



产品使用说明书

Rhinogen[®] Quick[™] PNGase F-Plus

货号：QPF-019



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
产品特性	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
非还原条件下操作方法	5
还原条件下操作方法	5
制备兼容 LC 和 LC/MS 的样品	5
数据分析	5
操作说明	6
常见问题	7
相关产品	9
联系我们	10
参考文献	10

产品信息

试剂包装 Rhinogen® Quick™ PNGase F-Plus 包装规格如下：

目录号	规格	体积
QPF-019-A	30T	30μl
QPF-019-B	5×30T	5×30μl

Rhinogen® Quick™ PNGase F-Plus 配套提供的试剂如下（按 30 次反应）：

试剂	目录号	规格
5×Quick™ 反应缓冲液-Plus（还原）	EB15	1ml/支
5×Quick™ 反应缓冲液-Plus（非还原）	EB16	1ml/支
Quick™ 反应增强剂	EB17-B	3×1vials

Quick™ PNGase F-Plus 酶储存在缓冲液中，以液体的形式提供。缓冲液的组成为：50mM NaCl，20mM Tris-HCl（pH7.5 at 25°C），5mM EDTA。Quick™ 反应增强剂以冻干粉形式提供。

注：适配 Rhinogen® Quick™ PNGase F-Plus 的 Quick™ 反应增强剂（货号：EB17）可单独购买。

产品来源 Rhinogen® Quick™ PNGase F-Plus是由大肠杆菌表达得到的重组糖苷酶，其分子量大小为36kDa。

产品质量 通过SDS-PAGE分析，纯度≥95%；没有检测到污染的外切糖苷酶、糖苷内切酶及蛋白酶活性。

产品特性 热失活条件：75°C处理10min。

保藏条件 采用冰袋运输，收到产品后请立即将酶置于2-8°C条件下储存，严禁冻存；配套试剂置于-20°C储存，其中Quick™反应增强剂冻干粉溶解后，-70°C可储存一个月，2~8°C可储存一周；酶液中不含防腐剂，务必确保无菌操作取用，避免污染。

产品综述

背景

目前越来越多的抗体和抗体融合蛋白被用作生物治疗剂，这些生物治疗剂的性质又显著受其糖基化状态的影响。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，IgG的Fc区Asn297处的保守N-连聚糖对其功能活性至关重要。此外，一些抗体还具有额外的N-连聚糖，如图A，其与Fc区Asn297处的保守N-聚糖一起影响抗体的识别、半衰期和免疫应答反应。然而在细胞培养过程中的各种变量都可能会导致抗体糖基化程度的改变及增加其聚糖多样性，因此在生产过程中监测抗体的糖基化状态对于获得正确的糖蛋白形式至关重要。

概述

在最短的时间内获得准确的N-聚糖谱是抗体及抗体融合蛋白等生物治疗剂生产过程中糖基化监测有效的过程控制的关键。PNGase F是从糖蛋白中特异性除去N-连聚糖的糖苷内切酶，但常规PNGase F酶促反应释放抗体N-聚糖需要长达几个小时。此外，由于聚糖释放存在偏好性，不完全的去糖基化可能导致偏倚的结果，所获得的聚糖分布不能代表治疗性抗体的正确组成。

对此我们研发了一款新的重组试剂—Quick™ PNGase F-Plus，可以在数分钟内完成抗体和融合蛋白的完全快速去糖基化。所有N-聚糖快速释放，无偏好，并与下游HPLC或MS兼容。它既保留了PNGase F的特性，同时又能将所有N-聚糖快速无偏好释放，且在非还原条件下酶切时还能同时保留抗体的二硫键，获得完整的去糖基化多聚体蛋白（抗体）。方便的反应体系设置及快速反应时间使得Quick™ PNGase F-Plus成为在治疗性单克隆抗体的开发和质量控制过程中的理想选择。同PNGase F一样，Quick™ PNGase F-Plus能够将绝大多数N-糖链（除最内侧的GlcNAc上含 α -1,3连接的核心岩藻糖，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、杂合和复合寡糖部分最内侧的N-乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）和天冬酰胺残基（Asn）之间进行切割，如图B，释放出完整的寡糖链。

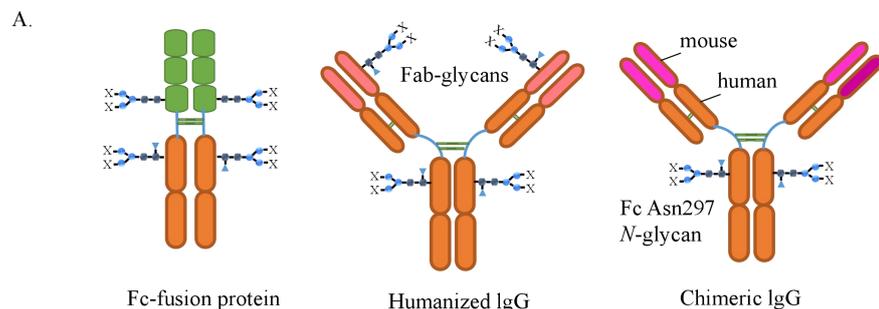


图 A. IgG 及 IgG-融合蛋白可能的结构。

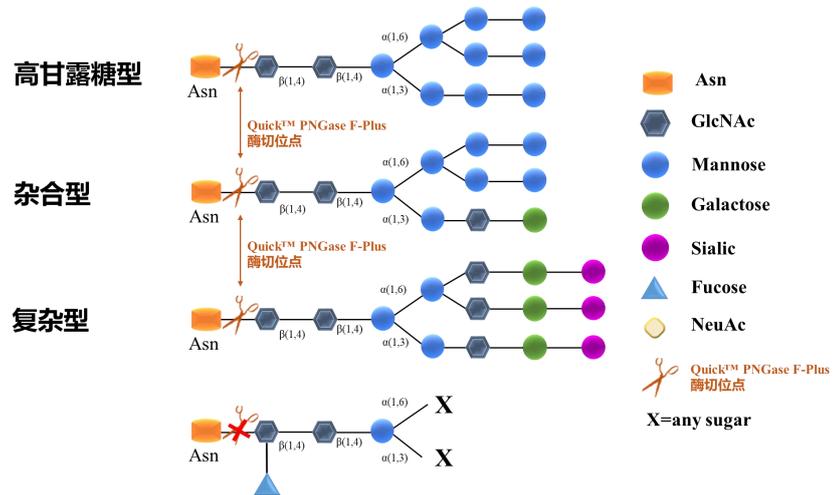


图 B. Quick™ PNGase F-Plus酶切位点。

应用

1. 在数分钟内快速完成抗体或抗体融合蛋白的完全快速去糖基化；
2. 抗体及抗体-融合蛋白生产过程中糖基化状态监测；
3. 抗体及抗体-融合蛋白生物治疗剂的产品质量控制；
4. 蛋白质组学应用及研究。

特性

Rhinogen®提供的 Quick™ PNGase F-Plus 是一种改进的重组试剂，具有快速高效及保留完整的去糖基化蛋白（非还原条件下）的特性，适用于治疗性单克隆抗体的开发和质量控制过程中 N-连糖链的分析及蛋白质组学分析。快速处理时间降低了通过标准 PNGase F 长时间酶促去糖基化反应方案可能引入的杂质和不需要的蛋白质修饰（氧化，脱酰胺）的风险。

- ✓ **高效：**快速、无偏好释放 N-连聚糖；
- ✓ **高纯度：**没有污染蛋白酶/糖苷酶，纯度≥95%；
- ✓ **高适用性：**对多种结构抗体或糖蛋白有效；
- ✓ **高稳定性：**每批 Quick™ PNGase F-Plus 产品都经过严格的质量控制，以实现高稳定性；
- ✓ **保留完整二硫键：**保留完整的去糖基化蛋白使得蛋白质表征更方便，减少偏差（非还原条件下）。

操作方法

试剂准备	<ol style="list-style-type: none"> 1. 为了最佳的传热，请使用 0.2ml 薄壁微管或者 1.5ml 离心管。 2. 使用前，请将 Quick™ PNGase F-Plus 试剂及 Quick™ 反应增强剂冻干粉 10000rpm 离心 10 秒，确保所有试剂都在管底部。 3. 取 1 支 Quick™ 反应增强剂冻干粉，加入 40μl 5×Quick™ 反应缓冲液-Plus（还原/非还原），复溶成 5×Quick™ 工作试剂，将液体瞬离至管底备用。
非还原条件下操作方法	<p>在非还原条件下酶切时能同时保留抗体的二硫键，可获得完整的去糖基化多聚体蛋白（抗体）。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 取 10-100μg 抗体，加纯化水至总体积为 15μl； 2. 加入 4μl 5×Quick™ 工作试剂（非还原）混匀使得总反应体积为 19μl； 3. 90°C条件下预热 5min，冷却至室温； 4. 加入 1μl Quick™ PNGase F-Plus，轻柔混匀； 5. 50°C水浴条件下反应 10min。
还原条件下操作方法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 取 10-100μg 抗体，加水至总体积为 15μl； 2. 加入 4μl 5×Quick™ 工作试剂（还原）混匀使得总反应体积为 19μl； 3. 90°C条件下预热 5min，冷却至室温； 4. 加入 1μl Quick™ PNGase F-Plus，轻柔混匀； 5. 50°C水浴条件下反应 10min。
制备兼容 LC 和 LC/MS 的样品	<ol style="list-style-type: none"> 1. 在消化后的蛋白质样品中加入甲酸、TFA 或 HCl，甲酸和 TFA 终浓度应该是 0.5%，HCl 的终浓度为 30~50mM，pH≤2 有助于 Quick™ 反应增强剂快速水解。 2. 37°C 孵育样品 30-45min，可能观察到轻微的浑浊。 3. 将酸处理过的样品以 13000 rpm 离心 10 分钟。水解的 Quick™ 反应增强剂副产物不与水混溶，因此可观察到一些沉淀。 4. 小心地转移溶液，可适当进行稀释。 5. 进行 MALDI TOF、LC 或 LC/MS 分析。
数据分析	<p>对反应产物 N-聚糖或者去糖基化糖蛋白进行分析：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. N-聚糖分析：N-聚糖进行衍生化（例如：还原胺化）用于下游分析； 2. 去糖基化糖蛋白：抗体样品用于 SDS-PAGE 分析或通过微量透析或微过滤交换缓冲液后用于质谱分析。

操作说明

- ✓ 上述操作方法旨在为 Rhinogen® Quick™ PNGase F-Plus 作为催化剂催化抗体及抗体-融合蛋白快速去糖基化的一般指南。在 20 μ l 总反应体积中的 1 μ l Quick™ PNGase F-Plus 优化用于高达 10 μ g 含有 Fc 和 Fab 糖基化的抗体（例如西妥昔单抗），15 μ g 小鼠单克隆抗体同种型 IgG2a 及 30 μ g 不太复杂的抗体（如利妥昔单抗）的快速去糖基化。对于特定的底物，可以适当优化反应体系；
 - ✓ 一些靶标样品要在还原条件下才能完全地去糖基化，例如：IgA1、Fetuin 及绒毛膜促性腺激素，对于这些样品，建议选择还原酶切体系；
 - ✓ 使用本试剂盒时请严格按照两步实验操作进行，加入 Quick™ PNGase F-Plus 之前严格进行预热步骤（90 $^{\circ}$ C 条件下预热 5min）进行热变，在热变性步骤中，确保糖蛋白的加热温度至少为 90 $^{\circ}$ C。一些具有挑战性的样品需要这样高的温度，而且甚至要在接近沸点（100 $^{\circ}$ C）的条件下才能实现完全的糖基释放，但要关注高温孵育是否会有沉淀产生。
 - ✓ 靶标抗体或抗体-融合蛋白样品的储存体系要与 Quick™ PNGase F-Plus 活性兼容，由于 SDS 抑制 Quick™ PNGase F-Plus 的酶活，储存体系不能含有 SDS；常用的稳定剂如 Tween，Triton X-100，NP-40，辛基葡糖苷和非去污剂磺基甜菜碱以及少量的有机溶剂均会影响最佳的快速去糖基化效率；
 - ✓ 75 $^{\circ}$ C 条件下处理 10 分钟可以灭活 Quick™ PNGase F-Plus；
 - ✓ 本产品仅供研究使用，不适用于人或动物的诊断或治疗。
-

常见问题

**Rhinogen® Quick™
PNGase F-Plus 去糖
基化后得到什么产
物？**

利用 Rhinogen® Quick™ PNGase F-Plus 进行抗体及抗体融合蛋白去糖基化后，会快速完全地释放出所有 N-连寡糖链，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。

**还原和非还原条件
下的操作方法有什
么区别？**

还原条件下，能在数分钟内使抗体和相关的融合蛋白快速完全去糖基化，是治疗性单克隆抗体的开发和质量控制过程中下游 N-聚糖分析和应用的理想选择。非还原条件下，能保持抗体二硫键的完整性，获得完整去糖基化多聚体蛋白（即抗体），是质谱研究去糖基化蛋白时的理想选择。

**Rhinogen® Quick™
PNGase F-Plus 理想
的对照底物是什么？**

抗 MBP 单克隆抗体是 Quick™ PNGase F-Plus 的良好对照底物。

**如何检测 Rhinogen®
Quick™ PNGase
F-Plus 在 10 分钟内
是否完全去糖基
化？**

对于单克隆抗体，在去除 N-聚糖之后在 SDS-PAGE 上可以观察到糖基化抗体与去糖基化抗体在凝胶上位置的变化。如果需要更精确的检测是否残留少量的糖基化抗体，可以采用更敏感的测定（例如，LS-ESI-TOF）。

**下游 HPLC 及 MS 分析
是否与 Rhinogen®
Quick™ PNGase
F-Plus 兼容？**

是的，制备液相色谱和/或质谱的样品，可以通过常规的固相萃取方法如 C18 和石墨化碳分离 N-聚糖；去糖基化蛋白通过微量透析或微过滤交换缓冲液后用于质谱分析，当然您也可以在酸性条件下将 Quick™ 反应增强剂分解成无干扰的副产物，不会抑制肽电离。

**蛋白酶抑制剂混合
物可以用于
Rhinogen® Quick™
PNGase F-Plus 反应
吗？**

可以，如下蛋白酶抑制剂混合物与 Quick™ PNGase F-Plus 反应相容。抑肽酶（10μg/ml 终浓度）；苯脲（1mM 终浓度）；抑胃酶抑制素（10μg/ml 终浓度）；亮抑酶肽（1μM 终浓度）；EGTA（1mM 终浓度）；EDTA（1mM 终浓度）。

**Rhinogen® Quick™
PNGase F-Plus 反应
与胰蛋白酶是否兼
容？**

是兼容的，可以将胰蛋白酶直接加入用 Quick™ PNGase F-Plus 消化的样品中。

复杂糖基化修饰蛋白按照说明书操作不能有效快速去糖基化时要如何操作？

我们说明书中推荐的快切试剂浓度浓度适用于绝大多数糖蛋白的快速去糖基化。对于按照上述操作仍不能有效完全快切的复杂糖蛋白，可以尝试提高预处理温度、降低底物浓度、提高酶用量及延长反应时间等。

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-Acetylgalactosaminidase	QPF-018
Quick™ 反应增强剂	EB17

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] Houry, 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 α -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.
-

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

