



产品使用说明书

Rhinogen[®] Quick[™] 反应增强剂

货号：EB17



目 录

目 录	1
产品信息	2
试剂包装	2
产品介绍	2
产品特性	2
存储条件	2
操作方法-与 PNGase F 联用	3
试剂准备	3
非还原条件下操作方法	3
还原条件下操作方法	3
制备兼容 LC 和 LC/MS 的样品	3
数据分析	3
操作说明	4
操作方法-与胰蛋白酶联用	5
试剂准备	5
非还原条件下操作方法	5
还原条件操作方法	5
制备兼容 LC 和 LC/MS 的样品	5
操作说明	5
常见问题	6
相关产品	7
联系我们	8

产品信息

试剂包装 Rhinogen® Quick™ 反应增强剂包装规格如下：

试剂	货号	规格
Quick™ 反应增强剂	EB17-A	1vial
Quick™ 反应增强剂	EB17-B	3*1vials

Quick™ 反应增强剂以冻干粉形式提供。

产品介绍 Rhinogen® Quick™ 反应增强剂是一种与MS兼容的温和型变性剂，有助于溶解和展开蛋白质，使蛋白质更容易裂解。其温和和特性不会像常规变性剂那样导致蛋白水解酶变性或受到抑制，可兼容PNGase F（Rhinogen® Cat.NO: QPF-001）和胰蛋白酶（Rhinogen® Cat.NO: QIP-003）等。

产品特性

- ✓ 提高酶解速度，使得酶解和分析能够在一天内完成；
- ✓ 不抑制酶活或导致酶变性；
- ✓ 兼容液相色谱（LC）和质谱（MS）分析；
- ✓ 在酸性条件下分解成无干扰的副产物，不会抑制肽电离。

存储条件 采用冰袋运输，收到产品后请立即置于-20℃，密封防潮。
Quick™ 反应增强剂冻干粉置于-20℃条件下可储存3年；溶解后，置于-70℃条件下可储存1个月，2~8℃条件下可储存1周。Quick™ 反应增强剂溶解后应避免室温下长时间放置，避免反复冻融。

操作方法-与 PNGase F 联用

- 试剂准备**
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 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。
5×Quick™ 反应缓冲液-Plus（还原）：250mM PB, 100mM DTT, pH7.5;
5×Quick™ 反应缓冲液-Plus（非还原）：250mM PB, pH7.5。

- 非还原条件下操作方法**
- 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）。
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**
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**
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**
- 对反应产物 N-聚糖或者去糖基化糖蛋白进行分析：
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。
-

操作方法-与胰蛋白酶联用

试剂准备

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™ Trypsin (Sequencing Grade) 冻干粉及 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. 使用 40μl 50mM HAc 或 1mM HCl 溶解干粉，得到浓度为 0.5mg/ml 的胰蛋白酶溶液，推荐置于冰上保存。
4. 取 1 支 Quick™ 反应增强剂冻干粉，加入 400μl 反应缓冲液，复溶成 5×Quick™ 工作试剂，将液体瞬离至管底备用。

注：反应缓冲液推荐 50mM NH₄HCO₃ 或者 pH7.0-8.0 的缓冲溶液。

非还原条件下操作方法

1. 取 20-100μg 蛋白底物，使用反应缓冲液重悬或稀释至总体积为 14μl；
2. 加入 4μl 5×Quick™ 工作试剂混匀；
3. 60°C 条件下预热 10~30min，冷却至室温；
4. 加入 2μl 0.5mg/ml 的 Quick™ Trypsin (Sequencing Grade)，轻柔混匀；
5. 37°C 水浴条件下反应 10~60min。

还原条件下操作方法

1. 取 20-100μg 蛋白底物，使用反应缓冲液重悬或稀释至总体积为 10μl；
2. 加入 4μl 5×Quick™ 工作试剂混匀；
3. 加入 1μl 0.1M DTT；
4. 60°C 条件下孵育 10~30min，冷却至室温；
5. 加入 3μl 0.1M 碘乙酰胺，黑暗中烷基化 30min。
6. 加入 2μl 0.5mg/ml 的 Quick™ Trypsin (Sequencing Grade)，轻柔混匀；
7. 37°C 水浴条件下反应 10~60min。

制备兼容 LC 和 LC/MS 的样品

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. 通过 LC-MS 或 MALDI-MS 分析水相。

操作说明

- ✓ 胰蛋白酶的使用量为胰蛋白酶：目的蛋白=1:20~1:100 (w/w)，最适 pH 为 7.0~8.0；
- ✓ 反应体积可以按比例放大或缩小；
- ✓ 在酶切反应体系中添加 1mM CaCl₂，可以提高胰蛋白酶的活性；
- ✓ 反应结束后，取少部分反应体系进行 SDS-PAGE 或者 RP-HPLC 检测，确认酶切效果。剩余反应体系置于冰浴或者冻存。若酶切不完全，则取出反应体系，置于 37°C 继续进行反应；
- ✓ 对于不同的蛋白样品，需要实验摸索最适的酶浓度及反应时间。可用 50mM NH₄HCO₃ 或者 pH7.0-8.0 的缓冲溶液进行酶液稀释；
- ✓ 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

是否可以调整样品预处理温度？

加入 Quick™ 工作试剂且高温孵育后有利于底物的舒展，从而暴露更多的切割位点。针对疏水蛋白，您可以提高孵育温度至 90°C 或接近 100°C，但要关注高温孵育是否会有沉淀产生。当您的底物孵育时发生沉淀，你可以选择适当降低孵育温度，当然提高反应增强剂的浓度也可以有效缓解蛋白沉淀问题。

复杂蛋白按照说明书操作不能有效快速消化时要如何操作？

说明书中推荐的快切试剂浓度适用于大多数蛋白的快速消化。对于按照上述操作仍不能有效完全快切的复杂蛋白，可尝试提高快切试剂浓度。同时，也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
Trypsin (Sequencing Grade)	QIP-003
Endoproteinase Lys-C	QIP-004
Glu-C (Sequencing Grade)	QIP-005
Carboxypeptidase B	QIP-006
Quick™ Trypsin (Sequencing Grade)	QIP-012
PNGase F (Glycerol-free)	QPF-001
Quick™ PNGase F-Plus	QPF-019

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
-

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

