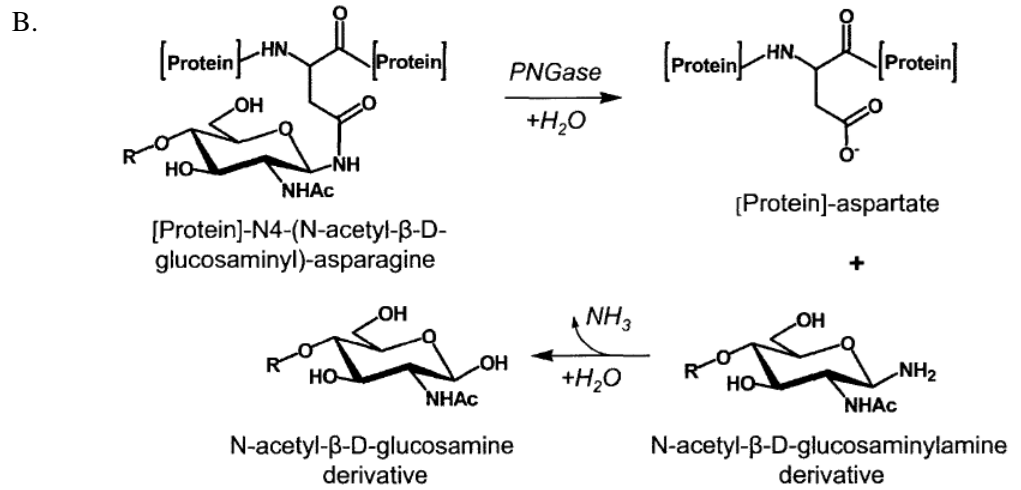


图 1B. PNGase F 释放糖链的反应机制<sup>[15]</sup>

应用

1. 从糖肽及糖蛋白上释放完整的 N-连聚糖；
2. 表征蛋白质是否糖基化；
3. 用于分子量检测或晶体学研究时去糖基化蛋白质的制备；
4. N-糖基化糖蛋白的结构-功能研究；
5. 糖基化位点的确定。

特性

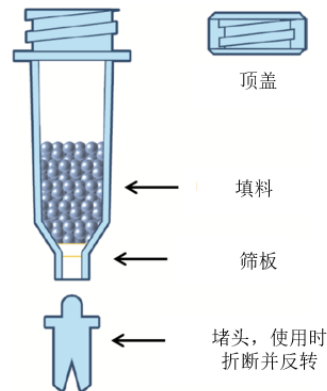
Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized PNGase F, Microspin 适用于蛋白质组学及糖生物学研究中糖蛋白上 N-连寡糖链的有效释放，具有如下特性：

- ✓ **高稳定性：** 每批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 N-连聚糖；
- ✓ **与下游 HPLC、质谱兼容：** 不含甘油，酶切体系与 HPLC 及质谱工作流程环境兼容。

## 操作方法

### 试剂准备

本产品包含一种用于去除糖蛋白上 N-连寡糖链的 Immobilized PNGase F, Microspin。离心柱的结构如下图：



需自备物料如下：

收集管：1.5-2ml 透明 EP 管。

### 变性条件下 糖蛋白样品 去糖基化

#### 变性样品制备：

- 取不超过 200 $\mu$ g 糖蛋白溶液，加入 10 $\mu$ l 10 $\times$ Denaturing 缓冲液，补加纯化水使得反应体系为 100 $\mu$ l；
- 将上述 100 $\mu$ l 体系 100 $^{\circ}$ C 处理 10min，使糖蛋白完全变性；
- 室温冷却 5min；
- 在上述变性体系中，加入 20 $\mu$ l 10 $\times$ Glyco 缓冲液 2、20 $\mu$ l 10% NP-40 溶液、以及纯化水，使得总反应体积为 200 $\mu$ l，轻柔混匀；

#### 柱平衡

- 折断 Immobilized PNGase F, Microspin 堵头，将离心柱放入收集管中，拧松顶盖。200 $\times$ g 离心 1 分钟去除储存液；  
备注：堵头请勿丢弃，后续需多次使用。
- 加入 300 $\mu$ l 1 $\times$ Glyco 缓冲液 2 平衡离心柱，200 $\times$ g 离心 1 分钟，重复 2 次；离心结束后堵上堵头。

#### 消化

- 将处理后的糖蛋白样品（0.2mg in 100-200 $\mu$ l）加到离心柱中，并盖好顶盖，颠倒混合，确保柱内有流动，以使底物与固定化酶充分结合；
- 37 $^{\circ}$ C 条件下 650rpm 或颠倒混匀反应 1-3h。

备注：对于不同的糖蛋白样品，需要实验摸索最适的底物浓度及反应时间。

#### 酶切产物收集

- 取下堵头，将离心柱放入收集管中，轻轻打开顶盖，1000 $\times$ g 离心 1 分钟收集抗体酶切片段。
- 为获得最大回收率，加入 100 $\mu$ l 1 $\times$ Glyco 缓冲液 2，颠倒混匀后，1000  $\times$ g 离心 1 分

钟。重复 2 次。

备注：酶切产物第一次离心收集，回收率 > 85% 以上；增大回收率的步骤会导致样品浓度稀释，若需要较高浓度酶切产物，则不建议多次洗涤收集。

非变性条件下糖蛋白去糖基化

**非变性样品制备：**

- 取不超过 200µg 糖蛋白溶液，加入 10-20µl 10×Glyco 缓冲液 2，补加纯化水使得反应体系为 100-200µl。

**柱平衡**

- 折断 Immobilized PNGase F, Microspin 堵头，将离心柱放入收集管中，拧松顶盖。200×g 离心 1 分钟去除储存液；

备注：堵头请勿丢弃，后续需多次使用。

- 加入 300µl 1×Glyco 缓冲液 2 平衡离心柱，200×g 离心 1 分钟，重复 2 次；离心结束后堵上堵头。

**消化**

- 将处理后的糖蛋白样品（0.2mg in 100-200µl）加到离心柱中，并盖好顶盖，颠倒混合，确保柱内有流动，以使底物与固定化酶充分结合；
- 37°C 条件下 650rpm 或颠倒混匀反应 4-24h。

备注：对于不同的糖蛋白样品，需要实验摸索最适的底物浓度及反应时间。

**酶切产物收集**

- 取下堵头，将离心柱放入收集管中，轻轻打开顶盖，1000×g 离心 1 分钟收集抗体酶切片段。
- 为获得最大回收率，加入 100µl 1×Glyco 缓冲液 2，颠倒混匀后，1000 ×g 离心 1 分钟。重复 2 次。

备注：酶切产物第一次离心收集，回收率 > 85% 以上；增大回收率的步骤会导致样品浓度稀释，若需要较高浓度酶切产物，则不建议多次洗涤收集。

**注意：**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。

反应产物分析

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. 变性条件下的反应产物经回收，可以使用蛋白酶等消化、浓缩和纯化后用于下游质谱分析；
3. 非变性条件下，由于 Rhinogen® Immobilized PNGase F, Microspin 不含甘油，去糖基化处理后的样品与下游质谱分析兼容，直接进行胰蛋白酶消化后去盐即可用于下游质谱分析。

---

## 操作说明

- 上述操作方法旨在为 Rhinogen<sup>®</sup> Immobilized PNGase F, Microspin 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；
  - 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，可能需要更长的反应时间；
  - 本产品不能裂解含  $\alpha$ -1,3 岩藻糖核心的寡糖链（常见于植物及昆虫糖蛋白，此时需要使用 PNGase A）；
  - RNase B 在变性条件下是有效的阳性对照底物；
  - 由于变性缓冲液中含有 SDS，而 SDS 会抑制 PNGase F 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 PNGase F 酶活的抑制；
  - 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

**PNGase F** 去糖基化后得到什么产物？

利用 Rhinogen® Immobilized PNGase F, Microspin 进行糖蛋白去糖基化后，会释放出完整的寡糖链，并在释放糖链的同时将氨基酸特征序列上的天冬酰胺残基转化为天冬氨酸残基。

为什么蛋白被降解了？是否可以在 **PNGase F** 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。下列蛋白酶抑制剂中的任何一种均可用于 Rhinogen® Immobilized PNGase F, Microspin 去糖基化反应体系中：

- 抑肽酶（终浓度 10µg/ml）
- 苯脲（终浓度 1mM）
- 胃蛋白酶抑制剂（终浓度 10µg/ml）
- 亮肽素（终浓度 1µM）
- EGTA（终浓度 1mM）
- EDTA（终浓度 1mM）

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

**PNGase F** 在含有尿素的反应体系中是否可以正常使用？

有文献报道，PNGase F 在 37°C 条件下，在 2.5M 尿素溶液中可以稳定 24hr，在 5M 尿素溶液中可以保留 40% 的活性<sup>[16]</sup>。因此反应体系中存在较低浓度的尿素可能不影响 Rhinogen® Immobilized PNGase F, Microspin 去糖基化的活性。

对于天然糖蛋白，我应该去除糖蛋白上的寡糖链？

当糖蛋白不用 SDS 变性时，由于空间位阻效应（二级和三级蛋白质结构），Rhinogen® Immobilized PNGase F, Microspin 相对很难到达寡糖链的切割位点。在酶用量固定的基础上，更长的反应时间有助于提高酶去除寡糖链的效率，但每种糖蛋白都有其特异性，必须根据实验或者经验确定。

表面活性剂是否会抑制外切糖苷酶/糖苷内切酶活性？

离子及非离子型表面活性剂在 0.5-1.0% 浓度范围时，大多数糖苷酶都不受或受到较小影响。但 PNGase F、O-Glycosidase 及 β1-4 Galactosidase 这 3 种酶会受到 SDS 的抑制，必须加入 1% 终浓度的 NP-40 到反应混合物中才能解除抑制。

## 相关产品

产品名称	货号
Rhinogen® PNGase F	QPF-002
Rhinogen® Quick™ PNGase F	QPF-003
Rhinogen® <i>O</i> -Glycosidase	QPF-004
Rhinogen® $\alpha$ 2-3,6,8,9 Neuraminidase	QPF-005
Rhinogen® $\beta$ 1-4 Galactosidase	QPF-006
Rhinogen® $\beta$ -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](mailto: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] Kaji, H., Saito, H., Yamauchi, Y., et al. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins [J]. Nature biotechnology, 2003, 21(6): 667-72.
  - [11] Geyer, H., Geyer, R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2006, 1764(12): 1853-69.
  - [12] Tretter, V., Altmann, F., März, L. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached  $\alpha$ -1, 3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. Eur. J. Biochem. 1991, 199(3), 647-52.
  - [13] Elder, J.H., Alexander, S. Endo-beta-N-acetylglucosaminidase F: Endoglycosidase from Flavobacterium meningosepticum that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982, 79: 4540-4.
  - [14] Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L. and T. H. Plummer. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Anal Biochem 1989, 180(2): 195-204.
  - [15] Wang, T., Voglmeir, J. PNGases as valuable Tools in Glycoprotein Analysis. Protein & Peptide Letters. 2014, 21: 976-85.
  - [16] Maley, F., et al, Anal Biochem, 1989, 180:195-204.
-