

• 工业生物技术 •

苜蓿链霉菌内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的克隆、表达及酶学性质

李玲聪^{1*}, 胡少锋^{1*}, 谷天燕¹, 吕晨茵¹, 刘妍池¹, 刘华¹, 顾金刚², 赵国刚¹

1 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071000

2 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

李玲聪, 胡少锋, 谷天燕, 等. 苜蓿链霉菌内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的克隆、表达及酶学性质. 生物工程学报, 2020, 36(5): 932-941.

Li LC, Hu SF, Gu TY, et al. Cloning, expression and characterization of a new endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces alfalfae*. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 932-941.

摘要: 内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶广泛应用于糖生物学研究和工业生产。本研究从苜蓿链霉菌 *Streptomyces alfalfae* ACCC 40021 中克隆并原核表达了一个新的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 该酶最适反应温度为 35 °C, 最适 pH 为 6.0, 具有良好的 pH 稳定性、温度稳定性和高比活 (1×10^6 U/mg) 的特性, 可催化不同蛋白底物去糖基化, 具有作为工具酶和生物催化剂的潜力。

关键词: 内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 去糖基化, 苜蓿链霉菌

Cloning, expression and characterization of a new endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces alfalfae*

Lingcong Li^{1*}, Shaofeng Hu^{1*}, Tianyan Gu¹, Chenyin Lü¹, Yanchi Liu¹, Hua Liu¹, Jingang Gu², and Guogang Zhao¹

1 College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

2 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Endo- β -N-acetylglucosaminidase is used widely in the glycobiology studies and industries. In this study, a new endo- β -N-acetylglucosaminidase, designated as Endo SA, was cloned from *Streptomyces alfalfae* ACCC 40021 and expressed

Received: October 22, 2019; **Accepted:** March 17, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (Nos. 2017YFD0201100, 2017YFD0200604), the Science Project Grant for Oversea Personnel in Hebei Province (No. CP2015005015), the Open Project Program of Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture of China and the Start Funding of Hebei Agricultural University (No. ZD201605).

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: Guogang Zhao. Tel: +86-312-7528250; E-mail: zhgg@hebau.edu.cn

国家重点研发计划 (Nos. 2017YFD0201100, 2017YFD0200604), 河北省留学人员科技项目 (优秀类) (No. CP2015005015), 农业部饲料生物技术重点实验室开放课题和河北农业大学启动资金 (No. ZD201605) 资助。

网络出版时间: 2020-04-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200409.1048.001.html>

in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The purified recombinant Endo SA exhibited the maximum activity at 35 °C and pH 6.0, good thermo/pH stability and high specific activity (1.0×10^6 U/mg). It displayed deglycosylation activity towards different protein substrates. These good properties make EndoSA a potential tool enzyme and industrial biocatalyst.

Keywords: endo- β -N-acetylglucosaminidase, deglycosylation, *Streptomyces alfalfae*

糖基化修饰是蛋白质翻译后的主要修饰方式之一,在蛋白质折叠形成正确的空间构象和发挥正常的生物功能中有着十分重要的作用^[1]。根据糖基化位点的不同,糖基化修饰方式主要可以分为 N-糖基化、O-糖基化和 C-糖基化。N-糖基化是糖链与多肽链的天冬酰胺的自由氨基连接。O-连接的糖基化是糖链与多肽链上丝氨酸、苏氨酸等氨基酸的自由羟基共价连接。C-糖基化主要是糖链通过碳碳双键与多肽链上的色氨酸连接。在血浆等体液中的蛋白质大多发生 N-糖基化,因此在以上几种糖基化修饰方式中,以 N-糖基化的修饰方式最为普遍^[2]。

在糖基化位点研究中常用的工具酶主要分为外切糖苷酶和内切糖苷酶两大类,外切糖苷酶沿着糖链末端进行切割,这种切割方式有助于分析寡糖链的连接顺序和糖基组成^[3]。内切糖苷酶主要是水解糖链内部的寡糖链,从而释放完整的糖链^[4]。内切糖苷酶提供了从糖肽去除完整的寡糖链的方法,长的寡糖链断裂成短的糖链,有利于对糖链的结构分析^[5],因此内切糖苷酶在糖生物学中有着更为广泛的应用。而在不同种类的内切糖苷酶中,内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo- β -N-acetylglucosaminidase, ENGase) 在研究中的应用更加普遍,其主要作用于糖链上两个相邻的 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4 糖苷键^[6]。ENGase 酶处理糖蛋白后,在蛋白的糖基化位点上留下一个 N-乙酰氨基葡萄糖胺,可以作为糖基化位点鉴定的一个标签。通过这个标签可以提高糖基化位点鉴定的正确性^[7],而且经过 ENGase 酶处理后的糖蛋白仍具有生物学活性,可用于后续功能的研究^[8]。同时,部分 ENGase 酶还具有转糖基作用。

ENGase 在糖生物学研究和工业生产中具有重要应用价值。例如 1998 年, Yamamoto 等在转

糖活力的研究中运用 Endo M 酶在多肽 T 上连接上了唾液酸化的复合型糖链,提高了多肽 T 的稳定性^[9]。2001 年 Haneda 等利用 Endo M 酶以神经肽为底物,在其特定位置转移了唾液酸糖链,改善了神经肽的稳定性^[10]。利妥昔单抗常用于白血病和淋巴瘤的治疗过程, Huang 等首先利用 Endo S 的去糖基化作用将单抗上含有岩藻糖的非均一糖链切除,然后应用 Endo D 的突变体 N322Q 在糖基化位点连接上三甘露糖结构赋予了利妥昔单抗新的功能^[11]。而最近几年 ENGase 更由于其去糖基化作用被用于食品工业中,人乳中含有大量的寡糖,目前已被证明能够有效地促进肠道中有益菌落的生长^[12]。Garrido 等利用从婴幼儿肠道中的双歧杆菌获取的内切糖苷酶 Endo BI 从人体中的乳铁蛋白和免疫球蛋白中获得寡糖链^[13],该发现可用于处理奶制品加工过程中的副产物乳清,对于提高乳制品行业的经济效益有重要的研究意义^[14]。

目前已从多种微生物中分离到内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。1974 年首次在褶皱链霉菌中分离纯化出 Endo H^[15], 1985 年 Robert 等从褶皱链霉菌中克隆并在大肠杆菌中表达了 Endo H 酶^[16],以及脓链球菌来源的 Endo S^[17]、里氏木霉菌来源的 Endo T^[18]、金针菇在生长过程中分泌的 Endo FV^[19]、肺炎链球菌来源的 Endo D^[20]和冻土毛霉菌来源的 Endo M^[21]等越来越多的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶家族新成员被发现,但是商品化的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶种类非常有限,只由 NEB 等几家大型生物公司提供,但价格昂贵,并不利于大规模的应用。本文主要从苜蓿链霉菌中获取了一种新的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的基因,成功在大肠杆菌中实现高效表达,并进行了酶学性质的研究。本研究结果显示该酶

有应用于生产的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

中国农业微生物菌种保藏中心提供苜蓿链霉菌 *Streptomyces alfaiae* ACCC 40021。大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 和 Trans1-T1 菌株购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂

Pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自北京全式金生物技术有限公司。RNase B、Endo H 均购自 NEB (英国)。异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、硫酸卡那霉素、其他分析纯化学试剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 序列分析

利用 NCBI CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析蛋白结构域, SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测并利用在线软件 ClustalW (<https://clustal.org>) 进行多重序列信息比对。

1.3 重组质粒 pET-30a(+)-Endo SA 的构建

从 NCBI 中获取目的蛋白 Endo SA 的核苷酸序列 (Locus_tag: A7J05_03925) 和氨基酸序列信息 (RfSeq: WP_019545283.1), 用 SignalP 5.0 对其信号肽进行分析, 得到成熟蛋白的序列信息, 并设计引物: Endo SA-F (*Bam* H I) 5'-CCGGATCCATGAGCATGAAGAGGCGCA-3' 和 Endo SA-R (*Hind* III) 5'-TTAGAAGCTTTCAGCGGCGTACCGC-3', 引物中下划线为酶切位点。

以苜蓿链霉菌 ACCC 40021 基因组 (GenBank 登录号: NZ_CP015588.1) 为模板, 分别以 Endo SA-F 和 Endo SA-R 为上下游引物扩增目的基因片段。PCR 反应体系为: 0.5 μ L 链霉菌 ACCC 40021 基因组 DNA, 0.5 μ L TransStart Fast*Pfu* Fly DNA Polymerase, 2 μ L 2.5 mmol/L

dNTPs, 0.5 μ L 10 μ mol 上游引物 F 和下游引物 R, 5 μ L 5 \times TransStart Fast*Pfu* Fly Buffer, 加 ddH₂O 补足至总体积 25 μ L。PCR 扩增的程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。核酸琼脂糖电泳检测并胶内回收目的片段, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind*III 分别处理目的片段和载体 pET-30a(+), T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 并热击转化到大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 酶切筛选阳性克隆, 并送华大基因测序验证, 得到重组质粒 pET-30a(+)-Endo SA。

1.4 目的蛋白诱导表达与纯化

将 pET-30a(+)-Endo SA 热击转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 并涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆, 接种在 2 mL (含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素) LB 液体培养基的 EP 管中, 在 37 $^{\circ}$ C、转速为 220 r/min 的条件下培养过夜。以 1% (V/V) 的过夜培养物接种于 200 mL LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素) 的摇瓶中, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 h, 当 $OD_{600}=0.6$ 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 在 20 $^{\circ}$ C、转速为 220 r/min 的条件下诱导培养 20 h。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 离心收集菌体, 加入 10 mL 裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 重悬, 超声破碎。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清粗酶液, 粗酶液用 Ni-NTA 纯化, 其纯化步骤如下所示: 将粗酶液加到含有 Ni 柱填料的纯化管中, 用洗涤缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 去除杂蛋白, 再用 250 mmol/L 洗脱缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗脱目的蛋白。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测目的蛋白的纯度。

1.5 Endo SA 的活力测定

在 EP 管中加入 2 μ L 的 RNase B、1 μ L 的糖蛋白变性缓冲液 (内含 0.5% SDS, 40 mmol/L DTT) 和 4 μ L 的去离子水。将离心管置于金属浴中, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 然后加入 1 μ L 磷酸盐反应缓冲液 (pH 6.0) 和 1 μ L 10% 的 NP-40。最后加入 1 μ L 的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 总反应体系共 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。取 3 μ L 的反应产物制样, 进行 SDS-PAGE (15%) 分析。酶活定义: 1 单位指 10 μ L 的反应体系中, 37 $^{\circ}$ C 条件下, 在 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液中, 每 1 h 从 10 μ g 变性 RNase B 中除去超过 95% 的碳水化合物所需要的酶量。

1.6 LC-MS/MS 质谱分析

将 Endo SA 处理 2 h 的 RNase B 用 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE, 切取去糖基化的 RNase B 的凝胶条带, 送至中国科学院微生物研究所质谱平台鉴定。样品经胶内酶解处理, 冷冻干燥后酶解肽段复溶于 0.1% (V/V) 甲酸进行 LC-MS/MS 质谱分析 (Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific)。肽段经预柱 (C18, 粒径 5 μ m, 柱直径 100 μ m, 柱长 3 cm, Dr. Maisch GmbH) 除盐后经分析柱分离 (分析柱 C18, 粒径 3 μ m, 柱直径 75 μ m, 柱长 15 cm, Dr. Maisch GmbH), 流速 400 nL/min。LC 梯度分析条件: A 相: 0.1% (V/V) 甲酸, B 相 (乙腈, 0.1% (V/V) 甲酸)。3%–8% B 相 5 min, 8%–20% B 相 40 min, 20%–35% B 相 10 min, 35%–80% B 相 3 min, 80% B 相 2 min。所用质量分析器为 Orbitrap 和离子阱 (IT), 碎裂方式 HCD, 碰撞能 33。MS1 扫描范围 (m/z 350–1 550) 分辨率 120 000; MS2 分辨率 30 000。

1.7 内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的酶学性质测定

测定不同温度 (25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C) 和不同 pH (50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 4–5;

50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6–8; 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠溶液, pH 9) 对 Endo SA 酶学活性的影响, 以确定其最适温度和最适 pH。

预先在不同温度 (25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C) 和不同 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 的缓冲液预保温 1 h, 然后测定酶活, 以未处理的重组酶在最适条件下测定酶活为 100%, 确定 Endo SA 的热稳定性和 pH 稳定性。

1.8 内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶对不同蛋白底物去糖基化分析

分别取酵母中表达的糖化酶、果胶酶和酸性蛋白酶作为反应底物, 在 10 μ L 的反应体系中, 加入 2 μ L 的底物、1 μ L 的糖蛋白变性缓冲液 (内含 0.5% SDS, 40 mmol/L DTT) 和 5 μ L 的去离子水于 1.5 mL 的 EP 管中。将离心管置于金属浴中, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。再加入 1 μ L 的 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液和 1 μ L 10% 的 NP-40。在管中加入 1 μ L 的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 并加入等量缓冲液作为空白对照。在 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中, 水浴加热 30 min。将反应产物进行 SDS-PAGE (15%) 分析。

2 结果与分析

2.1 Endo SA 序列分析和氨基酸序列同源性比对

来源于 *Streptomyces alfae* ACCC 40021 的 Endo SA 基因全长 942 个碱基, 共编码 313 个氨基酸。NCBI CD-search 分析表明 Endo SA 属于糖苷水解酶第 18 家族 (GH18), 只存在一个 GH18 催化结构域。SignalP 5.0 显示其有长为 32 个氨基酸的信号肽。成熟蛋白质的等电点为 5.74, 理论分子量约为 30.20 kDa。序列比对分析如图 1 所示, Endo SA 与里氏木霉来源的 Endo T (GenBank 登录号: CAZ16624.1)、金针菇来源的 Endo FV (GenBank 登录号: ACY01407.1)、褶皱链霉菌来

源的 Endo H (GenBank 登录号: AAA26738.1)、黄色脑膜炎黄杆菌来源的 Endo F1 (GenBank 登录号: KWR53347.1) 和化脓性链球菌来源的 Endo S

(GenBank ANC26024.1) 同源性分别为 38.21%、38.19%、20.83%、9.88% 和 6.26%。以上结果表明 Endo SA 为一种新的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。

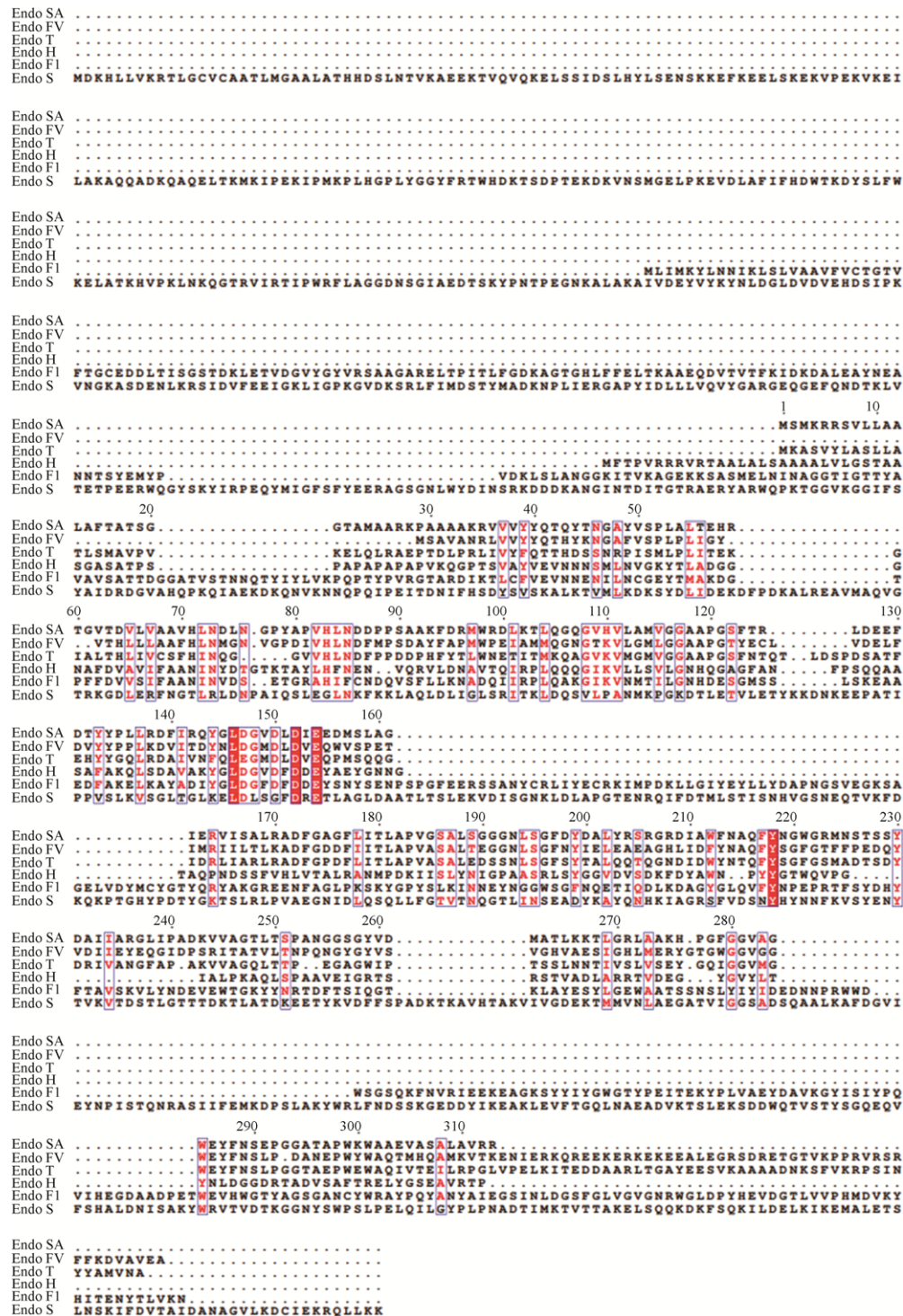


图 1 GH18 家族的 ENGase 酶的氨基酸序列比对
Fig. 1 Amino acid sequence alignment of GH18 ENGases.

2.2 苜蓿链霉菌 Endo SA 基因的克隆和表达

以苜蓿链霉菌基因组为模板, PCR 扩增出目的基因, 结果如图 2 所示, 目的基因大小为 863 bp, 与预期大小一致。并成功构建了 pET30a(+)-Endo SA 表达载体。

2.3 苜蓿链霉菌 EndoSA 的表达与纯化

将构建重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞中, 20 °C 诱导表达, Ni^{2+} 柱纯化, 结果如图 3 所示, 诱导菌株产生分子量为 34.24 kDa 的蛋白条带, 与带 N 端 His 标签的 Endo SA 分子量一致, 表明 Endo SA 成功可溶性表达。

2.4 质谱分析

对通过 Orbitrap Fusion Tribrid 检测得到的响应较高质谱峰进行 Mascot 谱库检索分析, 确认 $^{34}\text{N}^*\text{LTKDR}_{39}$ 肽段的 m/z 值为 948.487 6 (图 4)。此肽段理论相对分子质量为 745.82。该结果表明: 经 Endo SA 处理后, RNase B 唯一的糖基化位点第 34 位氨基酸天门冬酰胺上存在 1 个 N-乙酰葡萄糖胺。Endo SA 是内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。

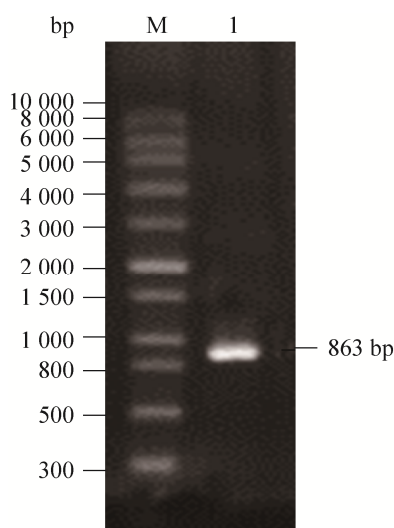


图 2 Endo SA 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplified product of Endo SA gene. Lane M: 1 kb plus DNA ladder; lane 1: the target gene fragment of Endo SA.

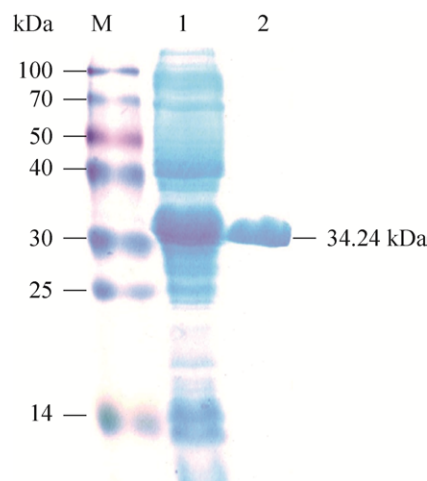


图 3 目的蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of target protein. Lane M: protein marker; lane 1: the crude supernatant; lane 2: the purified enzyme.

2.5 Endo SA 的去糖基化活力分析

Endo SA 对 RNase B 的去糖基化活力经 SDS-PAGE 分析, 如图 5 所示, 在 1 h 内 0.01 μg Endo SA 可以将 10 μg 变性的 RNase B (17 kDa) 完全去糖基化。以 RNase B 为底物, Endo SA 的比活力为 1.0×10^6 U/mg, 显著高于商品化的 Endo H (1.0×10^5 U/mg)。

2.6 不同温度和 pH 对 Endo SA 活性的影响

在不同温度下, 以 RNase B 为底物, 测定 Endo SA 活性, 如图 6 所示, 该酶在 25–45 °C 的范围内活力较高, 当温度为 35 °C 时, 酶活力达到最高。酶活力随着温度上升而逐步下降。温度高于 45 °C, 酶活性迅速下降。该酶的最适反应温度为 35 °C。在不同 pH 条件下测定 Endo SA 活性, 如图 7 所示, 该酶在 pH 4–9 的范围内均保持较高的活力, 在 pH 6 的磷酸盐缓冲液中, 该酶的活力最高。据此, 该酶的最适 pH 为 6。

2.7 Endo SA 稳定性分析

以 RNase B 为反应底物, Endo SA 的热稳定性结果如图 8 所示, 该酶在 30–45 °C 的范围内保

温 1 h, 保持 100% 活性; 当温度逐渐上升到 50 °C 以上, 酶活快速丧失。结果表明该酶在 25–45 °C 这个温度范围内有良好的热稳定性。Endo SA 的

pH 稳定性结果如图 9 所示, 该内切酶在 pH 为 4.0–8.0 的条件下保温 1h, 活力均大于 90%, 具有很好的 pH 稳定性。

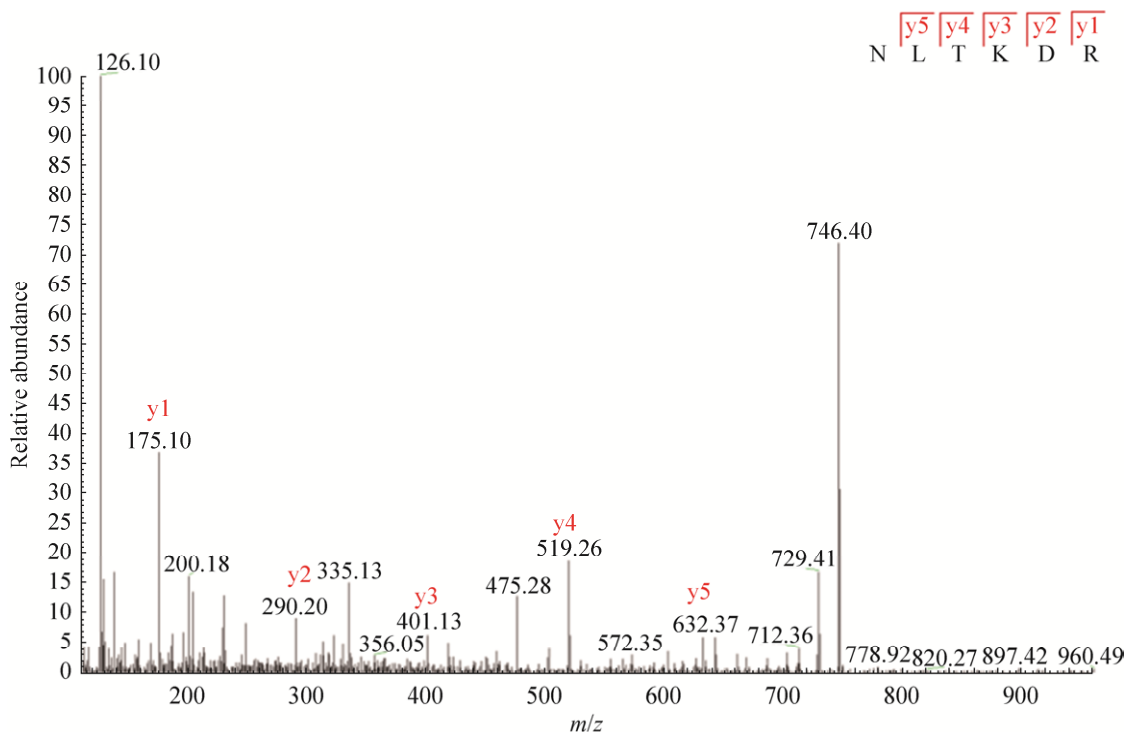


图 4 Endo SA 处理的 RNase B 的质谱分析

Fig. 4 MS/MS spectra analysis of RNase B treated by Endo SA.

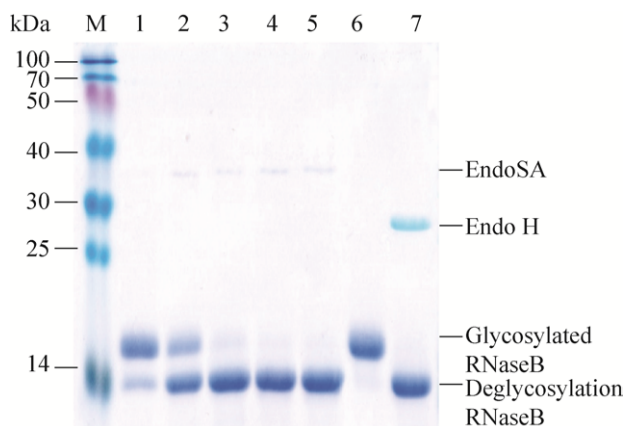


图 5 Endo SA 去糖基化结果分析

Fig. 5 Deglycosylation results of Endo SA. Lane M: protein marker; lane 1: add 0.001 μg enzyme; lane 2: add 0.005 μg enzyme; lane 3: add 0.01 μg enzyme; lane 4: add 0.015 μg enzyme; lane 5: add 0.02 μg enzyme; lane 6: negative control; lane 7: RNase B digested by 1.5 μg Endo H.

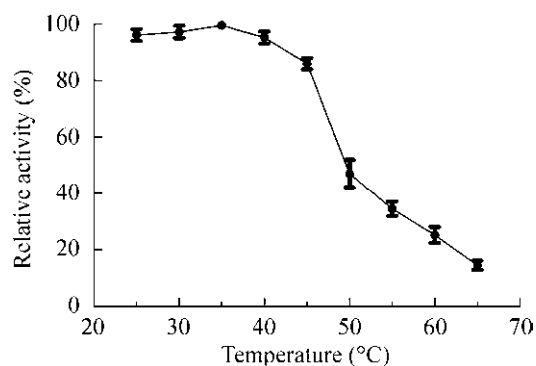


图 6 温度对 Endo SA 酶活影响

Fig. 6 Effect of temperatures on the activity of Endo SA.

2.8 Endo SA 对不同糖基化蛋白底物活力分析

本实验选择酵母中表达的糖化酶(理论分子量 65.8 kDa)、果胶酶(理论分子量 35.4 kDa)和酸

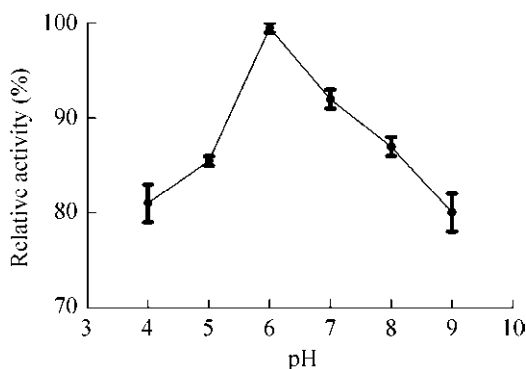


图 7 pH 对 Endo SA 酶活影响

Fig. 7 Effect of pH on the activity of Endo SA.

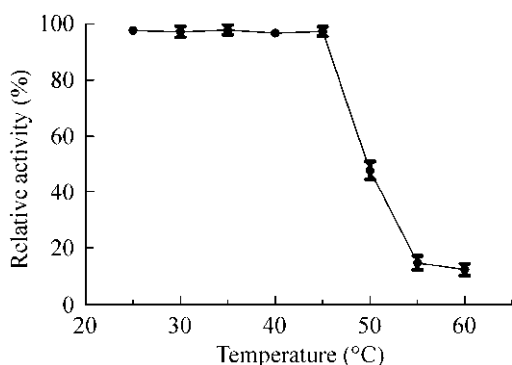


图 8 Endo SA 热稳定性分析

Fig. 8 Thermo-stability profile of Endo SA.

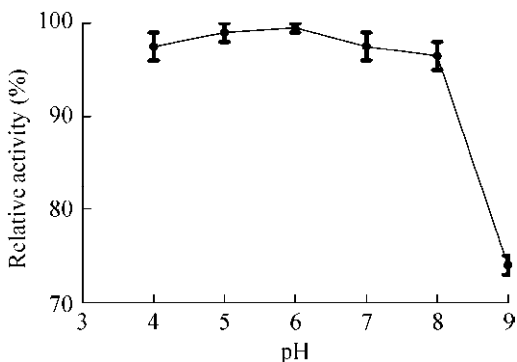


图 9 Endo SA pH 稳定性分析

Fig. 9 pH stability profile of Endo SA.

性蛋白酶(理论分子量 40.3 kDa)为底物,根据反应前后蛋白分子质量的变化来验证该酶对不同蛋白底物的去糖基化活力,结果如图 10 所示,该内切酶对于不同的蛋白底物能够完全地去糖基化,可以作为糖生物学糖基化位点研究中的工具酶。

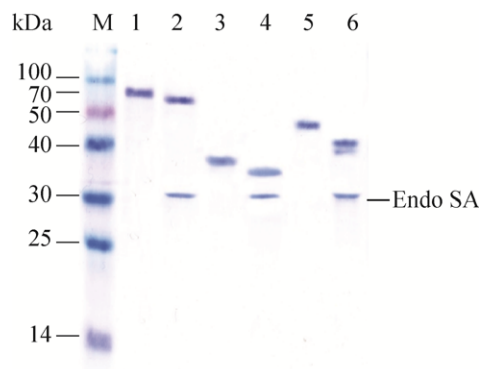


图 10 Endo SA 对不同蛋白底物的去糖基化分析

Fig. 10 The deglycosylation of Endo SA towards different protein substrates. Lane M: protein marker; lane 1: saccharification enzyme; lane 2: glucoamylase treated by Endo SA; lane 3: pectinase; lane 4: pectinase treated by Endo SA; lane 5: acid protease; lane 6: acid protease treated by Endo SA.

3 讨论

随着糖生物学和蛋白组学的发展,对于多肽链上连接的糖链的研究越来越受到科学家的关注,而糖苷酶在糖链的组成分析中发挥着重要作用^[4]。

本研究从苜蓿链霉菌 ACCC 40021 中发现了一个新的 GH18 家族基因,通过对其进行克隆表达和活性测定,发现该酶不具有几丁质酶活性,以 RNase B 为底物对该酶进行去糖基化功能分析及质谱鉴定结果表明,Endo SA 是一种内切 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶。通过序列比对发现,该酶氨基酸序列与 GH18 家族其他内切糖苷酶同源性低,由此可以确定本文发现了一种新的内切- β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶。

内切- β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶均能水解糖蛋白 N-糖链中几丁二糖核心结构的 2 个 *N*-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -(1,4) 糖苷键。根据水解 N-糖链的组分和类型不同,目前商品化的 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶分为:水解高甘露糖和一些杂糖组成的 N-糖链的 Endo H;专一性切除天然免疫球蛋白 IgG 重链的 N-糖链的 Endo S;切割

paucimannose 组成的 N-糖链的 Endo D。本研究中, Endo SA 不能移除 IgG 重链的 N-糖链(结果未显示), 而是高效地去除糖蛋白 (RNase B) 的高甘露糖和一些杂糖组成的 N-糖链, 因此, Endo SA 是一种新型的 Endo H 类内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。

NEB 等公司提供商品化的 Endo H, 是目前蛋白糖基化研究的主要工具酶, 其比活力为 1.0×10^5 U/mg; 而阿维链霉菌来源的 ENGase 比活力为 90 000 U/mg^[22], 粪肠球菌来源的内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的比活力为 1.0×10^4 U/mg^[23]。本研究中, Endo SA 的比活力达到 1.0×10^6 U/mg, 远高于已报道的和商品化的所有内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。Endo SA 在 35 °C 的酶活力最高, 并且热稳定性高, 在 25–45 °C 的条件下酶活力保持不变, 能够适用于蛋白糖基化研究和酶法工业生产。而阿维链霉菌来源 Endo H 在 30 °C 条件下酶活力只能达到最适反应温度下的 65%。该酶在 pH 范围为 4–8 保持稳定性, 最适 pH 为 6, 与商品化 Endo H、已报道的阿维链霉菌和脑膜脓毒性黄杆菌来源的 ENGase 的最适 pH 相近^[22]; 但该酶在 pH 4.0–8.0 保持 95% 以上的活力, 在 pH 9 的条件下保持 1 h 后, 仍保持有近 80% 的活性。表明该酶具有很好的 pH 适应性和稳定性。

随着对糖苷酶研究的深入, 越来越多的应用不断地被挖掘, 例如在食品工业利用奶制品加工的副产物生产寡糖链。在医药工业中, 通过去除糖链, 更好地发挥药效以及合成新的药物。而本研究新发现的糖苷酶以其本身所具有活力高、稳定性强的特性, 可作为糖生物学研究中的工具酶和工业化生产的生物催化剂。

REFERENCES

- [1] Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, et al. Glycosylation and the immune system. *Science*, 2001, 291(5512): 2370–2376.
- [2] Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 2017, 27(1): 3–49.
- [3] Dong QF, Yu RM. New progress on oligosaccharide. *Food & Drug*, 2009, 11(7): 63–66 (in Chinese).
董权锋, 于荣敏. 寡糖研究新进展. *食品与药品*, 2009, 11(7): 63–66.
- [4] Wang XL, Wang XR, Lu TC. The research progress of protein glycosylation modification. *Genom Appl Biol*, 2017, 36(10): 4380–4384 (in Chinese).
王晓龙, 王秀然, 卢天成. 蛋白质糖基化修饰的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(10): 4380–4384.
- [5] Hang HW, Liu YL, Li C. Progress in glycosidase and modification of strategies. *Biotechnol Bull*, 2010(5): 55–60 (in Chinese).
黄红卫, 刘艳丽, 李春. 糖苷酶的研究及其改造策略. *生物技术通报*, 2010(5): 55–60.
- [6] Fairbanks AJ. The ENGases: versatile biocatalysts for the production of homogeneous N-linked glycopeptides and glycoproteins. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(16): 5128–5146.
- [7] Liebminger E, Grass J, Altmann F, et al. Characterizing the link between glycosylation state and enzymatic activity of the endo- β 1,4-glucanase KORRIGAN1 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2013, 288(31): 22270–22280.
- [8] Pasing Y, Sickmann A, Lewandrowski U. N-glycoproteomics: mass spectrometry-based glycosylation site annotation. *Biol Chem*, 2012, 393(10): 249–258.
- [9] Yamamoto H, Asoh M, Murakami H, et al. Liposteroid (dexamethasone palmitate) therapy for west syndrome: a comparative study with ACTH therapy. *Pediatr Neurol*, 1998, 18(15): 415–419.
- [10] Haneda K, Inazu T, Mizuno M, et al. Chemo-enzymatic synthesis of a bioactive peptide containing a glutamine-linked oligosaccharide and its characterization. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1526(3): 1242–1248.
- [11] Huang W, Giddens J, Fan SQ, et al. Chemoenzymatic glycoengineering of intact IgG antibodies for gain of functions. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(29): 12308–12318.
- [12] Zivkovic AM, Barile D. Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human

- health. *Adv Nutr*, 2011, 2(3): 284–289.
- [13] Karav S, Le Parc A, deMoura Bell JMLN, et al. Kinetic characterization of a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase on concentrated bovine colostrum whey to release bioactive glycans. *Enzym Microb Technol*, 2015, 77: 46–53.
- [14] Parc AL, Karav S, Barile D, et al. A novel endo- β -N-acetylglucosaminidase releases specific N-glycans depending on different reaction conditions. *Biotechnol Progr*, 2015, 31(5): 1323–1330.
- [15] Tarentino AL, Maley F. Purification and properties of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *J Biol Chem*, 1974, 249(3): 811–817.
- [16] Trumbly RJ, Robbins PW, Belfort M, et al. Amplified expression of *Streptomyces* endo- β -N-acetylglucosaminidase H in *Escherichia coli* and characterization of the enzyme product. *J Biol Chem*, 1985, 260(9): 5683–5690.
- [17] Sjögren J, Struwe WB, Cosgrave EFJ, et al. EndoS₂ is a unique and conserved enzyme of serotype M49 group A *Streptococcus* that hydrolyses N-linked glycans on IgG and α_1 -acid glycoprotein. *Biochem J*, 2013, 455(2): 107–118.
- [18] Stals I, Samyn B, Sergeant K, et al. Identification of a gene coding for a deglycosylating enzyme in *Hypocrea jecorina*. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 303(6): 9–17.
- [19] Hamaguchi T, Ito T, Inoue Y, et al. Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Glycobiology*, 2010, 20(4): 420–432.
- [20] Muramatsu H, Tachikui H, Ushida H, et al. Molecular cloning and expression of endo- β -N-acetylglucosaminidase D, which acts on the core structure of complex type asparagine-linked oligosaccharides. *J Biochem*, 2001, 129(6): 923–928.
- [21] Umekawa M, Huang W, Li B, et al. Mutants of *Mucor hiemalis* endo- β -N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities. *J Biochem*, 2008, 283(8): 4469–4479.
- [22] Liang B, Guo J, Guan F. The heterologous expression and application of Endo- β -N-acetylglucosaminidase H from *Streptomyces avermitilis* in *Bacillus subtilis*. *J Biol*, 2016, 33(4): 20–24 (in Chinese).
梁标, 郭佳, 关锋. 阿维链霉菌来源 Endo H 在枯草芽孢杆菌中的表达及应用. *生物学杂志*, 2016, 33(4): 20–24.
- [23] Huang YN, Wu JR, Zheng B, et al. Cloning, expression and characterization of β -N-acetylglucosaminidase from *Enterococcus faecalis*. *Chin J Agric Biotechnol*, 2018, 26(4): 698–710 (in Chinese).
黄云娜, 吴今人, 郑蓓, 等. 粪肠球菌来源内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的重组表达及催化特性. *农业生物技术学报*, 2018, 26(4): 698–710.

(本文责编 郝丽芳)