空肠弯曲菌β1,3–半乳糖基转移酶(CgtB)突变体的设计及活性鉴定

邓梦雪， 杨秀怡， 龙云峰， 刘若兰， 刘行辉， 苏延停*

（湖北科技学院 基础医学院，湖北 咸宁 437100）

摘要：来自空肠弯曲菌的β1,3–半乳糖基转移酶(CgtB)主要负责蛋白质O–连接糖基化的第二步延伸，在O–连接N–乙酰半乳糖胺(O–GalNAc)修饰后面添加一个半乳糖，目前CgtB已经被广泛应用于体外O–连接糖基化的合成。为了开发O–GalNAc修饰的识别工具，CgtB蛋白质用于突变体设计。在基因水平删除N端30个氨基酸及C端的30个氨基酸得到Cgt1，将Cgt1构建在*pMal–c5x*表达质粒上并通过大肠杆菌进行原核表达。可溶性的Cgt1经过麦芽糖结合蛋白(MBP)亲和层析柱进行纯化并利用糖结合实验进行活性分析。结果显示，大肠杆菌体系可以成功表达可溶性重组Cgt1蛋白质，相对分子质量约为70 000，重组的Cgt1具备结合O–GalNAc修饰蛋白质的活性；针对不同的标准糖蛋白，Cgt1只识别含有O–GalNAc修饰的黏蛋白(mucin)；对于复杂的细胞样品，Cgt1可以特异性识别细胞内的O–GalNAc修饰。该研究开发的识别O–GalNAc修饰工具，为进一步研究O–GalNAc修饰的功能奠定了基础。

关键词：β1,3–半乳糖基转移酶；N–乙酰半乳糖胺；原核表达；O–GalNAc修饰

中图分类号：Q 78　**文章编号**：1673–1689(2023)06–0020–06　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673–1689.2023.06.004

Design and Activity Assay of β1,3–Galactosyltransferase (CgtB) Mutants from Bacterium *Campylobacter jejuni*

DENG Mengxue， *YANG Xiuyi*， *LONG Yunfeng*， *LIU Ruolan*， *LIU Xinghui*， *SU Yanting**

(School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

Abstract: β1,3-galactosyltransferase (CgtB) from bacterium *Campylobacter jejuni* is mainly responsible for the second elongation of proteins O-glycosylation by transferring a galactose to O-linked N-acetylgalacosamine (O-GalNAc). Presently, CgtB has been widely applied in the synthesis of O-glycoproteins. To develop a recognition tool for O-GalNAc modification, the CgtB protein was used for mutant design. Cgt1 was generated by deleting 30 amino acids from both the N- and C-terminal regions at the gene level. Cgt1 was constructed in *pMal–c5x* expression plasmid and expressed in the *Escherichia coli*. The soluble Cgt1 was purified by affinity chromatography with maltose binding protein (MBP) column and the activity assay was carried out by glycan binding activity. The results suggested that the soluble recombinant Cgt1 with the molecular weight of approximately 70 000 could be successfully expressed in the system of *Escherichia coli*. The

收稿日期：2021–12–07

基金项目：国家自然科学基金青年基金项目(32000906)；湖北科技学院博士启动基金项目(BK202038)。

* **通信作者**：苏延停(1991—)，男，博士，讲师，硕士研究生导师，主要从事糖基化检测研究。E–mail：2014202040134@whu.edu.cn

recombinant Cgt1 possessed the activity of binding O-GalNAc modified proteins. For different standard glycoproteins, Cgt1 only recognized mucin containing O-GalNAc modification. For complex cellular samples, Cgt1 could specifically recognize intracellular O-GalNAc modification. The developed recognition tool for O-GalNAc modification in this research will provide a foundation for further research on the function of O-GalNAc modification.

Keywords: β1,3-Galactosyltransferase, N-acetylgalactosamine, prokaryotic expression, O-GalNAc modification

糖基化修饰是一种最普遍的蛋白质翻译后修饰之一，调控蛋白质的诸多功能，例如蛋白质折叠、蛋白质与蛋白质的识别等[1]。在近几十年，研究者已经在脊椎动物中发现了几百种糖基转移酶，他们负责合成了 7 000 多种糖结构[2]。不同的糖链组成和连接方式使糖结构变得十分复杂，这给分析糖基化修饰造成了很大的困难[3]。

蛋白质的糖基化修饰根据连接的基团和氨基酸分为 N-连接糖基化修饰和 O-连接糖基化修饰。N-连接糖基化修饰过程起始于内质网，成熟于高尔基体，共价连接在天冬酰胺的氨基上。而 O-连接糖基化修饰主要发生在高尔基体，共价连接在丝氨酸或苏氨酸等的羟基上。O-连接糖基化修饰一般是以 GalNAc 为第一个单糖直接结合氨基酸上，随后其他的单糖继续添加到 GalNAc 后延伸。缩短的 O-连接糖链特别是只含有一个单糖即 O-GalNAc 修饰在很多肿瘤细胞里出现了高表达，所以 O-GalNAc 修饰又被称为肿瘤相关抗原即 Tn 抗原[4]。目前仍然不是很清楚 Tn 抗原在肿瘤发展过程中到底扮演着什么样的角色。在结肠直肠癌中，Tn 抗原可以结合树突状细胞和巨噬细胞表面的半乳糖凝集素即 MGL，导致这些细胞活性受到抑制，最终肿瘤细胞发生逃逸[4]。在乳腺癌中，高表达的 Tn 抗原可以通过招募 Galectin-3 和 MUC1 使肿瘤细胞能够吸附在内皮细胞上，从而促进了肿瘤细胞的转移[5]。

目前识别 O-GalNAc 修饰的工具很有限，有很多文献报道能够识别 O-GalNAc 修饰的单克隆抗体，但是大部分抗体对 O-GalNAc 修饰的识别依赖于 2 个以上连续的 O-GalNAc 修饰，有些单克隆抗体还会对氨基酸序列有一定的依赖性，这样就导致了这类单克隆抗体可能对很多 O-GalNAc 修饰的蛋白质的识别不敏感，不适用于 O-GalNAc 修饰的大规模鉴定[6-7]。而凝集素仍然是广泛应用于识别这种修饰的有力工具，这些凝集素大多来源于植物和真菌。目前发现了有很多凝集素可以识别 O-GalNAc 修饰，例如凝集素 VVL、TL2、MPL、DBA 和 Ricin 等[8]。这些报道识别 O-GalNAc 修饰的凝集素都是由二聚体或者四聚体通过非共价连接，特异性不专一，会结合其他的单糖例如 galactose 末端糖结构。综合而言，目前并没有一个对 O-GalNAc 修饰十分特异的凝集素，识别工具的缺乏也导致了对 O-GalNAc 修饰的研究十分困难。

CgtB 是来源于空肠弯曲菌的β1,3-半乳糖基转移酶，CgtB 已经广泛用于体外合成 O-连接糖基化修饰，例如应用多操纵子原核表达元件同时表达 CgtB、ppGalNAc-T2 糖基转移酶和目的蛋白质，成功表达出含有 O-连接糖基化修饰的目的蛋白质[9]。对 CgtB 的结构研究表明，不同菌株的 CgtB 的 N 端前 108 个氨基酸高度保守，可能是供体 UDP-半乳糖的结合位点，而 C 端则是受体糖蛋白(O-GalNAc 修饰蛋白质)的结合位点，同时 C 端去除 30 个氨基酸后偶联 MBP 标签会提高酶的效率[10]。对于糖基转移酶的改造有很多尝试，目前已有用来源于产气荚膜梭菌的糖苷水解酶的突变（突变了活性位点，保留了糖结合活性）来识别相应糖基化修饰[11-12]。对 N-乙酰葡糖胺转移酶 I(hGnT-I)的突变(截除 N 端跨膜域)仍然能催化特异性糖基化[13]。我们对 CgtB 进行基因改造，将其 N 端部分序列和 C 端末尾 30 个氨基酸删除，从而只保留 CgtB 对 O-GalNAc 修饰的结合活性。通过原核表达，我们成功表达纯化出突变体 CgtB 蛋白质即 Cgt1，通过糖蛋白结合实验证明了 Cgt1 保持了结合 O-GalNAc 的活性，并且可以作为识别肿瘤细胞中 O-GalNAc 修饰的工具，这为进一步研究 O-GalNAc 修饰打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株、质粒和培养基 *pMal–c5 x* 质粒、克隆菌 DH5α 和表达菌 BL21(DE3):购于武汉擎科生物公司,引物合成及基因测序由武汉擎科生物公司完成;LB 培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L;LA 培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂粉 20 g/L,121 ℃高压蒸汽灭菌 20 min 后备用。

1.1.2 主要试剂和抗体 Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 NdeI 和 EcoR Ⅰ、DNA Ligation Kit、氨苄青霉素、MBP 层析柱及填料、丽春红染料:购于碧云天生物技术公司;考马斯亮蓝 R–250 染料:购于 Biosharp;免疫印迹检测及 ELISA 所用抗体:购于 Proteintech。

1.2 方法

1.2.1 CgtB 突变体 Cgt1 的改造方案 首先将 CgtB 的 C 端去除 30 个氨基酸,再将 CgtB 的 N 端去除 30 个氨基酸即为 Cgt1。改造的基因序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 *Cgt1* 突变体的目的基因扩增及质粒载体 *pMal–c5x* 的双酶切 以改造的 *Cgt1* 突变体的合成基因序列为模板进行扩增,1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳,电压 140 V,电泳 15 min,回收扩增的目的基因片段。Cutsmart Buffer 5 μL,*pMal–c5x* 质粒 3 μg,限制性核酸内切酶 *Nde* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ各 2 μL,补 ddH_2O 至 50 μL,37 ℃双酶切 30 min,经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳回收。

1.2.3 重组质粒 *pMal–c5x–Cgt1* 体系的构建 以 10 μL DNA 无缝连接酶、3 μL *Cgt1* 基因扩增片段、1 μL *pMal–c5x* 质粒双酶切产物,补 6 μL ddH_2O 至 20 μL 体系,50 ℃、20 min 无缝连接得重组质粒 *pMal–c5x–Cgt1*,重组质粒图谱见图 1。取 10 μL 重组质粒 *pMal–c5x–Cgt1* 转入 50 μL 的 DH5α 感受态细胞中,冰浴 30 min,42 ℃热激 1 min,加入 1 mL LB 培养基,37 ℃培养 1 h,3 000 r/min 离心 1 min。取下层 100 μL 涂布于氨苄青霉素抗性平板,过夜培养后挑取单菌落,37 ℃培养 9 h 后菌液 PCR 初步验证,后进行单向测序进一步验证。取阳性菌液扩大培养提取质粒,将所提质粒转化到表达菌 BL21(DE3)中。

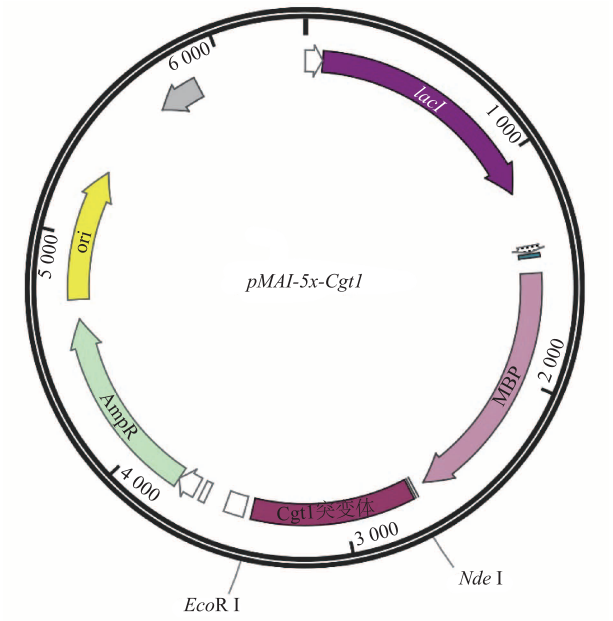


图 1 重组质粒 *pMal–c5x–Cgt1* 的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid profile of the recombinant plasmid *pMal–c5x–Cgt1*

1.2.4 Cgt1 的少量诱导 取 *Cgt1* 阳性菌液于 1 mL LB 培养基中,37 ℃扩大培养,随后以 1:100 菌液比例转入到 10 mL LB 培养基中,37 ℃扩大培养 2.5 h,至 OD 值达对数期即 0.6~1.0,然后加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L,16 ℃、160 r/min 诱导 12 h。菌液于 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,用 1 mL PBS 缓冲液重悬混匀沉淀。超声破碎后于 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min。

1.2.5 Cgt1 的大量表达及纯化 取阳性菌液在 1 mL LB 培养基中过夜扩大培养,以 1:100 菌液比转入到 10 mL LB 培养基中培养 7 h,随后转入到 1 L 的 LB 培养基中,扩大培养约 2.5 h 使 OD 值达到对数期即 0.6~1.0,然后加入 IPTG 使终浓度为 1 mmol/L,16 ℃、160 r/min 诱导 12 h。将 1 L 菌液于 4 000 r/min 离心 20 min,去上清液,用 40 mL 0.01 mol/L MBP 缓冲液(20 mmol/L Tris–HCl,200 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,pH 7.4)将沉淀重悬混匀。超声破碎,功率为 200 W,破碎 10 s,停 10 s,共 90 次。破碎完毕后于 12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液中蛋白质样品,过 0.45 μm 滤膜除去不溶物。上样于预先用 MBP 缓冲液平衡好的 MBP 亲和层析柱,流量为 1 mL/min,上样完成后,用 MBP 缓冲液洗去非特异性结合的杂蛋白质,直到蛋白质检测仪所测值不再变化,大约需 1 h,最后用 50 mmol/L 麦芽糖进

行洗脱，收集洗脱峰，层析柱用 ddH_2O 洗涤后用20%乙醇洗涤后保存。

1.2.6 Cgt1 的 ELISA 活性检测 用包被液(pH 9.6的 $NaHCO_3$)分别将黏蛋白(含有 O-GalNAc 修饰，以 O-连接糖基化为主)，Transferrin（含有 N-Glycans)标准糖蛋白稀释至 10 μg/mL，每孔 100 μL，4 ℃包被过夜。吸出包被液，用体积分数 0.1%的 PBST（PBS 缓冲液，0.1%的 Tween 20）洗涤 3 次，用 3 g/dL 的 BSA 室温封闭 1 h，PBST 洗涤 3 次，开始孵育质量浓度为 20 μg/mL 的 Cgt1 突变体蛋白质溶液，室温孵育 1 h，用 PBST 洗涤 5 次，随后室温孵育鼠源 MBP 一抗(1∶1 000)1 h，洗涤 5 次后室温孵育羊抗鼠二抗(1∶5 000)1 h，PBST 洗涤 5 次，向每孔加入 100 μL TMB 反应液避光显色，30 min 后加入 100 μL、1 mmol/L 盐酸终止反应，用酶标仪检测每孔在 450 nm 的吸光值。

1.2.7 Cgt1 对细胞中 O-GalNAc 修饰的鉴定 分别准备两组相同的 HeLa 和 HepG2 细胞样品，同时制样，并于 10 g/dL SDS-PAGE 分析，在 Marker 的 10 000 条带接近板底部时停止电源，开始转膜至 PVDF 膜上，5 g/dL 的 BSA 室温封闭 1 h。一组室温孵育 2 μg/mL Cgt1 蛋白质溶液；另一组室温孵育提前混合旋转 1 h 的 2 μg/mL Cgt1 蛋白质和 50 mmol/L N-乙酰半乳糖胺的混合溶液 1 h，即糖封闭过程，洗涤后于室温孵育鼠源 GST 一抗(1∶2 000)1 h，随后室温孵育辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1∶5 000)1 h，显影液反应后，暗室显影。

2 结果与分析

2.1 Cgt1 突变体的基因改造分析

为增加其可溶性表达，去除 CgtB C 端的 30 个氨基酸。大量研究发现，不同菌株的 CgtB 的 N 端前 108 个氨基酸高度保守，可能是供体 UDP-半乳糖的结合位点，所以为了突变 CgtB 的催化活性位点，将 CgtB（C 端已经删除 30 个氨基酸）的 N 端去除 30 个氨基酸即为 Cgt1，改造路线见图 2。



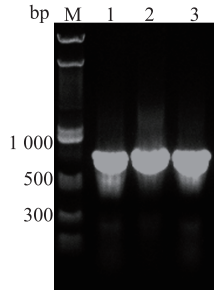
CgtB C 端已去除 30 个氨基酸，将其 N 端去除 30 个氨基酸后为 Cgt1。

图 2 CgtB 的改造路线

Fig. 2 Transforming strategy of CgtB

2.2 *Cgt1* 突变体基因扩增及 *pMal-c5x* 质粒双酶切结果

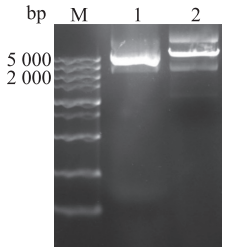
以合成的 *Cgt1* 基因序列作为模版扩增目的基因，所得 3 管 PCR 扩增产物经 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳验证，见图 3。在 800 bp 附近均有明显条带，与改造后的目的基因大小 753 bp 相一致。将双酶切质粒产物与酶切前的质粒经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳对照，结果见图 4。可见双酶切后的质粒从 3 条带变成 1 条带，并且酶切前后条带大小有明显差异，说明 *pMal-c5x* 双酶切成功。



M：DL5000；1、2、3：*Cgt1* PCR 扩增产物。

图 3 *Cgt1* 突变体 PCR 基因扩增

Fig. 3 Gene PCR amplification of *Cgt1* mutant



1：双酶切后的质粒；2：双酶切前的质粒。

图 4 *pMal-c5x* 质粒的双酶切

Fig. 4 Double enzyme digestion of *pMal-c5x* plasmid

2.3 重组质粒转化后的 PCR 验证

将重组质粒转化到克隆菌 DH5α 后，随机挑取 2 个单克隆菌落在 1 mL LB 培养基中培养扩大，9 h 后以 1 μL 菌液作为模板进行 PCR 验证，1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳结果见图 5。可见 2 个单克隆菌落均在 800 bp 左右有明显条带，与预期大小一致，初步判断为阳性。取该菌液进一步测序验证，其序列均完全符合，为阳性。

2.4 *Cgt1* 突变体的表达及纯化

取未诱导的阳性菌上清液和 IPTG 少量诱导的阳性菌上清液各 400 μL，蛋白质抽提制样(甲醇氯仿抽提，$V_{蛋白质液}$∶$V_{甲醇}$∶$V_{氯仿}$为 4∶4∶1)，经 SDS-PAGE

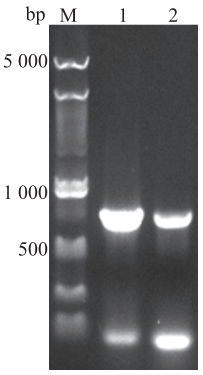
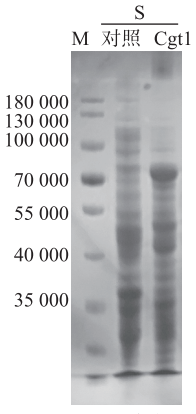


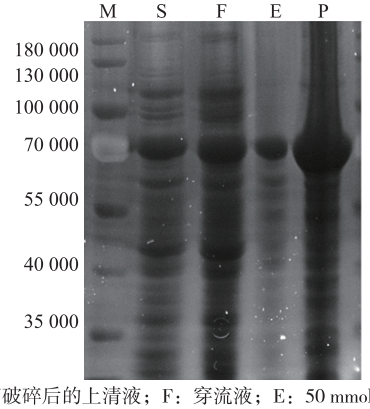
图 5 *pMal–c5x–Cgt1* 重组质粒体系的菌液 PCR 验证

Fig. 5 PCR validation for *pMal–c5x–Cgt1* recombinant plasmid system

和考马斯亮蓝染色,结果见图 6(a)。Cgt1 可溶性表达,随后大量表达 Cgt1 蛋白质。将上样前的蛋白质液和 MBP 亲和层析柱纯化收集到的 2 个样品即 50 mmol/L 麦芽糖的洗脱液、穿流液,各取 200 μL 分别进行蛋白质抽提制样 (甲醇氯仿抽提,$V_{蛋白质液}$:$V_{甲醇}$:$V_{氯仿}$为 4:4:1)。与超声破碎后的沉淀样品经 SDS–PAGE 和考马斯亮蓝染色,结果见图 6(b)。可见目的蛋白质 Cgt1 富集于 50 mol/L 麦芽糖的洗脱液中,条带纯度较高,和预期大小(70 000)一致。用 PBS 反复超滤置换原始的缓冲液, 超滤后测得 Cgt1 蛋白质的终质量浓度为 0.5 mg/mL。



(a) Cgt1的IPTG少量诱导



S:超声破碎后的上清液;F:穿流液;E:50 mmol/L麦芽糖的洗脱液;
P:超声破碎后的沉淀。

(b) Cgt1的纯化

图 6 Cgt1 的表达与纯化

Fig. 6 Expression and purification of Cgt1

2.5 Cgt1 的 ELISA 活性检测

Cgt1 的 ELISA 检测结果见图 7。结果显示,Cgt1 能特异结合 O–GalNAc 修饰的 mucin 标准糖蛋白,而对 BSA 和含有 N–连接糖基化的 Transferrin 即转铁蛋白没有结合活性, 该结果说明 Cgt1 保留 O–GalNAc 结合活性。

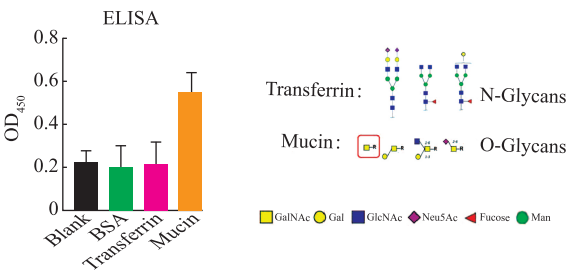


图 7 Cgt1 对不同糖蛋白的结合

Fig. 7 Bindings profiles of Cgt1 to different glycoproteins

2.6 Cgt1 对不同肿瘤细胞中的 O–GalNAc 修饰鉴定

Cgt1 作为糖识别工具的免疫印迹结果见图 8。在 HepG2 和 HeLa 复杂肿瘤细胞样品中,Cgt1 均鉴别到大量 O–GalNAc 修饰信号,该结果证明 Cgt1 具有 O–GalNAc 修饰结合活性。

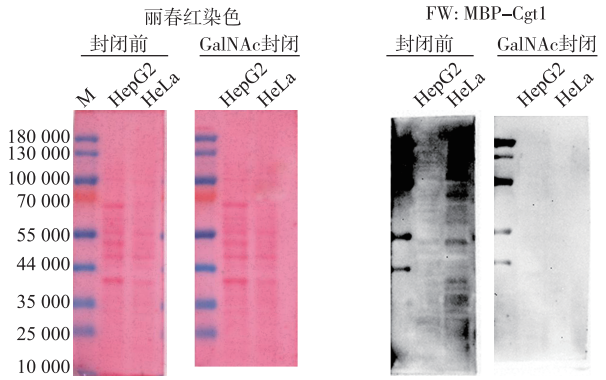


图 8 Cgt1 对不同肿瘤细胞的 O–GalNAc 修饰鉴定

Fig. 8 O –GalNAc modification in different tumor cells identified by Cgt1

3 结 语

本课题组通过改造 CgtB 的基因，突变其催化活性位点，保留其糖结合位点，实现了其突变体 Cgt1 在大肠杆菌中的大量表达、MBP 亲和层析柱纯化，并在纯化后验证了 Cgt1 对 O-GalNAc 修饰的结合活性。通过糖蛋白结合实验，证明 Cgt1 保留了其 O-GalNAc 修饰结合活性，并且可以作为鉴别 O-GalNAc 修饰的鉴定工具，这对 O-GalNAc 修饰的研究起到了极大的推动作用。

参考文献:

[1] EICHLER J. Protein glycosylation [J]. **Current Biology**, 2019, 29(7): R229-R231.

[2] MOREMEN K W, RAMIAH A, STUART M, et al. Expression system for structural and functional studies of human glycosylation enzymes[J]. **Nature Chemical Biology**, 2018, 14(2): 156-162.

[3] ZHAO J, LI S, LI C, et al. Identification of low abundant isomeric N-glycan structures in biological therapeutics by LC/MS [J]. **Analytical Chemistry**, 2016, 88(14): 7049-7059.

[4] FU C, ZHAO H, WANG Y, et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen[J]. **HLA**, 2016, 88(6): 275-286.

[5] KOLBL A C, JESCHKE U, FRIESE K, et al. The role of TF- and Tn-antigens in breast cancer metastasis[J]. **Histol Histopathol**, 2016, 31(6): 613-621.

[6] PERSSON N, STUHR-HANSEN N, RISINGER C, et al. Epitope mapping of a new anti-Tn antibody detecting gastric cancer cells[J]. **Glycobiology**, 2017, 27(7): 635-645.

[7] MATSUMOTO Y, KUDELKA M R, HANES M S, et al. Identification of Tn antigen O-GalNAc-expressing glycoproteins in human carcinomas using novel anti-Tn recombinant antibodies[J]. **Glycobiology**, 2020, 30(5): 282-300.

[8] POIROUX G, BARRE A, VAN DAMME E J M, et al. Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy[J]. **International Journey of Molecular Sciences**, 2017, 18(6): 1232.

[9] DU T, BUENBRAZO N, KELL L, et al. A bacterial expression platform for production of therapeutic proteins containing human-like O-linked glycans[J]. **Cell Chemical Biology**, 2019, 26(2): 203-212.

[10] BERNATCHEZ S, GILBERT M, BLANCHARD M C, et al. Variants of the beta 1,3-galactosyltransferase CgtB from the bacterium *Campylobacter jejuni* have distinct acceptor specificities[J]. **Glycobiology**, 2007, 17(12): 1333-1343.

[11] SONG J, LIU C, WANG X, et al. O-GlcNAcylation quantification of certain protein by the proximity ligation assay and clostridium perfringen OGA(D298N)(CpOGA(D298N))[J]. **ACS Chemical Biology**, 2021, 16(6): 1040-1049.

[12] SCHIMPL M, BORODKIN V S, GRAY L J, et al. Synergy of peptide and sugar in O-GlcNAcase substrate recognition [J]. **Chemistry & Biology**, 2012, 19(2): 173-178.

[13] 陆天天, 王宁, 高晓冬. 人源β-N- 乙酰葡糖胺转移酶 I(hGnT-I)的原核表达与活性鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(10): 56-62.