

水稻 N-糖酰胺酶基因 (*OsPNGase A*) 的克隆及在毕赤酵母中的分泌表达

王媛¹, 贾鹏¹, 李学俊¹, 李玉红², 陈鹏¹

1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100

王媛, 贾鹏, 李学俊, 等. 水稻 N-糖酰胺酶基因 (*OsPNGase A*) 的克隆及在毕赤酵母中的分泌表达. 生物工程学报, 2018, 34(3): 421-428.

Wang Y, Jia P, Li XJ, et al. Cloning of *Oryza sativa* N-glycanase gene (*OsPNGase A*) and its expression in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2018, 34(3): 421-428.

摘要: N-聚糖酶是一类广泛应用于糖蛋白的 N-糖基化修饰研究中的去糖基化酶。本研究通过 RT-PCR 从水稻中克隆了一个高 GC 含量 (69.48%) 的 N-聚糖酶基因 (*OsPNGase A*, XM_015775832), 通过无缝克隆技术构建酵母分泌型表达载体 pPICZ(α)A-*OsPNGase A*, 在毕赤酵母 SMD1168H 中进行诱导表达, 发酵液经 DEAE Sepharose 阴离子交换层析和 HisTrap HP 金属离子螯合层析纯化, 产量可达到 12.3 mg/L, 比活力为 258 U/mg。SDS-PAGE 结果显示, 纯化的 *OsPNGase A* 为单一条带且与预期分子量一致。*OsPNGase A* 能作用于水稻中重组表达的人转铁蛋白 (TRF)、玉米中重组表达的鸡蛋抗生物素蛋白 (Avidin) 以及辣根过氧化物酶 (HRP), 并且对 Avidin 的酶切效果优于商业化的 PNGase F。*OsPNGase A* 反应的最适 pH 和温度分别为 pH 6.0 和 40 °C, 在中性和碱性以及含有 100 mmol/L 还原剂 β -ME 和 DTT 的条件下仍具有活性。水稻 *OsPNGase A* 的成功表达为植物糖蛋白的研究提供一个新的工具酶, 酵母分泌表达体系的建立为 PNGase A 的大量制备奠定了基础。

关键词: PNGase A, 基因克隆, 分泌表达, 糖基化

Received: June 24, 2017; **Accepted:** September 11, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30400282, 31171606), Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2017NY-033).

Corresponding author: Peng Chen. Tel/Fax: +86-29-87091637; E-mail: pengchen@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30400282, 31171606), 陕西省重点研发计划 (No. 2017NY-033) 资助。

网络出版时间: 2017-09-14

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170914.0934.001.html>

Cloning of *Oryza sativa* N-glycanase gene (*OsPNGase A*) and its expression in *Pichia pastoris*

Yuan Wang¹, Peng Jia¹, Xuejun Li¹, Yuhong Li², and Peng Chen¹

¹ College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² Horticulture College, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: N-glycanase is a class of deglycosylation enzymes, widely used in the study of N-glycosylation modification of glycoprotein. In this study, an N-glycanase gene (*OsPNGase A*, XM_015775832) with high GC content (69.48%) was cloned from rice and then the yeast secretory expression vector pPICZ(α)A-*OsPNGase A* was constructed for the purpose of transformation to *Pichia pastoris*. After induction in *Pichia pastoris* SMD1168H, the target protein was purified by DEAE Sepharose and HisTrap HP chromatography, with a yield of 12.3 mg *OsPNGase A* from 1 L fermentation medium, showing a specific activity of 258 U/mg. SDS-PAGE revealed that the purified *OsPNGase A* was a single band and showed consistency with the expected molecular weight. *OsPNGase A* could act on transferrin recombinantly expressed in rice, avidin recombinantly expressed in corn and horseradish peroxidase. Furthermore, *OsPNGase A* showed higher activity than commercial PNGase F towards avidin. *OsPNGase A* displayed the highest digestion activity at pH 6.0 and 40 °C, and was also active in the neutral and alkaline environment. Despite the fact that *OsPNGase A* was inhibited by reducing agents and surfactants, it still maintained partial enzymatic activity in 100 mmol/L β -ME or DTT. Therefore, the successful expression of rice *OsPNGase A* provides a new tool for the study of plant glycoproteins and the establishment of yeast secretion expression system lays the foundation for the preparation of PNGase A.

Keywords: PNGase A, gene cloning, secretory expression, glycosylation

糖基化修饰是蛋白质翻译后最复杂的修饰之一，其对于维持蛋白质的稳定性和生物学功能至关重要^[1]。蛋白质的去糖基化主要通过化学法和酶法。由于酶法去糖基化具有操作简单，条件温和，能够提供糖链的残基组成、排列顺序和糖苷键的 α 或 β 构型信息等优点，是目前应用最为广泛的去糖基化方式^[2]。

N-糖酰胺酶 (Peptide-N⁴-(N-acetyl- β -D-glucosaminyl) asparagine amidase, PNGase; EC 3.5.1.52) 是分布最为广泛的糖基化修饰类型——N-聚糖结构和功能分析中的关键工具酶，其能够催化N-聚糖和Asn(天冬酰胺)残基之间的 β -天冬氨酰基葡萄糖胺键的水解，生成完整的糖链和蛋白质或肽。N-糖酰胺酶主要分为PNGase F和PNGase A。PNGase F首次发现于脑膜炎败血杆菌属 *Flavobacterium meningosepticum*，其主要水解高甘露糖型、复合型和杂合型的N-聚糖^[3]。在大肠杆菌中重组表达的PNGase F广泛应用于动物

来源的糖蛋白的去糖基化，但对于含有核心 α -1,3岩藻糖/木糖的糖蛋白或糖肽糖链水解效率极低^[4]。PNGase A首次发现于杏仁 *Prunus amygdalus* var. *Dulcis*，故此命名。研究发现植物体内PNGase A在释放N-聚糖以及调节N-聚糖修饰蛋白质的生物活性中具有重要的功能，也可能参与酸性细胞器(如液泡)中丧失生物学作用的糖蛋白的转运^[5-6]。PNGase A作用底物范围广，其不仅能够水解与PNGase F相同的底物，也能够水解含有核心 α -1,3岩藻糖/木糖的糖蛋白或糖肽N-聚糖^[7]，这是植物和无脊椎动物聚糖修饰的典型特征^[8-9]。因此，PNGase A更适用于植物和无脊椎动物中糖基化的研究用酶。

随着糖组学与蛋白质组学研究的深入，解析多糖结构与功能之间的关系日益受到关注和重视。研发新的去糖基化酶成为核心的技术需求。目前商业化的PNGase A主要来自杏仁^[10]。Takahashi首先发现杏仁中存在N-聚糖酶活性的糖苷酶^[11]，

Altmann F 对杏 PNGase A 分析显示其由 55 kDa 和 27 kDa 两个亚基组成的异源二聚体,且自身存在糖基化^[10,12]。异源二聚体的结构特征在一定程度上限制了其通过重组表达进行制备。Kimura 等从大豆 *Glycine max* 粉中纯化得到单一亚基的 PNGase A^[13]。从天然原料中纯化上述两种酶步骤繁琐,耗时费力,并且产率较低,每 100 g 杏仁仅可纯化获得 280 μg 酶蛋白。迄今为止,仅有番茄 *Lycopersicon esculentum* 的 PNGase A 基因克隆并进行重组表达的报道^[5]。

本研究从水稻中克隆 *OsPNGase A* 基因,利用无缝克隆的方式构建毕赤酵母表达载体,探索 *OsPNGase A* 在毕赤酵母 SMD1168H 中的分泌表达和纯化方法,并对重组酶的催化特性进行分析,以期为糖蛋白的去糖基化研究提供一个新的工具酶,同时为 *OsPNGase A* 的高效制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

水稻 (*Oryza sativa* Japonica Group) 总 RNA 由西北农林科技大学生命科学学院陈坤明教授惠赠。大肠杆菌菌株 TOP10、毕赤酵母 SMD1168H 和毕赤酵母表达载体 pPICZ(α)A 均为本实验室保存。

1.1.2 工具酶与主要试剂

2× iProof™ HF Master Mix 为 Bio-Rad 公司产品。pCloneEZ 克隆载体为 CloneSmart 公司产品。一步法克隆试剂 NEBuilder® HiFi DNA Assembly 为 NEB 公司产品。阴离子层析柱 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱和金属离子螯合层析柱 HisTrap HP 为 GE Healthcare 公司产品。Glycopeptidase F (PNGase F) 购自 TaKaRa 公司。水稻重组表达的转铁蛋白 (Transferrin, TRF)、辣根中纯化的辣根过氧化物酶 (Horse radish

peroxidase, HRP) 和玉米中重组表达的抗生物素蛋白 (Avidin) 均为 Sigma 公司产品。其他生物化学及分子生物学试剂均为国产或进口分析纯。引物合成及测序由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

1.2 方法

1.2.1 水稻 *OsPNGase A* 基因的克隆

以水稻总 RNA (2 μg) 为模板,20 μL 体系进行反转录得到 cDNA。根据 NCBI 数据库报道的序列 (登录号 XM_015775832) 设计引物 (OsP-F/OsP-R, 表 1), 从水稻 cDNA 中扩增 *OsPNGase A* 编码序列。PCR 反应体系 (25 μL): cDNA 1 μL、引物 OsP-F (10 μmol/L) 和 OsP-R (10 μmol/L) 各 1 μL、2× iProof mix 12.5 μL、ddH₂O 2.5 μL, 5× GC 增强剂 7 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 2 min ;95 °C 变性 10 s ,65 °C 退火 10 s ,72 °C 延伸 1 min ,10 个循环 ;95 °C 变性 10 s ,60 °C 退火 15 s ,72 °C 延伸 1 min ,32 个循环 ;72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后将目的条带割胶回收,连接至 pCloneEZ 克隆载体进行测序。

1.2.2 分泌表达载体的构建

设计带有同源臂的引物 (POsP-F/POsP-R, 表 1), 从测序正确的克隆载体 pCloneEZ-*OsPNGase A* 上扩增 *OsPNGase A* 成熟蛋白的编码区序列,参照 NEBuilder® HiFi DNA Assembly 试剂盒说明书构建酵母分泌表达载体 pPICZ(α)A-*OsPNGase A*。

1.2.3 毕赤酵母转化及转化子鉴定

以重组质粒 pPICZ(α)A-*OsPNGase A* 为模板,用线性化引物 piLinearSac-F 和 piLinearSac-R (表 1) 引物进行 PCR 扩增制备线性化重组载体,电转化毕赤酵母 SMD1168H,涂布于 YPD 固体培养基上,zeocin 筛选浓度为 100 μg/mL,28 °C 培养 2 d。AOX 引物 (表 1) 对转化子进行菌落 PCR 鉴定。

表 1 引物信息 (下划线标识同源臂序列)

Table 1 Primers information

Primer name	Primer sequence (5'-3')
OsP-F	ATGGCGGAGTCGTGCTACGTGCG
OsP-R	TCACGAGCTCAGCCGTGCCACT
POsP-F	<u>GAAAAGAGAGGCTGAAGCTTCACCTC</u> TCAAGCTTCGGCTATCTGCCT
POsP-R	<u>TCAATGATGATGATGATGATGCGAGCT</u> CAGCCGTGCCACT
piLinearSac-F	CGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGC
piLinearSac-R	AGCTCCAATCAAGCCCAATAACTG
5'AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC

The homologous arm sequences were underlined.

1.2.4 重组 OsPNGase A 的诱导表达及纯化

将单克隆接种于 YPD, 28 °C、220 r/m 培养至 $OD_{600}=2.0$ 时, 取 50 μ L 菌液, 3 000 r/min 收集菌体, 用 BMGY 培养基悬浮菌体, 转接于 5 mL BMGY, 28 °C、220 r/min 培养。当 OD_{600} 为 2.0 时, 以同样方式转接于 20 mL BMMY 中进行诱导。每隔 24 h 补加甲醇至终浓度为 1% (V/V), 诱导 96 h 后, 离心收集发酵液。

发酵液经截留分子量为 10 kDa 超滤管浓缩, 浓缩样品依次通过 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析和 HisTrap 金属离子螯合层析对 OsPNGase A 进行纯化。SDS-PAGE 电泳检测纯化产物的纯度, Bradford 法测定蛋白浓度^[14]。

1.2.5 不同反应温度、pH、还原剂、表面活性剂对酶活性的影响

分析不同反应时间温度 (0 °C、4 °C、25 °C、37 °C、50 °C、60 °C) 和 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 对水解活性的影响, 以确定 OsPNGase A 的最适反应条件。反应体系与条件为: 取 1 μ L Avidin (5 mg/mL) 溶于 15 μ L 不同 pH 的缓冲液中, 95 °C 加热变性 10 min 后迅速置于冰

上。然后加入 2 μ L 10% NP-40 和 0.1 μ g 酶液。不同温度保温 5 h。15% SDS-PAGE 检测酶切结果。参考上述体系, 在最适条件下分析 10、50、100 mmol/L 还原剂 DTT/ β -巯基乙醇以及 0.1%、0.5%、1% 的表面活性剂 Triton X-100 对酶活性的影响。

1.2.6 OsPNGase A 对不同糖蛋白底物的去糖基化

参照 1.2.5 反应体系, 分别以 TRF、HRP 和 Avidin 为底物检测 OsPNGase A 的去糖基化活性。12.5% SDS-PAGE 检测重组 OsPNGase A 对不同类型糖蛋白的去糖基化效果。酶活力单位定义为, 在上述反应条件下, 每分钟水解 1 μ g Avidin 糖蛋白所需要的酶量为 1 个活力单位 (U)。

1.2.7 重组 OsPNGase A 与 PNGase F 去糖基化作用的比较

参考 1.2.5 反应体系, 两组反应分别加入 1 mU 的 PNGase A 和商业化 PNGase F, 37 °C 反应 5 h, 15% SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 OsPNGase A 基因扩增与序列分析

以水稻 cDNA 为模板, 成功克隆得到 OsPNGase A 编码基因 (图 1)。其 ORF 大小为 1 851 bp, 编码 616 个氨基酸; 预测含有 25 个氨基酸的信号肽序列, 成熟蛋白的分子量为 63.8 kDa, 等电点为 4.97。

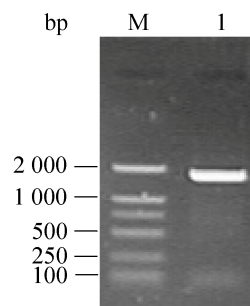


图 1 OsPNGase A 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of the *OsPNGase A* gene. M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product.

2.2 *OsPNGase A* 在毕赤酵母中的表达与纯化
pPICZ (α) A-*OsPNGase A* 转化的毕赤酵母 SMD1168H 经含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的 YPD 筛选后, 抗性菌落进一步通过 5' AOX 和 3' AOX 引物 PCR 鉴定 (图 2A)。阳性克隆用以分泌表达 *OsPNGase A*。SDS-PAGE 检测结果显示 (图 2B), 浓缩、透析后的发酵液经 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析 (图 2B, 泳道 5) 和 HisTrap 金属离子螯合层析 (图 2B, 泳道 6) 纯化获得单一条带的 *OsPNGase A*, 分子大小与预期一致。蛋白含量测定结果显示 *OsPNGase A* 的产量达到 12.3 mg/L。

2.3 不同反应 pH 和温度对酶活性的影响

在 pH 4–10 范围内分析 *OsPNGase A* 对 Avidin 的水解活性, 结果如图 3A 所示, *OsPNGase A* 在 pH 6.0–10.0 的酸碱范围内都保持一定的活性, 最适 pH 为 6.0 (图 3A, 泳道 3)。在 0–70 $^{\circ}\text{C}$ 范围内

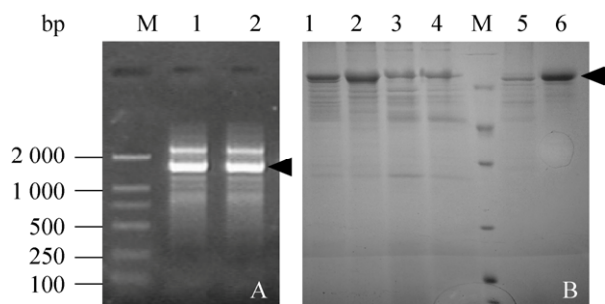


图 2 *OsPNGase A* 转基因酵母的 PCR 检测 (A) 和 *OsPNGase A* 重组蛋白的分泌表达及纯化 (B)

Fig. 2 PCR screening of *P. pastoris* clones with *OsPNGase A* integrated and purification of recombinant *OsPNGase A*. (A) PCR detection of Zeocin-resistant *P. pastoris*. Lane 1 and 2: PCR products of two separate Zeocin-resistant *P. pastoris* clones. M: DL2000 DNA molecular weight marker. (B) Secretory expression and purification of recombinant *OsPNGase A*. Lane 1 and 2: medium of *P. pastoris* after induction with methanol; lane 3 and 4: medium of *P. pastoris* before induction; lane 5 and 6: purified product of *OsPNGase A* with DEAE-Sepharose and HisTrap immobilized nickel chromatography, respectively. The black arrows indicate the target gene and protein band, respectively.

测定温度对 *OsPNGase A* 活性的影响, 如图 3B 所示, 在 0–50 $^{\circ}\text{C}$ 范围内 *OsPNGase A* 均具有水解活性, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活最高。

2.4 *OsPNGase A* 对不同底物的去糖基化

不同底物的去糖基化结果表明, *OsPNGase A* 对 TRF (图 4A)、HRP (图 4B) 以及 Avidin (图 4C) 都具有去糖基化的能力, 表明 *OsPNGase A* 在植物来源的糖蛋白的研究中具有潜在应用价值。在相同的反应条件下, 3 种底物相比, *OsPNGase A* 对 Avidin 的去糖基化效率最高。选择 Avidin 作为底物进行酶活力的确定, 其比活力为 258 U/mg。

2.5 不同还原剂、表面活性剂对 *OsPNGase A* 活性的影响

OsPNGase A 的活性受到表面活性剂 Triton X-100 的抑制, 随浓度的增加而抑制增强, 在终浓度 1% 的 Triton X-100 下其活力基本丧失 (图 5A)。图 5B 显示, 在 10–100 mmol/L 还原剂 DTT 和 β -巯基乙醇的浓度范围内, *OsPNGase A* 都具有活性。

2.6 *OsPNGase A* 与商业化 PNGase F 的比较

以本研究重组表达的 *OsPNGase A* 和商业化的 PNGase F 对 Avidin 进行酶切, 结果显示 *OsPNGase A* 对底物的去糖基化效果明显 (图 6, 泳道 3)。在相同的反应条件下, PNGase F 酶切后的 Avidin 分子量并未改变 (图 6, 泳道 1)。结果表明 *OsPNGase A* 更适用于该糖蛋白的去糖基化。

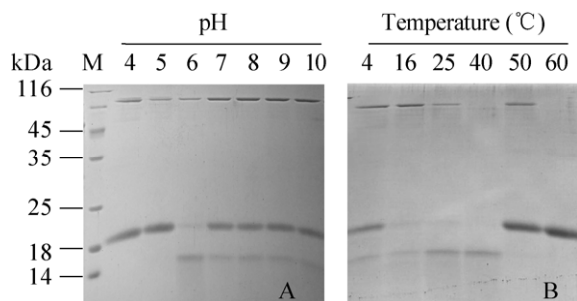


图 3 pH (A) 和温度 (B) 对 *OsPNGase A* 酶活性的影响

Fig. 3 Effects of pH (A) and temperature (B) on *OsPNGase A* activity.

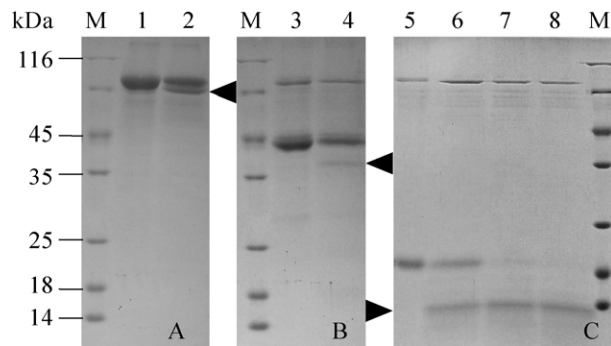


图4 12.5% SDS-PAGE 检测 OsPNGase A 对不同糖蛋白底物的去糖基化

Fig. 4 12.5% SDS-PAGE analyzed the deglycosylation of different glycoproteins with OsPNGase A. (A) Recombinant human transferrin from rice was incubated for 5 h at 37 °C with heat-inactivated OsPNGase A (lane 1) or active OsPNGase A (lane 2), respectively. (B) HRP from horseradish was incubated for 5 h at 37 °C with heat-inactivated OsPNGase A (lane 3) or active OsPNGase A (lane 4), respectively. (C) Recombinant egg white Avidin from corn was incubated at 37 °C with heat-inactivated OsPNGase A for 5 h (lane 5) or with active OsPNGase A for 3 h (lane 6), 4 h (lane 7), or 5 h (lane 8), respectively. After enzymatic digestion, samples were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. The black arrows indicate the deglycosylated protein products.

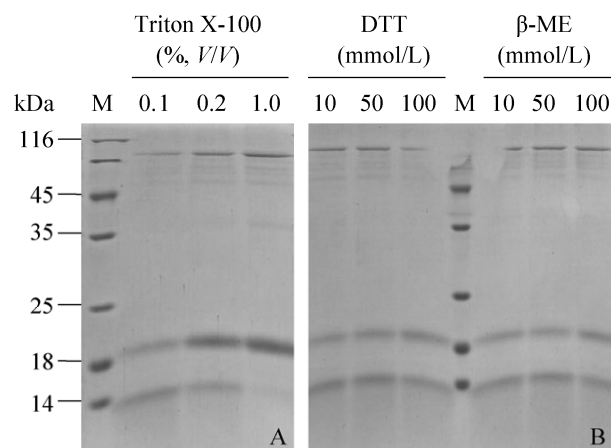


图5 Triton X-100 (A), DTT 和 β -巯基乙醇 (B) 对 OsPNGase A 活性的影响

Fig. 5 Effects of Triton X-100 (A, lane 1-3), DTT (B, lane 4-6) and β -mercaptoethanol (B, lane 7-9) on OsPNGase A activity.

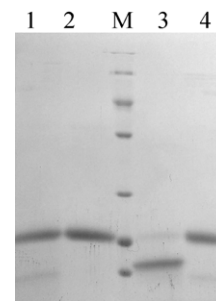


图6 15% SDS-PAGE 检测 OsPNGase A 和商业化的 PNGase F 对 Avidin 的去糖基化

Fig. 6 15% SDS-PAGE analyzed the deglycosylation of Avidin with OsPNGase A and PNGase F. Avidin was incubated for 5 h at 37 °C with the PNGase F (lane 1), heat-inactivated PNGase F (lane 2), OsPNGase A (lane 3) and heat-inactivated OsPNGase A (lane 4), respectively. After enzymatic digestion, samples were analyzed by 15% SDS-PAGE.

3 讨论

N-糖基化是真核生物蛋白质最重要的翻译后修饰之一，对于蛋白的结构、酶学活性以及稳定性具有重要意义^[15]。目前在蛋白质 N-糖基化修饰类型的研究中，使用广泛的工具酶为 PNGase F 和 PNGase A^[7]。对于 PNGase F 基因的克隆及重组表达研究较多，并已有蛋白结构信息的报道^[16]；对于 PNGase A，目前主要从杏仁中提取获得。本研究根据 NCBI 数据库中预测的水稻 *OsPNGase A* 序列 (XM_015775832)，对其进行了基因克隆。由于 *OsPNGase A* 序列具有较高的 GC 含量 (69.48%)，进行了多次反转录及扩增，电泳检测均未得到预期大小的产物。因此在反转录及 PCR 体系中添加 GC 增强剂以提高解链效率，最终实现了 *OsPNGase A* 基因的克隆。使用 NEB 的一步法克隆试剂盒构建重组表达载体 pPICZ (α)A-*OsPNGase A*，克服了传统的酶切连接方法构建载体时基因内部酶切位点的限制以及连接时间长、连接效率低等缺点。此外，根据 pPICZ (α)A 载体上 *Sac I* 限制性酶切位点两侧的载体序列设计引

物,使用 Bio-Rad 高保真的 iProof DNA 聚合酶进行重组载体的扩增来实现线性化,避免了重组质粒大量制备过程中昂贵的 Zeocin 抗生素的使用以及质粒酶切、回收等繁琐的操作。从方法学上,本研究的体系对于真核生物高 GC 含量基因的克隆以及毕赤酵母高通量表达体系的构建有重要的参考价值。

对于商业化的 PNGase A,主要从杏仁中提取获得,产率低下,目前尚未有重组表达杏仁 PNGase A 的报道。异源二聚体的结构特征可能是限制其通过重组表达进行制备的原因。虽已有番茄来源的 LePNGase A 在毕赤酵母中实现了重组表达,但表达水平极低,电泳检测仪显示微弱的条带。毕赤酵母中重组表达的 LePNGase A 最适 pH 为 4.5,在中性及碱性 pH 条件下活力完全丧失^[5]。本研究实现了 *OsPNGase A* 在毕赤酵母中的高效分泌表达,1 L 发酵液中可纯化获得 12.3 mg 目的蛋白。对 *OsPNGase A* 催化特性分析显示其在较为宽泛的 pH 条件下均具有活性,这为 *OsPNGase A* 的实践应用奠定了良好的酶学性质基础。*OsPNGase A* 的最适反应温度为 40 °C,与杏来源的 PNGase A 基本相同^[10]。在 4 °C 时 *OsPNGase A* 仍然具有一定的活性,暗示其可用于在常温下不稳定的糖蛋白底物的去糖基化。在蛋白提取制备及长期保存过程中,常会用到一些还原剂,如还原剂 DTT 和 β -ME 以保护“-SH”基团,防止蛋白氧化^[17-18],表面活性剂 Triton X-100 增加蛋白的稳定性和溶解度^[19]。迄今为止,尚未见这些试剂对 PNGase A 活性影响的分析报道。本研究较为系统地分析了不同浓度的还原剂和 Triton X-100 对 *OsPNGase A* 活性的影响,如图 5 所示,一定浓度范围内的上述 3 种蛋白稳定化试剂可用于 *OsPNGase A* 的去糖基化反应。

毕赤酵母重组表达的番茄 LePNGase A 仅来自人的转铁蛋白为底物,检测该酶的去糖基化

能力,并没有以植物来源的糖蛋白为底物进行去糖基化反应。本研究中 *OsPNGase A* 对于 3 种植物来源的糖蛋白都具有去糖基化的能力,但去糖基化后的蛋白在 SDS-PAGE 后着色较浅。可能是由于底物蛋白 N-聚糖修饰的异质性,使得去糖基化后的蛋白产物不均一,进而影响主产物考马斯亮蓝 R250 的染色强度^[20]。Yang 等和 Gray 等用杏仁中纯化的 PNGase A 对 HRP 进行酶切,对释放出的聚糖进行 MALDI-TOF/MS 研究,结果表明,HRP 中存在“(Xyl) Man₃ (Fuc) GlcNAc₂”、“(Xyl) Man₂ (Fuc) GlcNAc₂”、“Man₃ (Fuc) GlcNAc₂”的 N-糖基化修饰^[21-22]。本研究表明 *OsPNGase A* 能够作用含有核心[α -Fuc-(1 \rightarrow 3)] (α -1 \rightarrow 3 岩藻糖)的 N-聚糖。但相比于 Avidin, *OsPNGase A* 对于分子量较大的 HRP 和 TRF 底物的去糖基化效果欠佳,可能是由于这两种底物分子量较大而产生的空间位阻所导致^[23]。

已有研究表明, PNGase F 不能用于含有核心 α -1.3 岩藻糖的 N-聚糖的去除,且该糖基化修饰类型的糖蛋白多来自植物^[9]。本研究与商业化的 PNGase F 比较结果显示, *OsPNGase A* 更适用于植物来源的 Avidin 去糖基化,说明 *OsPNGase A* 在植物糖蛋白的研究中具有应用潜能。水稻 *OsPNGase A* 的成功表达为植物糖蛋白的研究提供一个新的工具酶,酵母分泌表达体系的建立为 PNGase A 的大量制备奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002, 12(4): 43R-56R.
- [2] Guo H, Deng WX, Zhang Y. Research progression of glycoprotein. *Biotechnol Bull*, 2009, (3): 16-19 (in Chinese).
郭慧, 邓文星, 张映. 糖蛋白的研究进展. *生物技术通报*, 2009, (3): 16-19.

- [3] Barsomian GD, Johnson TL, Borowski M, et al. Cloning and expression of peptide- N^4 -(N -acetyl- β -D-glucosaminy) asparagine amidase F in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1990, 265(12): 6967–6972.
- [4] Tretter V, Altmann F, März L. Peptide- N^4 -(N -acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached $\alpha 1 \rightarrow 3$ to the asparagine-linked N -acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem*, 1991, 199(3): 647–652.
- [5] Hossain MA, Nakano R, Nakamura K, et al. Molecular identification and characterization of an acidic peptide: N -glycanase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *J Biochem*, 2010, 147(2): 157–165.
- [6] Berger S, Menudier A, Julien R, et al. Do de- N -glycosylation enzymes have an important role in plant cells? *Biochimie*, 1995, 77(9): 751–760.
- [7] Ishimizu T. Plant N -glycans and their degrading enzymes// Taniguchi N, Endo T, Hart GW, et al, Eds. *Glycoscience: Biology and Medicine*. Japan: Springer, 2015: 1111–1117.
- [8] Staudacher E, Altmann F, Wilson IBH, et al. Fucose in N -glycans: from plant to man. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473(1): 216–236.
- [9] Wilson IBH, Zeleny R, Kolarich D, et al. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core $\alpha 1$, 3-linked fucose and xylose substitutions. *Glycobiology*, 2001, 11(4): 261–274.
- [10] Altmann F, Paschinger K, Dalik T, et al. Characterisation of peptide- N^4 -(N -acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase A and its N -glycans. *Eur J Biochem*, 1998, 252(1): 118–123.
- [11] Takahashi N. Demonstration of a new amidase acting on glycopeptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, 76(4): 1194–1201.
- [12] Taga EM, Waheed A, van Etten RL. Structural and chemical characterization of a homogeneous peptide N -glycosidase from almond. *Biochemistry*, 1984, 23(5): 815–822.
- [13] Kimura Y, Ohno A. A new peptide- N^4 -(acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase from soybean (*Glycine max*) seeds: purification and substrate specificity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(2): 412–418.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [15] Imperiali B, O'Connor SE. Effect of N -linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3(6): 643–649.
- [16] Norris GE, Stillman TJ, Anderson BF, et al. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure*, 1994, 2(11): 1049–1059.
- [17] Cleland WW. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 1964, 3(4): 480–482.
- [18] Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem*, 2014, 47(18): 326–332.
- [19] Chae PS, Wander MJ, Cho KH, et al. Carbohydrate-containing Triton X-100 analogues for membrane protein solubilization and stabilization. *Mol Biosyst*, 2013, 9(4): 626–629.
- [20] Hanisch FG, Jovanovic M, Peter-Katalinic J. Glycoprotein identification and localization of O-glycosylation sites by mass spectrometric analysis of deglycosylated/alkylaminylated peptide fragments. *Anal Biochem*, 2001, 290(1): 47–59.
- [21] Yang BY, Gray JSS, Montgomery R. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydr Res*, 1996, 287(2): 203–212.
- [22] Gray JSS, Yang BY, Montgomery R. Heterogeneity of glycans at each N -glycosylation site of horseradish peroxidase. *Carbohydr Res*, 1998, 311(1/2): 61–69.
- [23] Bager R, Johansen JS, Jensen JK, et al. Protein conformational change delayed by steric hindrance from an N -linked glycan. *J Mol Biol*, 2013, 425(16): 2867–2877.

(本文责编 郝丽芳)