



Instructions

Rhinogen[®] O-糖蛋白酶

Rhinogen[®] O-Glycoprotease

适用于 O-糖基化位点及 O-糖结构分析

产品货号：QIP-008

目 录

目 录	1
产品信息	2
试剂包装	2
产品来源	2
产品特性	2
产品质量	2
酶活定义	2
保藏条件	2
产品综述	3
背景	3
概述	3
应用	3
操作方法	4
实验准备	4
糖蛋白消化	4
注意事项	4
常见问题	5
相关产品	6
联系我们	7
参考文献	7

产品信息

试剂包装 Rhinogen® *O*-糖蛋白酶 (*O*-Glycoprotease) 包装规格如下:

目录号	规格	制剂
QIP-008-A	2000U	冻干于 20mM Tris-HCl, 40g/L 甘露醇, pH7.6, 不添加防腐剂

配套提供的 Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase (EDTA-free) 包装规格如下:

目录号	规格	制剂
QPF-012-A	0.6U/30 μ l	50mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.5 at 25° C)

配套提供的试剂如下:

目录号	试剂	成分
EB10	10 \times Glyco 缓冲液 3	200mM Tris, pH6.8

产品来源 *O*-糖蛋白酶序列来源于 *Akkermansia muciniphila*, 重组表达于 *E. coli*, 理论分子量约 42KD, C 端带 6 \times His 标签。

α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 序列来源于 *Arthrobacter ureafaciens*, 重组表达于 *E. coli*, 理论分子量约 66KD。

产品特性 *O*-糖蛋白酶 (*O*-Glycoprotease) 是一种 *O*-糖蛋白特异性内切蛋白酶, 可催化天然黏蛋白型 *O*-糖基化蛋白中与 *O*-聚体直接相邻的肽键的水解, 位点在 *O*-糖基化丝氨酸和苏氨酸残基的N端。

产品质量
 ✓ **高纯度:** 通过 SDS-PAGE 检测, *O*-糖蛋白酶纯度 \geq 90%, α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 纯度 \geq 95%;
 ✓ **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。

酶活定义 与 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 搭配使用, 在 20mM Tris-HCl, pH6.8 条件下, 37°C 孵育 2 小时, 1 单位酶 (1U) 可消化 1 μ g 糖蛋白 (TNFR) 的 \geq 90%, 通过 SDS-PAGE 确认。

保藏条件 采用冰袋运输, 长期储存请置于-20°C, 重悬后 2-8°C 可保存 1 个月。避免反复多次冻融。

产品综述

背景

O-糖蛋白酶 (*O*-Glycoprotease) 序列来自 *Akkermansia muciniphila*, 重组表达于 *E.coli*, C端带6×His 标签。*O*-糖蛋白酶是一种*O*-糖蛋白特异性内切蛋白酶, 可催化天然黏蛋白型*O*-糖基化蛋白中与*O*-聚体直接相邻的肽键的水解。

概述

O-糖蛋白酶作为内切蛋白酶, 高度特异性地在丝氨酸或苏氨酸的*O*-聚糖N端消化蛋白质。这就产生了N端携带*O*-糖链的糖肽, 并使*O*-糖链分析、*O*-糖链定位和*O*-聚糖位点测定成为可能。

O-糖蛋白酶对唾液酸化的核心1 *O*-聚糖活性最高, 对核心3 *O*-糖基化和 α 2,3唾液酸化核心1的糖蛋白活性较差, 与Tn抗原、核心2和 α 2,6唾液酸化核心1的*O*-聚糖位点无活性。仅仅只有N-聚糖修饰时, 此酶不酶切。该酶对带有或不带有唾液酸的*O*-聚糖蛋白均有活性, 在去唾液酸的*O*-聚糖蛋白上活性更高。此酶在pH 5.5-7.5之间均能保持较高活性, 能耐1M NaCl, 但对EDTA高度敏感(0.5mM EDTA), 并且被Zn²⁺部分抑制。

应用

O-糖基化分析;

O-聚糖谱;

O-聚糖位点测定。

操作方法

实验准备

- ✓ 使用前，请将 Rhinogen® *O*-糖蛋白酶和 Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase (EDTA-free) 瞬离，确保所有试剂都在管底。
- ✓ 使用 100 μ l ddH₂O 重悬 *O*-糖蛋白酶冻干粉至 20U/ μ l。

糖蛋白消化

- 1、取 1-100 μ g 糖蛋白或糖肽样品；
- 2、加入 5 μ l 10 \times Glyco 缓冲液3；
- 3、加入 1 μ l Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase (EDTA-free) ；
- 4、按 1U *O*-糖蛋白酶/1 μ g 糖蛋白的比例加入 *O*-糖蛋白酶；
- 5、补加纯化水至反应体系总体积为 50 μ l，轻柔混匀；
- 6、37°C 条件下反应 2-18 小时。

注意事项

- 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。
- 反应体系可以线性扩大。
- 不除去唾液酸也可以进行消化，但如果存在唾液酸，酶的活性会显著降低，因此需要延长消化时间。
- 为防止微生物污染，尽可能无菌取用，或可将叠氮化钠加入溶液中，最终浓度为 0.02-0.05% (w/v)。
- 较高的酶浓度可以提高单个糖蛋白的消化效率，需要根据实际情况优化。
- 反应体系中适宜的糖蛋白底物浓度为 0.1-2.0mg/ml。
- 避免反复冻融。
- 可适当分装以减少多次冻融带来的活性损失。
- 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

已知的 O-糖蛋白酶抑制剂有哪些？

O-糖蛋白酶是一种金属蛋白酶，因此对螯合剂（如EDTA）高度敏感，浓度>5mM会导致酶的完全抑制。ZnCl₂也部分抑制O-糖蛋白酶活性。

O-糖蛋白酶是否可以和唾液酸酶合用？

是的，与唾液酸酶结合使用，可用于去唾液酸化和消化 O-糖基化蛋白质，提高 O-糖蛋白酶酶切效率。

必须要去除唾液酸吗？

在唾液酸存在下，O-糖蛋白酶的活性显著降低，因此我们建议使用唾液酸酶去除唾液酸。或对您的样品尝试使用和不使用唾液酸酶条件下对比消化，以评估您的特定样品是否有必要去除唾液酸。

是否需要样品处于天然折叠状态？还是要进行变性处理？

如果消化不充分，可能是由于样品的 O-聚糖存在空间位阻，酶无法到达导致的。在这种情况下，我们建议尝试以下工作流程：还原、变性、羧甲基化、置换缓冲液，然后使用 O-糖蛋白酶和唾液酸酶进行消化。

相关产品

产品名称	货号
Rhinogen® PNGase F (Glycerol-free)	QPF-001
Rhinogen® <i>O</i> -Glycosidase	QPF-004
Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase	QPF-005

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] Bennett E P, Ulla M, Henrik C, et al. Control of mucin-type *O*-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family[J]. *Glycobiology*, 2012(6):736-756.
 - [2] Toshima K, Tatsuta K. Recent progress in *O*-glycosylation methods and its application to natural products synthesis[J]. *Cheminform*, 1993, 24(4):1503-1531.
 - [3] Ernst J F, Prill K H. *O*-Glycosylation[J]. *Medical Mycology*, 2001, 39 Suppl 1(1):67-74.
 - [4] Trastoy B, Naegeli A, Anso I, et al. Structural basis of mammalian mucin processing by the human gut *O*-glycopeptidase OgpA from *Akkermansia muciniphila*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1):1234567890.
 - [5] Yang S, Philip O, Wu W W, et al. Deciphering Protein *O*-Glycosylation: Solid-Phase Chemoenzymatic Cleavage and Enrichment.[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90:acs.analchem.8b01834.
-