人来源 α-1,3/1,6 甘露糖转移酶 Alg2 的异源表达及活性测定

胥欣欣， 王春迪， 陈 帅， 高晓冬*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：在 N-糖基化途径中，双功能型的甘露糖转移酶 Alg2 蛋白催化两个甘露糖分别以 α-1,3/1,6 连键组装到多萜醇寡糖 Man1GlcNAc2-PP-Dol 上，形成 Man3GlcNAc2-PP-Dol。作者探究人来源的 Alg2 蛋白（hAlg2）在酿酒酵母中的体内功能和在大肠杆菌中表达并纯化后的体外活性。构建酿酒酵母 w303a-$GAL1_{pr}$-*ALG2*，并利用该菌株的生长被葡萄糖抑制的特点，发现过表达 h*ALG2* 基因能够回补其生长缺陷，证实了 h*ALG2* 和 Sc*ALG2* 的功能同源性。作者利用大肠杆菌表达系统，成功表达并纯化了 TrxA-hAlg2，并以 Man1GlcNAc2-PP-Phy（PPGn2M1）代替 hAlg2 的天然底物，测定了其体外活性。结合液质联用的方法，检测发现 TrxA-hAlg2 具有催化 PPGn2M1 生成 PPGn2M2 和 PPGn2M3 的甘露糖基转移酶活性，为建立基于大肠杆菌表达纯化的 hAlg2 体外反应体系奠定了基础。

关键词：N-糖基化；Alg2 蛋白；甘露糖基转移酶；液质联用
中图分类号：Q 71　**文章编号**：1673-1689（2021）02-0078-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.011

Heterologous Expression and Activity Assay of Human α-1,3/1,6 Mannosyltransferase Alg2

XU Xinxin, *WANG Chundi*, *CHEN Shuai*, *GAO Xiaodong**
(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In the N-glycosylation pathway, the bifunctional mannosyltransferase Alg2 protein catalyzes the assembly of two mannose onto dolichol linked oligosaccharide Man1GlcNAc2-PP-Dol by α-1,3/1,6 linkages to form Man3GlcNAc2-PP-Dol. In this study, the function of human Alg2 protein (hAlg2) in *S. cerevisiae* cells was explored and its activity *in vitro* after expressed and purified from *E. coli* was investigated. The growth of constructed yeast strain w303a-$GAL1_{pr}$-*ALG2* was suppressed by glucose, while the overexpression of h*ALG2* gene could rescue such growth defect, confirming the functional homology of h*ALG2* and Sc*ALG2*. In addition, TrxA-hAlg2 was successfully purified from *E.coli* and its activity *in vitro* was further tested using Man1GlcNAc2-PP-Phy (PPGn2M1), a natural substrate analogue of hAlg2. LC-MS analysis showed that the purified TrxA-hAlg2 was capable of producing PPGn2M2 and PPGn2M3 from PPGn2M1,

收稿日期：2019-09-23
基金项目：国家自然科学基金项目（31971216）。
* **通信作者**：高晓冬（1965—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事细胞分子生物学、生物化学、糖生物化学、微生物学、细胞工程和分子遗传学方面的研究。E-mail：xdgao@jiangnan.edu.cn

providing the foundation for in vitro reaction system of hAlg2 purified from *E. coli*.
Keywords: N-glycosylation, Alg2 protein, mannosyltransferase, LC-MS

在真核生物中，N-糖基化是一个高度保守的蛋白质修饰过程[1-3]。该过程发生在内质网上，起始于多萜醇寡糖前体（Dolichol Linked Oligosaccharide，DLO）的生物合成，其中 14 个单糖依次转移到多萜醇焦磷酸（PP-Dol）基团上形成核心寡糖前体 Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol[2,4-7]。一系列 ER 膜上的糖基转移酶（GTases）统称为 Alg（Asparagine-linked glycosylation）蛋白，有序催化 DLO 的合成[1,8-9]。DLO 合成的前 7 个反应发生在 ER 的胞质侧，生成 Man5GlcNAc2-PP-Dol 中间体，随后会翻转至 ER 腔内进一步被延伸[10]。最终，寡糖基转移酶（OST）会将 DLO 寡糖前体转移到新生多肽 Asn-X-Ser/Thr 序列的天冬酰胺（Asn）残基上（X 指除脯氨酸外的氨基酸）[11]。

在 N-糖基化途径中，*ALG2* 基因编码的甘露糖基转移酶具有双功能，催化第二和第三个甘露糖的添加，即以 GDP-mannose 为供体，向 ManGlcNAc2-PP-Dol 添加 α-1,3 和 α-1,6 连键的甘露糖，形成分支结构的 Man3GlcNAc2-PP-Dol[12-15]。有文献报道 Alg1、Alg2 和 Alg11 会形成异聚复合体共同参与胞质侧甘露糖的添加[16-17]。最初，在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中，研究人员通过筛选获得一种温度敏感性突变体 *alg2-1*，它在限制性温度下会积累脂连的 Man2GlcNAc2[18]，表明 *alg2-1* 的糖基转移酶存在缺陷，无法催化 α-1,6 甘露糖的添加，继而通过回补实验克隆得到 ALG2 基因[19]。关于人类 ALG2-CDG 疾病相关突变体的报道也表明，*ALG2* 基因是添加 α-1,3 连接的甘露糖所必需的[20]。利用表达 ScAlg2 的大肠杆菌膜组分，Alg2 的双功能性得到了初步鉴定，后续研究中也进一步利用酵母微粒体膜部分制备的 ScAlg2 和纯化的 TrxA-ScAlg2 证明了其可以转移 α-1,3/1,6 连键的甘露糖，会以不同的催化速率同时合成 α-1,3 或 α-1,6 连键 Man2GlcNAc2PP-Dol 两种中间体[12-13,21]。最近研究人员成功地将从人类胚胎肾（HEK）293 细胞中纯化的 hAlg2 应用于化学酶法生产 Man5GlcNAc2-PP-Dol 类似物[22]。

然而，用动物细胞表达蛋白质成本相对较高。目前，在大肠杆菌中表达 hAlg2 的相关研究鲜有报道。在真核细胞中，Alg2 的天然底物是 Man1GlcNAc2-PP-Dol。多萜醇（Dolichol）的碳链较长，使得该天然底物的合成和纯化难度较高。有研究表明，GlcNAc2-PP-Phytanyl（PPGn2）可被用作 Alg1 天然底物的替代物[23]。因此，使用碳链短且结构相似的植烷醇（Phytanol）替代天然底物中的多萜醇是目前的极佳选择。作者所在课题组曾在大肠杆菌中表达了酵母来源的重组蛋白 Alg1ΔTM，详细阐明了其酶学性质，并成功合成了 Man1GlcNAc2-PP-Phy（PPGn2M1）[24]作为 hAlg2 的底物用以研究其体外活性。

作者利用酿酒酵母生长表型回补系统，对 hALG2 基因的体内功能和蛋白质表达进行了分析。此外，利用原核表达系统操作简单，成本低廉的特点，在大肠杆菌中诱导表达了 TrxA-hAlg2 重组蛋白，并进行了分离纯化。结合基于 LC-MS 的 Alg-MTase 体外活性测定法[21,24-26]，对纯化的 TrxA-hAlg2 进行了体外的活性测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和培养基 酿酒酵母 w303a 模式菌株：作者所在实验室保藏；大肠杆菌克隆宿主细胞 XL10-Gold：作者所在实验室保藏；用于原核表达的大肠杆菌感受态 Rosetta（DE3）和用于原核表达的载体 pET28a 和 pET32a：购于默克密理博公司；质粒 YEp351GAPII 和 pRS315：作者在实验室保藏。

LB 培养基（g/L）：酵母提取物 5，胰蛋白胨 10，NaCl 10；TBK 培养基（g/L）：酵母提取物 24，胰蛋白胨 12，三水合磷酸氢二钾 16.4，磷酸二氢钾 2.31；加入体积分数 0.4%的甘油。根据实验需求，可在相应的培养基中加入终质量浓度 100 μg/mL 氨苄霉素或 34 μg/mL 氯霉素。

YPAD/YPAG 培养基（g/L）：酵母提取物 10，蛋白胨 20，腺嘌呤 0.03；SD/SG 缺陷型培养基（g/L）：YNB 6.7，氨基酸缺陷粉末 2。YPAD 或 SD 中额外加入终质量浓度 2 g/dL 的葡萄糖；YPAG 或 SG 中额外加入终质量浓度 2 g/dL 的半乳糖。

1.1.2 主要试剂和仪器 PrimeSTAR GXL DNA 聚

合酶、Mighty Mix DNA 连接酶、一系列限制性内切酶：购于宝生物工程(大连)公司；GoldView I 型核酸染色剂：购于索莱宝公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)，PCR 产物纯化、DNA 胶回收和 DNA 小量抽提试剂盒：购于生工生物工程(上海)公司；BCA 蛋白浓度试剂盒、SDS-PAGE 蛋白凝胶制备试剂盒：购于碧云天生物公司；Protease inhibitor cocktail、Anti-FLAG Mouse mAb：购于西格玛公司；Anti-Dpm1 Mouse mAb：购于艾博抗公司；Anti-His Mouse mAb、Goat Anti-Mouse IgG HRP、Blue Plus II Protein Marker、1 kb Plus DNA Ladder：购于全式金生物公司；PCR 仪、凝胶成像仪、半干电转仪：购于伯乐公司；1 mL HisTrap HP 亲和层析柱、ImageQuant™ LAS 4000 mini 显像仪：购于 GE healthcare 公司；NanoDrop2000、三重四极杆液质连用仪：购于赛默飞公司；液相色谱柱粒径 1.7 μm，2.1 mm×100 mm：购于沃特世公司。

1.1.3 实验溶液 Lysis buffer（酵母细胞裂解液）：0.2 mol/L 山梨醇，1 mmol/L EDTA，50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）；5×Sample buffer（蛋白质上样缓冲液）：10 g/dL SDS，0.5 g/dL 溴酚蓝，250 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，体积分数 50%甘油，5 g/dL β-巯基乙醇；Running buffer(蛋白质 RFM 电泳缓冲液)：25 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3），192 mmol/L 甘氨酸，0.1 g/dL SDS；Transfer buffer(转膜缓冲液)：25 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3），192 mmol/L 甘氨酸，体积分数 20%甲醇；TBST（洗膜缓冲液）：137 mmol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl（pH 7.6），体积分数 0.05% Tween-20；Buffer A（*E. coli* 裂解液）：150 mmol/L NaCl，25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)；Buffer B(平衡缓冲液)：150 mmol/L NaCl，25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，体积分数 0.3% Triton X-100；在 Buffer B 的基础上，按咪唑浓度 20、60、500 mmol/L 配制梯度洗脱缓冲液；Buffer C（除盐液）：50 mmol/L NaCl，25 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），体积分数 5%甘油；Buffer D（活性反应液）：38 mmol/L Tris-HCl（pH 7.2），1.8 mmol/L DTT，0.28 mmol/L EDTA，0.26 g/dL NP40。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 质粒 YEp351GAPII-FLAG-hALG2 的构建如下：以人 cDNA 为模板，X22：CGGGAGCTCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTCGAGGCGGAGGAGCAGGGCCGGG 和 X23：GCTCTAGATTATACCAGCAGTTTGGTAAC 为上下游引物(划线部分依次为 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切位点)，扩增目的基因 *FLAG-hALG2*。经 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后，将片段连入相同酶切的 YEp351GAPII。

质粒 pRS315-$ALG2_{pr}$-FLAG-hALG2-$ALG2_{ter}$ 的构建如下：以 YEp351GAPII-FLAG-hALG2 为模板，X48：TGCTCTAGAATGGACTACAAAGACGATGA 和 X19：AAAAAAGCTTTTATACCAGCAGTTTGGTAAC 为上下游引物，扩增基因 *FLAG-hALG2*。经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后，片段连入相同酶切的 pRS315-$ALG2_{pr}$-$ALG2_{ter}$。

质粒 pET32a-hALG2 的构建如下：以 YEp351GAPII-FLAG-hALG2 为模板，X17：CGCGGATCCGCGGAGGAGCAGGGCCGGGA 和 X19：AAAAAAGCTTTTATACCAGCAGTTTGGTAAC 为上下游引物，扩增基因 *hALG2*。经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后，片段连入相同酶切的 pET32a。

1.2.2 w303a-GAL1pr-ALG2 菌株的构建 以 pFA6a-His3MX6-PGAL1 为模板，X33：TAGATACAGTAGTAAAGACAGATAAAAAAGAGTCGATTAGACAAGCAAAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 和 X34：CCTAGGTCTGGATGAATAAAAGCAATCGTTCTTTTATCCTTTTCAATCATTTTGAGATCCGGGTTTT 为上下游引物，扩增含有酿酒酵母 ALG2 启动子区域同源臂和半乳糖启动子的基因片段。经乙醇沉淀法提取后，线性转化至野生型酵母 w303a 中，涂布至 SD-HIS 缺陷型固体培养基上。阳性转化子由菌落 PCR 和基因组 PCR 验证后获得，上游引物 F：CCATAGGATGATAATGCG，下游引物 R：TTATATTTCTTCATAAGG。

1.2.3 酵母点板实验 取对数生长期的酵母细胞，OD_{600} 在 1~3 之间均可。根据分光光度计测量的菌体 OD 值，计算并调节每个样品的起始 OD 数相同，用去离子水按 10 倍稀释，共 4 个梯度，每个梯度分别取 5 μL，依次点于 YPAD 或 YPAG 固体培养基，30 ℃静置培养 36 h。

1.2.4 酵母蛋白质的提取 取对数生长期的酵母细胞，OD_{600} 在 1~3 之间均可，收集 6~7 个 OD 单位的细胞，用 1 mL 去离子水洗涤一次。加入 200 μL Lysis buffer 重悬，同时加入适量 0.3~0.4 mm 规格玻璃珠 1×Protease inhibitor cocktail；振荡 1 min，冰上

1 min,重复 10 次,以下步骤在 4 ℃下进行。1 000 *g* 离心 5 min,去除未破碎细胞和细胞碎片。取上清液 200 μL,3 000 *g* 离心 5 min,进一步去除细胞碎片和细胞核组分,取上清液 180 μL 为全细胞蛋白质;13 000 *g* 离心 30 min,取沉淀为内质网膜组分,用 180 μL Lysis buffer 重悬。蛋白质浓度用 NanoDrop2000 测定。

1.2.5 重组蛋白的诱导表达和纯化 将含有原核表达载体 pET32a-hALG2 的大肠杆菌 Rosetta(DE3)单克隆转化子,接种于 5 mL 含氨苄霉素和氯霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃摇床过夜。次日,转接 2 mL 过夜培养的菌液至 200 mL 含卡那霉素和氯霉素的 TBK 液体培养基中,37 ℃摇床培养 3 h 左右。测得菌体 $A_{600\,nm}$ 达到 0.6~0.8 后,16 ℃摇床继续培养 1 h。最后加入终浓度 0.1 mmol/L IPTG,继续诱导培养 20 h。

离心收集所有菌体,20 mL BufferA 重悬后冰上超声破碎;4 000 *g* 离心 20 min,去除细胞碎片;取上清液 20 000 *g* 离心 90 min,取沉淀重悬于 10 mL Buffer B,静置 30 min;12 000 *g* 离心 30 min,得上清液为膜蛋白,以上过程在 4 ℃下完成。

用 10 mL Buffer B 过 His Trap HP(1mL)亲和层析柱,平衡;取上清液膜蛋白过柱,上样;10 mL Buffer B 去除未结合的蛋白质;分别用 10 mL 含 20、60 mmol/L 咪唑和含 500 mmol/L 咪唑+体积分数 5%的甘油的 BufferA 依次洗脱并收集至离心管,利用 SDS-PAGE 检测纯化蛋白质。最后,将含纯化的蛋白质洗脱液加至 Amicon Ultra 10 K NMWL 浓缩管,离心浓缩,并以 BufferC 除盐。蛋白质浓度由 BCA 试剂盒检测。

1.2.6 蛋白质免疫印迹 取适量蛋白质样品,加入对应 5×Sample buffer 后混匀,95 ℃处理 5 min。根据不同样品的蛋白质浓度,计算并保持所有蛋白质上样量的一致。装配电泳装置,加注适量 1×running buffer 后上样和蛋白质 Marker,在 180 V 恒压条件下运行 80 min。电泳完成后采用半干法转膜,条件设置为 25 V、0.1 A、30 min。转膜完成后,将 PVDF 膜浸于含 5 g/dL 脱脂奶粉的 TBST 中封闭,室温放置 1~2 h。一抗/二抗均稀释于含 5 g/dL 脱脂奶粉的封闭液中,一抗稀释比例 1:3 000,二抗稀释比例 1:5 000。封闭完成后取出 PVDF 膜,按顺序加入相应一抗、二抗,抗体孵育时间为室温 1~2 h 或 4 ℃过夜。抗体孵育完成后,用 TBST 洗涤 PVDF 膜 10 min,重复 3 次。取适量 ECL 显示剂 A 液和 B 液,以体积比 1:1 混匀。将显色液均匀散布在 PVDF 膜上,静置 1 min,用 Image Quant LAS 4000 mini 进行自动曝光拍摄。

1.2.7 体外活性反应体系 PPGn2M1 的合成详见文献[24]。加入终浓度 50 μmol/L PPGn2、2 mmol/L GDP-Man、10 mmol/L $MgCl_2$ 至 Buffer D 中,终体系为 100 μL,加入 2 μg 纯化的 Alg1NΔTM,30 ℃静置孵育 1 h,得 TrxA-hAlg2 的底物 PPGn2M1。对于 TrxA-hAlg2 的反应,取上述反应液 50 μL,直接加入 2.5 μg 纯化的 TrxA-hAlg2,30 ℃静置孵育 1 h。

1.2.8 LC-MS 检测糖链 向反应体系加入等体积 20 mmol/L 盐酸,100 ℃终止反应,同时酸解释放脂肪链上的糖链后,利用 Supelclean ENVI-Carb Slurry 对糖链进行固相萃取;纯化所得糖链经冷冻干燥后,用去离子水重悬;通过超效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000 UPLC 自动进样到氨基色谱柱 UPLC BEH Amide Column(粒径 1.7 μm,2.1 mm×100 mm)中,乙腈线性梯度洗脱(溶液 A:乙腈;溶液 B:去离子水)。洗脱条件:0~2 min 体积分数 20% B;2~15 min,体积分数 20%~50% B;15~18 min,体积分数 50% B;流量:0.2 mL/min。分离所得底物和产物,再经由 ESI-MS 仪器 TSQ Quantum Ultra 在正离子模式下同步检测相对分子质量。

2 结果与讨论

2.1 人源 Alg2 蛋白的疏水性预测

酿酒酵母 Alg2(ScAlg2)的 N 端含两个跨膜结构域,C 端两个疏水序列以非跨膜方式和内质网结合[13]。利用在线软件 TMpred(https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)对 hAlg2 进行跨膜预测,结果见图 1。hAlg2 仅在 N 端具有一个疏水性区域,位于氨基酸 85-104 位,是潜在的惟一内质网膜结合域。

hAlg2 这种膜结合形式与 ScAlg2 呈现出明显的差异,这也就引出了 hAlg2 在酿酒酵母中或在大肠杆菌中表达并纯化后,是否和 ScAlg2 之间存在差异的疑问。

2.2 w303a-*GAL1*$_{pr}$-*ALG2* 菌株的鉴定

在酿酒酵母中,*ALG2* 是必需基因,直接敲除会导致细胞死亡。因此,难以实现通过基因敲除获得

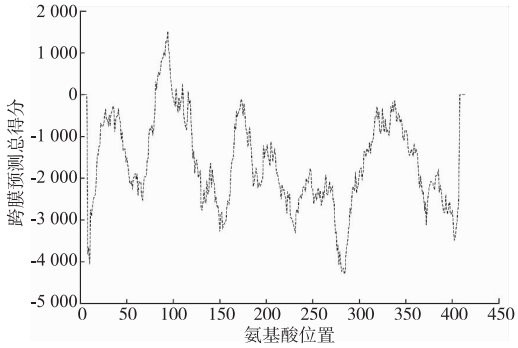


图 1　hAlg2 蛋白的 TMpred 跨膜预测

Fig. 1　Transmembrane prediction of hAlg2 protein using TMpred

完全无 *ALG2* 基因背景的菌株。通过基因改造母株 w303a 获得的菌株 w303a–$GAL1_{pr}$–*ALG2*，见图 2(a)。其基因组上 *ALG2* 自身启动子($ALG2_{pr}$)由半乳糖启动子($GAL1_{pr}$)取代。该菌株在半乳糖培养基中，*ALG2* 基因会被表达，细胞能够正常生长；在葡萄糖培养基中，*ALG2* 基因会被抑制表达，细胞会死亡。通过观察 XGY29 在葡萄糖培养基上的生长表型，可以判断在菌株中外源表达的基因是否具有体内活性。

以图 2(a)中所示 F、R 为上下游引物，取菌落 PCR 验证正确的 1 号、2 号单菌落基因组后进一步 PCR 验证，均得位于 1 500~2 000 bp 之间的单一条带，和理论大小 1 753 bp 相符；而野生型(WT)中由于不含引物 F 序列，无法扩增出目的带(图 2(b))。将 w303a–$GAL1_{pr}$–*ALG2*（1 号）和 w303a 点板于 YPAD 固体培养基上，前者表现出明显的生长缺陷，即其无法在含有葡萄糖的条件下生长(图 2(c))。这些结果说明 w303a–$GAL1_{pr}$–*ALG2* 菌株构建成功。

2.3　h*ALG2* 在 w303a–$GAL1_{pr}$–*ALG2* 菌株中的表型回补和蛋白质表达

将融合 FLAG 标签的 h*ALG2* 基因分别构建入含 TDH3 强启动子的多拷贝（2μ）质粒 YEp351GAPII(图 3(a)、(b))和含酵母 *ALG2* 启动子($ALG2_{pr}$)的单拷贝质粒 pRS315(图 3(c)、(d))中，构建成功的两种质粒经双酶切后电泳验证，均显示有两个条带，即载体条带和目的基因条带(理论大小为 1 281 bp)。

随后，将 YEp351GAPII(作为空载对照)和上述两个质粒分别在 w303a–$GAL1_{pr}$–*ALG2* 菌株中表达。如图 4(a)所示，在 YPAG 培养基上，w303a–

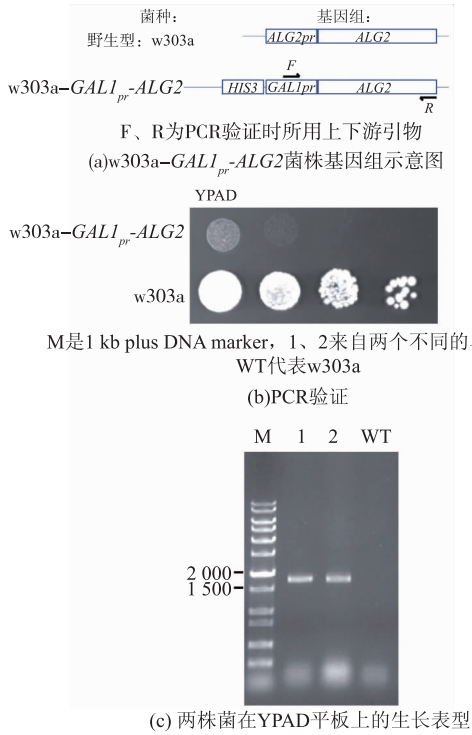


图 2　w303a–$GAL1_{pr}$–*ALG2* 菌株的构建和验证

Fig. 2　Construction and verification of w303a–$GAL1_{pr}$–*ALG2* strain

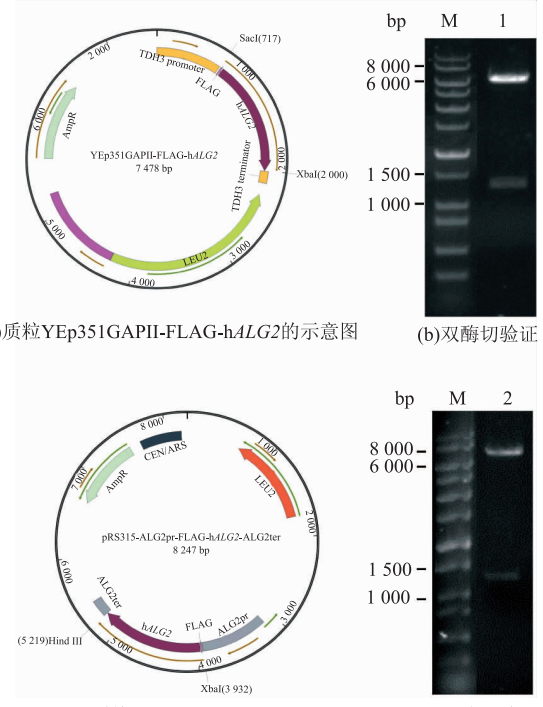


图 3　在酵母中表达 h*ALG2* 的质粒构建和验证

Fig. 3　Construction and verification of yeast plasmids containing h*ALG2*

GAL1$_{pr}$*–ALG2* 在分别转入 3 种质粒后均能正常生长，说明这些质粒不影响 Sc*ALG2* 正常表达时细胞的生长；在 YPAD 培养基上，仅当过表达外源的 h*ALG2* 时，才能回补该菌株的生长缺陷。提取对应的内质网膜蛋白组分进行免疫印记分析，仅能检测到过表达条件下的 hAlg2p 条带（50 000 左右），见图 4(b)。这些结果说明，h*ALG2* 基因在酵母细胞中具有功能同源性，而且仅在其过表达的条件下才能发挥功能。

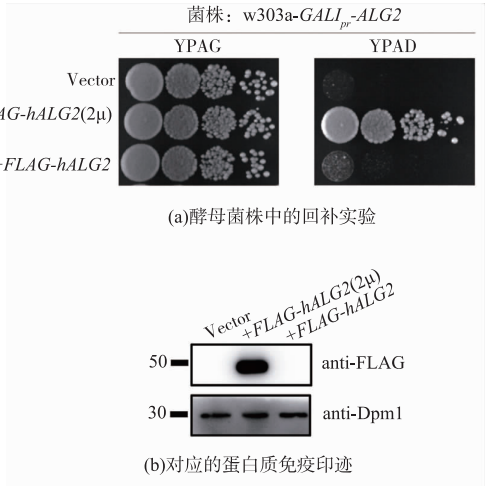


图 4　h*ALG2* 基因在 *GAL1*$_{pr}$*–ALG2* 酵母中的回补和表达

Fig. 4　Growth recovery and protein expression in GAL1pr–ALG2 strain by h*ALG2* gene

2.4　h*ALG2* 大肠杆菌表达质粒的构建与鉴定

表达质粒 pET32a–h*ALG2* 示意图见图 5(a)。经双酶切后电泳验证（图 5(b)），显示为两个条带，下端条带大小对应扩增的 h*ALG2* 条带（1 267 bp）；上端条带为载体片段，该质粒经过测序验证无碱基突变，说明表达质粒构建成功。

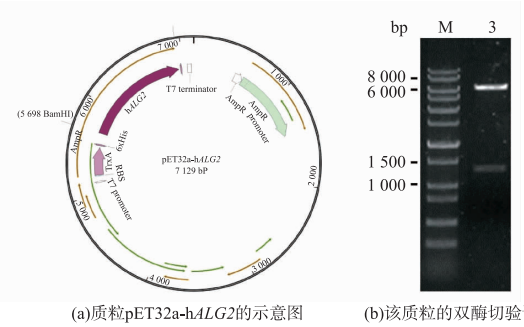


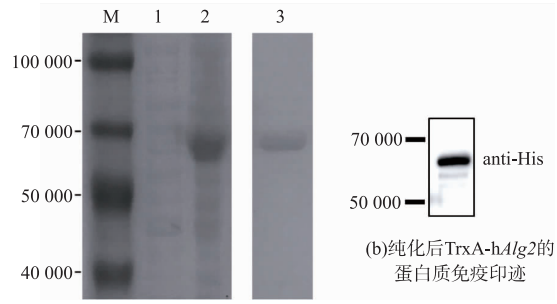
图 5　质粒 pET32a–h*ALG2* 的构建和验证

Fig. 5　Construction and verification of pET32a–h*ALG2*

2.5　TrxA–hAlg2 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

重组菌 Rosetta（DE3）/pET32a–h*ALG2* 在 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L 的含氨苄霉素抗性的 TB 培养基中诱导培养 20 h。离心收集菌体，破碎离心纯化上清液蛋白质，将洗脱后的蛋白质进行蛋白质电泳分析。

理论上目的蛋白质 TrxA–hAlg2 的相对分子质量为 61 400，如图 6(a)所示，相比于诱导前，诱导后在 50 000~70 000 之间出现一条明显的蛋白质条带，表明 TrxA–hAlg2 蛋白在大肠杆菌中成功表达。纯化后可以得到一条清晰的蛋白质条带，与诱导后条带大小相同。蛋白质免疫印迹也能检测到对应相对分子质量的纯化后蛋白质（见图 6(b)），这说明 TrxA–hAlg2 蛋白成功从大肠杆菌破碎上清液中纯化得到。浓缩除盐处理后得质量浓度为 2.5 mg/mL 的 TrxA–hAlg2 蛋白。



1：诱导前；2：诱导后；3：纯化后

(a)TrxA-h*Alg2*蛋白的SDS-PAGE电泳图

图 6　TrxA–h*Alg2* 蛋白的表达和纯化

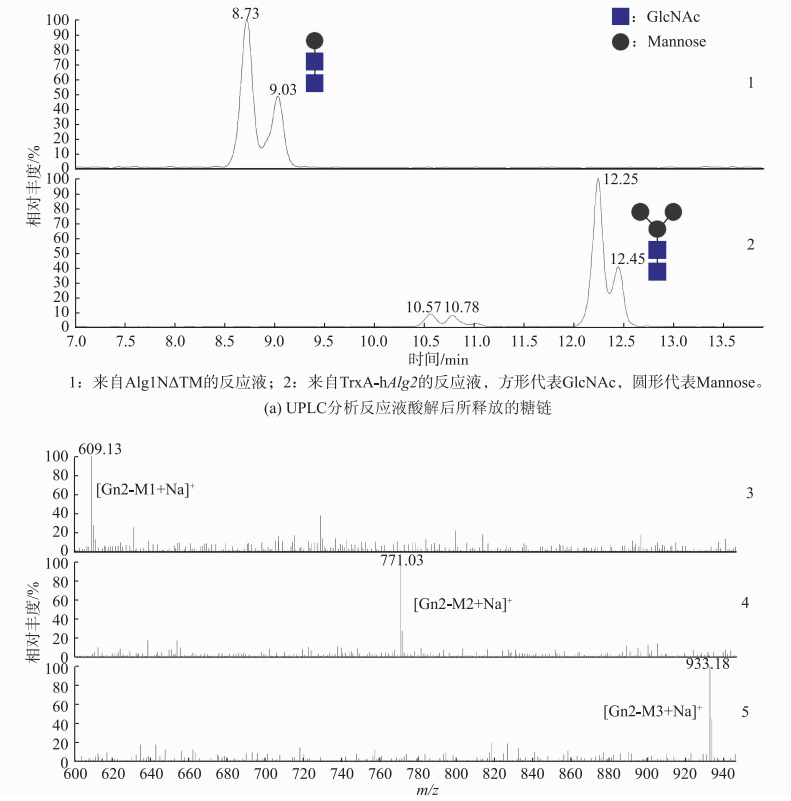
Fig. 6　Expression and purification of TrxA–h*Alg2* protein

2.6　TrxA–hAlg2 蛋白的活性分析

以 PPGn2 代替天然底物，GDP–mannose 为供体，由 Alg1NΔTM 催化反应 1 h 后，100 ℃下 2 min 终止反应并灭活 Alg1NΔTM。取一半反应液，作为 TrxA–hAlg2 的反应底物 PPGn2M1，加入纯化后的 TrxA–hAlg2 后，继续 30 ℃下反应 1 h。最后均向两份反应体系中加入等体积的 20 mmol/L HCl，100 ℃下酸解 1 h，释放脂肪链上的糖链。糖链经固相萃取后，进行 LC–MS 分析。

对于 Alg1NΔTM 的反应，在 UPLC 液相色谱中分别出现 8.73、9.03 的峰（见图 7(a)），ESI–MS 质谱分析该峰对应的质荷比 *m/z* 为 609，即其反应产物糖链的加钠值 $[Gn2–M1+Na]^+$（见图 7 (b)）。对于 TrxA–hAlg2 的反应，Gn2–M1 对应的峰完全消失，证明底物被 TrxA–hAlg2 完全反应；液相色谱显示在 10.57、10.78 和 12.25、12.45 有两组峰（图 7(a)），ESI–MS 质谱分析两组峰对应的质荷比 *m/z* 分别为

771 和 933，对应其反应产物糖链的加钠值 [Gn2-M2+Na]$^+$和[Gn2-M3+Na]$^+$(图 7(b))。这些结果说明，在大肠杆菌中表达纯化的 TrxA-hAlg2 蛋白同样具有 α-1,3/1,6 甘露糖转移酶活性，即向 PPGn2M1 上添加两个甘露糖形成 PPGn2M3。



1：来自Alg1NΔTM的反应液；2：来自TrxA-h*Alg2*的反应液，方形代表GlcNAc，圆形代表Mannose。

(a) UPLC分析反应液酸解后所释放的糖链

(b) ESI-MS分析对应UPLC峰的质荷比

图 7　TrxA-hAlg2 蛋白的活性测定

Fig. 7　Activity assay of TrxA-hAlg2 protein

3 结　语

通过分析发现，人源 Alg2 蛋白的 84~104 位氨基酸是潜在的惟一膜结合区域，且疏水性较小。尽管这和酿酒酵母 ScAlg2 蛋白的膜拓扑结构完全不同，但在酿酒酵母中过表达 h*ALG2* 基因时，hAlg2 蛋白能稳定表达，且能够回补 Sc*ALG2* 基因缺失时细胞的生长缺陷。hAlg2 蛋白在酵母细胞体内的功能同源性和低疏水性的膜蛋白性质，为其在大肠杆菌中的表达纯化和后续活性测定提供理论依据。作者在大肠杆菌中表达了 hAlg2 并对其进行了纯化，相比动物细胞表达体系，成本较低。在体外活性实验中，结合 LC-MS 技术，证实 hAlg2 具有催化 PPGn2M1 形成中间体 PPGn2M2 和终产物PPGn2M3 的甘露糖基转移酶功能。对 N-糖基化途径中人源的甘露糖基转移酶 hAlg2 的外源表达和体外活性进行的研究，为将来进一步探索 Alg2 的酶学性质和晶体结构解析奠定了基础。此外，利用大肠杆菌表达系统提纯的 hAlg2，也为研究 ALG2-CDG 病人相关突变体的体外活性提供了更加直接、方便、快捷的方法。

参考文献：

[1] AEBI M. N-linked protein glycosylation in the ER[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Molecular Cell Research**,2013,1833(11):2430-2437.

[2] BURDA P,AEBI M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,1999,1426(2):239-257.

[3] BREITLING J,AEBI M. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum[J]. **Cold Spring Harb Perspect Biol**,2013,

5(8)：a013359.
[4] KELLEHER D J，KARAOGLU D，GILMORE R. Large-scale isolation of dolichol-linked oligosaccharides with homogeneous oligosaccharide structures：determination of steady-state dolichol-linked oligosaccharide compositions[J]. **Glycobiology**，2001，11(4)：321-333.
[5] SAMUELSON J，BANERJEE S，MAGNELLI P，et al. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**，2005，102(5)：1548-1553.
[6] SCHWARZ F，AEBI M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation[J]. **Curr Opin Struct Biol**，2011，21(5)：576-582.
[7] WEERAPANA E，IMPERIALI B. Asparagine-linked protein glycosylation：from eukaryotic to prokaryotic systems[J]. **Glycobiology**，2006，16(6)：91-101.
[8] LARKIN A，IMPERIALI B. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation[J]. **Biochemistry**，2011，50(21)：4411-4426.
[9] SCHMALTZ R M，HANSON S R，WONG C-H. Enzymes in the synthesis of glycoconjugates[J]. **Chem Rev**，2011，111(7)：4259-4307.
[10] HELENIUS A，AEBI M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum[J]. **Annual Review of Biochemistry**，2004，73：1019-1049.
[11] KNAUER R，LEHLE L. The oligosaccharyltransferase complex from yeast[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)–General Subjects**，1999，1426(2)：259-273.
[12] O'REILLY M K，GUOFENG Z，BARBARA I. *In vitro* evidence for the dual function of Alg2 and Alg11：essential mannosyltransferases in N-linked glycoprotein biosynthesis[J]. **Biochemistry**，2006，45(31)：9593-9603.
[13] KAMPF M，ABSMANNER B，SCHWARZ M，et al. Biochemical characterization and membrane topology of Alg2 from Saccharomyces cerevisiae as a bifunctional alpha1，3- and 1，6-mannosyltransferase involved in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis[J]. **The Journal of Biological Chemistry**，2009，284(18)：11900-11912.
[14] JACKSON B J，WARREN C D，BUGGE B，et al. Synthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*：Man 2 GlcNAc 2 and Man 1 GlcNAc 2 are transferred from dolichol to protein *in vivo*[J]. **Archives of Biochemistry & Biophysics**，1989，272(1)：203-209.
[15] PRAKASH C，VIJAY I K. Characterization of intermediates up to lipid-linked heptasaccharide implicated in the biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins[J]. **Biochemistry**，1982，21(19)：4810-4818.
[16] GAO X-D，NISHIKAWA A，DEAN N. Physical interactions between the Alg1，Alg2，and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum[J]. **Glycobiology**，2004，14(6)：559-570.
[17] TAKAHASHI T，GAO X-D. Physical interactions among human glycosyltransferases involved in dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis[J]. **Trends Glycosci Glycotechnol**，2012，24(136)：65-77.
[18] HUFFAKER T C，ROBBINS P W. Yeast mutants deficient in protein glycosylation[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**，1983，80(24)：7466-7470.
[19] JACKSON B J，KUKURUZINSKA M A，ROBBINS P. Biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*：the alg2 mutation[J]. **Glycobiology**，1993，3(4)：357-364.
[20] THIEL C，SCHWARZ M，PENG J，et al. A new type of congenital disorders of glycosylation(CDG-Ii) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis[J]. **The Journal of Biological Chemistry**，2003，278(25)：22498-22505.
[21] LI S T，WANG N，XU X-X，et al. Alternative routes for synthesis of N-linked glycans by Alg2 mannosyltransferase[J]. **The FASEB Journal**，2018，32(5)：2492-2506.
[22] RAMIREZ A S，BOILEVIN J，LIN C W，et al. Chemo-enzymatic synthesis of lipid-linked GlcNAc2Man5 oligosaccharides using recombinant Alg1，Alg2 and Alg11 proteins[J]. **Glycobiology**，2017，27(8)：726-733.
[23] FLITSCH S L，PINCHES H L，TAYLOR J P，et al. Chemo-enzymatic synthesis of a lipid-linked core trisaccharide of N-linked glycoproteins[J]. **Journal of the Chemical Society，Perkin Transactions 1**，1992，16)：2087-2093.
[24] LI S T，WANG N，XU S，et al. Quantitative study of yeast Alg1 beta-1，4 mannosyltransferase activity，a key enzyme involved in protein N-glycosylation[J]. **Biochimica et Biophysica Acta General Subjects**，2017，1861(1 Pt A)：2934-2941.
[25] LI S T，LU T T，XU X X，et al. Reconstitution of the lipid-linked oligosaccharide pathway for assembly of high-mannose N-glycans[J]. **Nature Communications**，2019，10(1)：1813.
[26] XU X X，LI S T，WANG N，et al. Structural and functional analysis of Alg1 beta-1，4 mannosyltransferase reveals the physiological importance of its membrane topology[J]. **Glycobiology**，2018，28(10)：741-753.