



产品使用说明书

Rhinogen[®] Protein Deglycosylation Kit I (for O-linked Glycans)

货号：QPF-008



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 Kit1 (for O-linked Glycans)包装规格如下:

目录号	组成	规格	体积
QPF-008	O-Glycosidase	1,200,000U	30µl
	α2-3,6,8,9 Neuraminidase	0.6U	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: O-Glycosidase基因来源于*Enterococcus Faecalis*, 分子量为147kDa; α2-3,6,8,9 Neuraminidase基因来源于*Arthrobacter ureafaciens*, 分子量为66KDa。

产品质量

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

采用干冰运输, 收到产品后请立即将酶及缓冲液试剂储存在-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。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，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、免疫应答等等在内的各种重要生命活动。在多种疾病，如肿瘤（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）、神经退行性疾病、心血管病、代谢性疾病、免疫性疾病及感染性疾病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，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

Rhinogen[®] Protein Deglycosylation Kit I (for *O*-linked Glycans) 包含 *O*-Glycosidase 及 α -2,3,6,8,9 Neuraminidase，二者均是重要的糖基化研究的工具酶，组合用于糖蛋白 *O*-连糖链的酶切释放。Rhinogen[®] *O*-Glycosidase 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，如图 1。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。Rhinogen[®] α -2,3,6,8,9 Neuraminidase 能够释放 *O*-连糖链非还原末端 α (2,3)-, α (2,6)-, α (2,8)-, α (2,9)-唾液酸残基，如图 2，不同唾液酸残基的释放速率大致为 α (2,6)- > α (2,3)- > α (2,8)- > α (2,9)-。唾液酸酶的这种组合模式使得 *O*-连糖链的酶切释放更彻底。该 Kit 包含的所有酶及试剂均与下游 HPLC 及 MS 兼容。

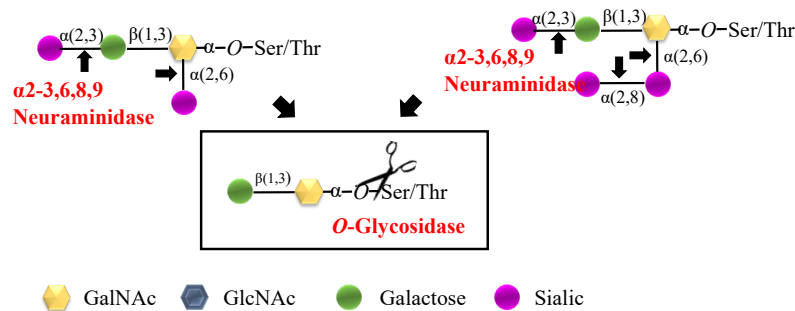


图 1. *O*-Glycosidase 与 α -2,3,6,8,9 Neuraminidase 组合用于 *O*-连糖链的酶切释放

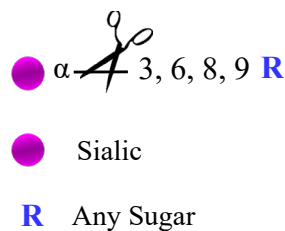


图 2. Rhinogen[®] α -2,3,6,8,9 Neuraminidase 作用位点

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 I (for *O*-linked Glycans) 具有稳定性高、比活性高等特点，是两种高度纯化和非常稳定的糖苷酶的组合，适用于蛋白质组学及糖生物学研究中糖蛋白上常见 *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 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：** 有效释放糖蛋白 *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 I (for *O*-linked Glycans) 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 1 μ l 10 \times 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 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 2 μ l 10 \times Glyco 缓冲液 2、2 μ l 10% NP-40 溶液、2 μ l α 2-3.6.8.9Neuraminidase、1-4 μ l *O*-Glycosidase，补加纯化水至反应总体积为 20 μ l，轻柔混匀；
5. 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 1-4hr。

注：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。

非变性条件下去糖基化方案

1. 取 10-100 μ g 糖蛋白溶液，加入 2 μ l 10 \times Glyco 缓冲液 2、纯化水及 1-4 μ l *O*-Glycosidase、2 μ l α 2-3.6.8.9Neuraminidase，使得总反应体积为 20 μ l，轻柔混匀；
2. 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 1-4hr。

注：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，但也不排除个例，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® Protein Deglycosylation Kit I (for *O*-linked Glycans) 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；
- 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

此试剂盒与下游 HPLC 及 MS 兼容吗？

是的，Rhinogen[®] Protein Deglycosylation Kit I (for *O*-linked Glycans) 所有的酶及缓冲试剂均与下游 HPLC 及 MS 应用兼容。可以采用微透析或微量过滤制备 HPLC 及 MS 分析的蛋白。

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酶切位点（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。

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
PNGase F(Glycerol-free)	QPF-001
<i>O</i> -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 <i>O</i> -linked Glycans)	QPF-008
Protein Deglycosylation Kit II (for N-linked & Simple <i>O</i> -linked Glycans)	QPF-009
Protein Deglycosylation Kit III (for N-linked & Complex <i>O</i> -linked Glycans)	QPF-010
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] 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).
-

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

