



产品使用说明书

Rhinogen[®] α 2-3,6,8,9Neuraminidase

货号：QPF-005



目 录

目 录	1
试剂包装与保藏条件	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
操作方法	5
数据分析	5
操作说明	5
常见问题	6
活力单位转换表	8
相关产品	9
联系我们	10
参考文献	10

试剂包装与保藏条件

试剂包装 Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 包装规格如下:

目录号	规格	浓度
QPF-005-A	0.6U/30 μ l	20U/ml
QPF-005-B	5 \times 0.6U/30 μ l	20U/ml

Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 配套提供的试剂如下:

试剂	成分	规格
10 \times Glyco 缓冲液 1	50 mM CaCl ₂ 、500 mM sodium acetate pH 5.5 at 25°C	1ml

QPF-005 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 (pH 7.5 at 25°C)，1 mM EDTA。

产品来源 Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 是一种将来源于 *Arthrobacter ureafaciens* 的 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 基因重组并表达于大肠杆菌 BL21 中的重组酶，分子量大小为 66KD。

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

产品特性 反应适宜 pH 范围：4.5-7，最适反应 pH：5.5；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 37°C，pH5.5条件下，以对硝基苯基- α -D-N-乙酰神经氨酸为底物，1分钟内催化释放1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。

1U Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase =1 U Prozyme Glyko® Sialidase A™。不同公司产品的酶活力单位换算，请参考活力单位转换表。

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。美国 FDA 要求所有类型的糖蛋白都需要进行糖型分析。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。

概述

N-糖基化及 O-糖基化是两种主要的糖基化修饰形式，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，而 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。这些 N-或 O-聚糖链上的末端残基通常都是唾液酸，对糖蛋白的糖基化研究必不可少的第一步通常都是除去所有非还原末端的唾液酸残基。来源于 *Arthrobacter ureafaciens* 的 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 能够释放糖蛋白，糖脂，神经节苷脂及多糖上所有直链或支链非还原末端的唾液酸残基。是一类重要的糖基化研究的工具酶，广泛用于糖蛋白和糖脂的分析。Rhinogen[®] α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 是一种将来源于 *Arthrobacter ureafaciens* 的 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 基因重组并表达于大肠杆菌 BL21 中的重组酶。在无糖苷酶本底表达的大肠杆菌宿主中表达的重组 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 是高度纯化的酶制剂，能够释放 α (2,3)-, α (2,6)-, α (2,8)-, α (2,9)-唾液酸残基，如图 1，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)-，通过加入足够的酶，释放的速率差异并不影响它在实际应用中的完全非特异性去除唾液酸残基的性质。

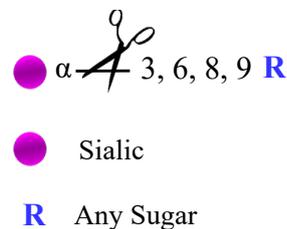


图 1. Rhinogen[®] α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 作用位点

应用

1. 聚糖结构分析;
2. 涉及唾液酸的病理生理学研究;
3. 治疗性重组蛋白的表征及质量控制;
4. 癌症研究及异常唾液酸化的鉴定及体外诊断;
5. 消除糖蛋白的异质性。

特性

Rhinogen[®]提供的 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 产品具有稳定性高、比活性高等特点，是一种高度纯化和非常稳定的外切糖苷酶，适用于蛋白质组学及糖生物学研究中糖蛋白上所有非还原末端的唾液酸残基有效释放。

- ✓ **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 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 产品都经过严格的质控，以实现高稳定性;
 - ✓ **高比活性：**有效和完全的释放所有非还原末端的唾液酸残基。
-

操作方法

试剂准备 使用前，请将 Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 10000rpm 离心 10 秒，确保所有试剂都在管底；

操作方法

1. 取 1-100 μ g 糖蛋白或者 100nM 寡糖样品，加纯化水至反应体系为 8 μ l；
2. 加入 1 μ l 10 \times Glyco 缓冲液 1；
3. 加入 1 μ l Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase，轻柔混匀；
4. 37°C 条件下反应 1-4 小时。

注：1) 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；
2) 反应可以线性扩大；
3) 如果存在支链唾液酸，则需要增大酶量或者适当延长反应时间。

数据分析 如果天然及脱唾液酸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。

操作说明

- ✓ 上述操作方法旨在为 Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 作为去唾液酸化试剂操作的一般指南，对于不同的糖蛋白样品，去唾液酸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；
- ✓ 去唾液酸化体系可以线性放大或缩小；
- ✓ 本产品适用于释放糖蛋白，糖脂，神经节苷脂及多糖上所有直链或支链非还原末端的唾液酸残基，对于支链上的唾液酸残基的释放，可能需要更多的酶量及更长的反应时间；
- ✓ 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

唾液酸酶有很多种，Rhinogen®的唾液酸酶跟市面上的有什么区别？

市面上常见的唾液酸酶有 α 2-3、 α 2-3, 6-、 α 2-3,6,8-及 α 2-3,6,8,9-等 4 种：

- 1) α 2-3Neuraminidase 基因常常来源于 *Salmonella typhimurium* LT2、*Streptococcus pneumoniae* 及 *Pasteurella multocida*，能够切割释放 α 2-3 连唾液酸残基；
- 2) α 2-3, 6 Neuraminidase 基因常常来源于 *Clostridium perfringens*，能够切割释放 α 2-3, α 2-6 连唾液酸残基；
- 3) α 2-3,6,8 Neuraminidase 能够切割释放 α 2-3, α 2-6, α 2-8 连唾液酸残基；
- 4) α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 基因常常来源于 *Arthrobacter ureafaciens*，能够切割释放 α 2-3, α 2-6, α 2-8, α 2-9 连唾液酸残基，它还可以切割与内部残基连接的支链唾液酸残基，Rhinogen®目前只有这一种唾液酸酶，是一种应用最广泛、适用性更广的酶。

α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 有效的阳性对照底物？

Fetuin 或 pNP-N-乙酰神经氨酸是 α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 的有效阳性对照底物。

α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 可以同时与其他外切糖苷酶和/或内切糖苷酶进行双重消化吗？

是的，可以同时使用。

与其它外切糖苷酶同时使用时，建议采用 1× Glyco 缓冲液 1（50mM 乙酸钠，5mM CaCl₂，pH5.5）缓冲体系；

与 PNGase F 和/或 O-Glycosidase 同时使用时，建议使用 1×Glyco 缓冲液 2（50 mM 磷酸钠，pH 7.5）。

是否有必要用 Neuraminidase 和 O-Glycosidase 同时处理糖蛋白样品？

是的，对于含有 O-聚糖链的糖蛋白样品，必须首先去除末端唾液酸残基后，O-Glycosidase 才能有效去除 O-连二糖核心。

Neuraminidase 对糖蛋白样品的去唾液酸化是否要求变性条件？

不需要，通常去糖基化的酶都可以从天然（折叠）糖蛋白上去除聚糖残基，然而由于空间位阻效应（蛋白质的二级或三级结构），聚糖位点周围的蛋白质可能会影响一些酶的可及性，对于 PNGase F 及 O-Glycosidase，变性条件下去糖基化效率会得到较大的提高，但是对于 Neuraminidase，变性及天然状态下，去唾液酸的效率相差不大。

在糖苷酶处理后如何重新纯化聚糖或糖肽？

微型离心过滤器过滤收集或固相萃取（例如：石墨化碳柱）。

Rhinogen® α

2-3,6,8,9

Neuraminidase

**是否可以切割释
放 N-乙酰神经氨
酸 (Neu5Ac) 和
N-羟乙酰神经氨
酸 (Neu5Gc) 残
基?**

Rhinogen® α 2-3,6,8,9 Neuraminidase 既可以切割 Neu5Ac, 又可以切割 Neu5Gc, 但相对 Neu5Ac, 其对 Neu5Gc 具有稍低的切割效率。

活力单位转换表

Enzyme	Company	Selling Conc. (U/ml)	Units /Vial	μl/ Vial	Rhinogen [®] Assay (U/ml)	Rhinogen [®] Assay Units /Vial	μl Conversion (1 Rhinogen [®] μl = x Company μls)
α2-3,6,8,9 Neuraminidase	Rhinogen[®] (QPF-005)	20	0.6	30	20	0.6	1
	NEB (NEB #P0722)	20,000	800	40	20	0.8	1
	NEB (NEB #P0720)	50,000	2,000	40	50	2	0.4
	Prozyme (GKX-5021), α2-3, 6, 8 Neur)	5	1	200	10	2	2
	Prozyme (GK80040, α2-3,6,8,9 Neur)	5	1	200	5	1	4

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
Protein Deglycosylation Kit III (for N-linked & Complex O-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] Uchida, Y., et al., J. Biochem., 86(5), 1573-1585 (1979).
 - [2] Saito, N. et al., J. Biol. Chem., 254, 7845 (1979).
 - [3] 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.
 - [4] Uchida, Y., Tsukada, Y. and Sugimori, T. Distribution of neuraminidase in Arthrobacter and its purification by affinity chromatography [J]. Biochem, 1977(82): 1425-33.
 - [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] 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.
 - [8] 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.
-

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

