



产品使用说明书

Rhinogen[®] PNGase F (Glycerol-free)

货号：QPF-001



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
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	5
反应产物分析	5
操作说明	6
常见问题	7
活力单位转换表	9
相关产品	10
联系我们	11
参考文献	11

产品信息

试剂包装 Rhinogen® PNGase F(Glycerol-free)包装规格如下:

目录号	规格	浓度
QPF-001-A	15,000U/30μl	500,000U /ml
QPF-001-B	5×15,000U/30μl	500,000U /ml

Rhinogen® PNGase F(Glycerol-free)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

QPF-001 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), 5 mM EDTA, 本品不含甘油, 与下游 HPLC、MS 分析兼容。

产品来源 Rhinogen® PNGase F(Glycerol-free)是一种将来源于 *Flavobacterium meningsepticum* 的 PNGase F 基因重组到 pET28a T7 启动子下游, 并在大肠杆菌 BL21 中进行表达后分离得到的重组糖苷酶, 其分子量大小为 36KDa。

产品质量 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 最适反应 pH: 7.5; 热失活条件: 75°C 处理 10 min。

酶活定义 1 个酶活力单位定义: 在 10 μl 反应体系中, 37°C, pH7.5 条件下, 1hr 内催化释放 10μg 变性 RNase B > 95% N-连寡糖所需要的酶量。
不同公司产品的酶活力单位换算, 请参考活力单位转换表。1U Rhinogen® PNGase F = 1 unit NEB PNGase F。

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, 严禁冻存; 配套试剂置于 -20°C 储存。本品不含防腐剂, 务必确保无菌操作取用, 避免污染。

产品综述

背景

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^[1]。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^[2]，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^[3]、免疫应答等等在内的各种重要生命活动^[4]。在多种疾病，如肿瘤^[5]（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^[6]）、神经退行性疾病、心血管病、代谢性疾病、免疫性疾病^[7]及感染性疾病^[8]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^[9]，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 meningosepticum* 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^[10, 11]，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 α -1,3 连接的核心岩藻糖^[12]，常见于植物及昆虫糖蛋白）完整地其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^[13]，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^[14]。

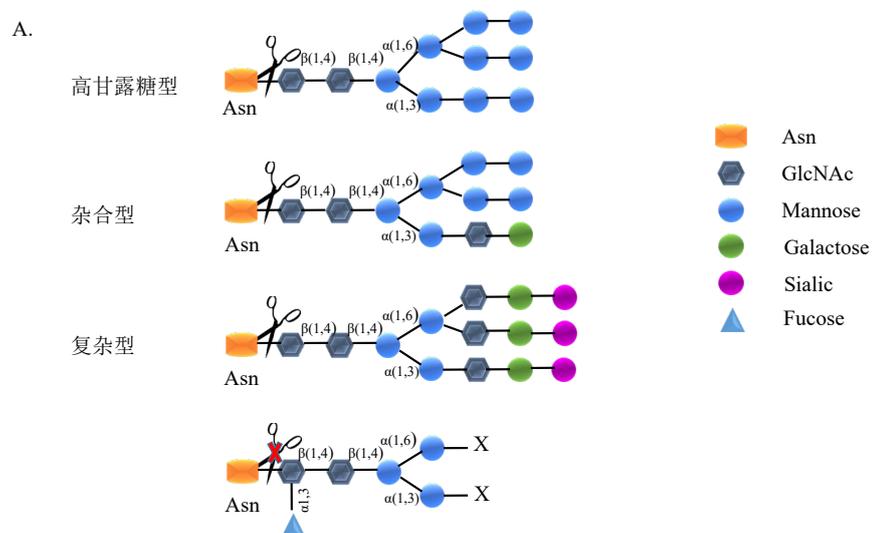


图 1A. PNGase F 切割位点

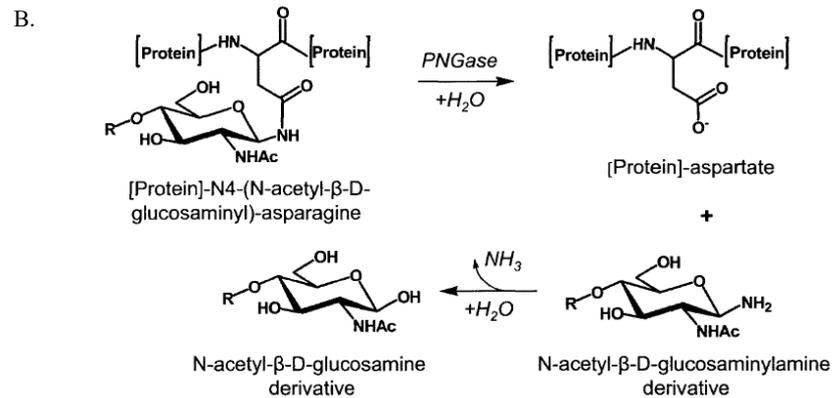


图 1B. PNGase F 释放糖链的反应机制^[15]

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® PNGase F (Glycerol-free) 是一种高度纯化和非常稳定的内切糖苷酶，具有稳定性高、比活性高等特点。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。

- ✓ **高纯度：** 没有污染蛋白酶/其它糖苷酶，纯度≥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；
- ✓ **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	<p>使用前，请将 Rhinogen® PNGase F (Glycerol-free)试剂取出，10000rpm 离心 10 秒，确保所有试剂都在管底。</p> <p>注：由于 Rhinogen® PNGase F (Glycerol-free)试剂不含防腐剂，务必确保无菌操作取用，避免污染。</p> <p>反应试剂：将-20℃储存的 10×Denaturing 缓冲液、10×Glyco 缓冲液 2 及 10%NP-40 溶液取出，待用。</p> <p>注：根据实验需要，准备相应的试剂，如非变性条件下进行去糖基化反应，不需要准备 10×Denaturing 缓冲液及 10% NP-40 溶液。</p>
变性条件下糖蛋白样品去糖基化	<ol style="list-style-type: none"> 1. 取 10-100μg 糖蛋白溶液，加入 1μl 10×Denaturing 缓冲液，补加纯化水使得反应体系为 10μl； 2. 将上述 10μl 体系 100℃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，加入 2μl 10×Glyco 缓冲液 2、2μl 10% NP-40 溶液、1-2μl Rhinogen® PNGase F (Glycerol-free)以及纯化水，使得总反应体积为 20μl，轻柔混匀； 5. 37℃ 条件下反应 1-3hr。 <p>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。</p>
非变性条件下糖蛋白去糖基化	<ol style="list-style-type: none"> 1. 取 10-100μg 糖蛋白溶液，加入 2μl 10×Glyco 缓冲液 2、2-5μl Rhinogen® PNGase F (Glycerol-free)，补加纯化水使得反应体系总体积为 20μl，轻柔混匀； 2. 37℃ 条件下反应 4-24hr。 <p>注：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。</p>
反应产物分析	<ol style="list-style-type: none"> 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® PNGase F(Glycerol-free)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® PNGase F(Glycerol-free)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，可能需要更多的酶及更长的反应时间；
 - 去糖基化体系可以线性放大；
 - 本产品不能裂解含 α -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® PNGase F(Glycerol-free)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® PNGase F(Glycerol-free)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^[16]。因此反应体系中存在较低浓度的尿素可能不影响 Rhinogen® PNGase F(Glycerol-free)去糖基化的活性。

对于天然糖蛋白，我应该用多少 Rhinogen® PNGase F(Glycerol-free) 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® PNGase F(Glycerol-free)相对很难到达寡糖链的切割位点。有时更多的酶及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。

Rhinogen® PNGase F(Glycerol-free) 可以与下游分析如 HPLC 和质谱兼容吗？

Rhinogen® PNGase F 有两款产品，PNGase F (Glycerol-free) (QPF-001) 及 PNGase F (QPF-002)。两款产品具有相同的活性，特异性及浓度。两者之间的唯一区别是，QPF-002 存储在 50% 甘油中，而 QPF-001 在其储存缓冲液中不含甘油。由于甘油以及糖蛋白变性缓冲液（含 SDS 和 DTT）与 HPLC 和/或质谱不能兼容，且难以从反应体系中除去，因此如果使用 HPLC 或质谱进行寡糖链或蛋白分析，建议使用无甘油的酶即 QPF-001，同时非变性条件下进行去糖基化反应。非变性条件下通常需要更多的酶及更长的反应时间，推荐使用瑞安相关产品 Rhinogen® PNGase F (non-reducing format) (QPF-003)，详情请咨询 techserv@rhinobio.com，或者登陆公司官网 www.rhinobio.com 查询。

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 β 1-4 Galactosidase 这 3 种酶会受 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。

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)
PNGase F	Rhinogen® (QPF-001/ QPF-002)	500,000	15,000	30	500,000	15,000	1
	NEB(NEB #P0708)	500,000	15,000	30	500,000	15,000	1
	Prozyme(GKE-5006A)	2.5	0.1	40	150,000	6,000	3.3
	Prozyme(GKE-5020B, Ultra)	10	0.4	40	500,000	20,000	1
	QA Bio(E-PNG01)	5	0.3	60	200,000	12,000	2.5
	Sigma(P7367)	500	50	50	90,000	4,500	5.5

相关产品

产品名称	货号
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] 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 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

