

Man₈GlcNAc₂ 糖基化的酿酒酵母菌株的构建

周峻岗, 张厚程, 王 鹏*, 祁庆生*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 酿酒酵母糖蛋白的 N-糖基化经过高尔基体的修饰后形成聚合度约 150-200 的甘露寡糖, 高尔基体 N-糖基化的糖基转移酶 Mnn1p 和 Och1p 在甘露寡糖的形成过程中起关键作用。通过同源重组置换敲除了酵母中的 *MNN1* 和 *OCH1* 基因阻断高尔基体 N-糖基化修饰, 分离纯化了 *mnn1 och1* 突变株中的 N-糖蛋白, 糖酰胺酶 PNGase F 酶解释放的 N-糖链经过 2-氨基吡啶衍生后, 利用 HPLC 和 MALDI TOF/MS 结合的方法分析了突变株糖蛋白上的 N-糖链。结果显示 *mnn1 och1* 突变株中的糖蛋白的 N-糖链为结构单一的糖链, 分子量为 1794.66, 推测为 Man₈GlcNAc₂。

关键词: 酿酒酵母; 糖基化; 甘露糖蛋白; 甘露糖基转移酶

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0785-05

糖蛋白在生物机体内的重要作用及其在治疗各种疾病上的显著效果使其成为当今全球各大制药公司竞争的热点。目前市场上的药用蛋白包括抗体基本上由哺乳动物细胞生产。然而, 哺乳动物细胞生产药用蛋白存在诸多缺点, 如细胞培养复杂, 蛋白表达量低, 生产成本低, 发酵过程易污染难以控制及生长周期过长等。随着分子生物学技术的不断发展, 微生物在糖蛋白生产的应用逐渐成为新的研究热点^[1-3]。在酵母菌中的糖蛋白具有核心糖链结构 Man₅GlcNAc₂, 但其成熟的糖链结构与人类的相差甚远^[4], 因此酵母生产的糖蛋白活性及其性质受到影响。2002 年以来, GlycoFi 公司经近 5 年先后敲除毕赤酵母自身糖基化过程的 4 个基因, 并陆续引入外源糖基化修饰酶基因, 使用其改造的毕赤酵母能够生产人源化的均一糖蛋白。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 遗传背景非常清晰, 易于遗传操作, 因而成为酵母菌人源化糖蛋白改造的另一理想菌株。

蛋白 N-糖基化首先发生在粗糙内质网(Rough ER)上, 从酵母到高等动物, 内质网上的糖基化过程是保守的, 当穿过内质网膜的多肽链出现天冬酰胺(Asn-X-Ser/Thr)残基序列时, 在膜中寡糖蛋白转移酶的作用下, 寡糖链从磷酸多萜醇(dolichol phosphate)转移并共价结合到多肽链该序列的天冬酰胺残基上。酿酒酵母与动物细胞糖基化在 ER 内

唯一不同处在于 ER 中的 α -1,2 甘露糖苷酶把 Man₉GlcNAc₂ 修饰为 Man₈GlcNAc₂。酿酒酵母的糖蛋白从 ER 转运到高尔基体后, 寡糖链的外端链加上许多甘露糖残基, 形成酵母特有的高甘露蛋白。 α -1,6 甘露糖基转移酶(Och1p)是催化酿酒酵母高尔基形成高甘露糖基化的第一步也是最为关键的甘露糖基转移酶。 α -1,3 甘露糖基转移酶(Mnn1p)是另一个识别 Man₉GlcNAc₂ 为底物的甘露糖基转移酶。因此, 我们通过重组置换, 敲除酿酒酵母 *MNN1* 和 *OCH1* 基因, 阻断高尔基体糖基化过程, 分析了 *mnn1 och1* 突变株的糖基化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) w303-1A (*MAT α ade2 leu2 his3 trp1 ura3*) 酵母表达载体 YFD18 由复旦大学李育阳教授惠赠; *S. cerevisiae* EBY100 购自 invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶为 BBI 公司产品; DNA 胶回收, 片段回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA ladder 购自 MBI 公司。其它化学试剂为国产分析纯。引物由上海生工公司合成。离子交换柱 SQ、SP ff(5ml) 购自 GE healthcare; 石墨碳黑柱(Supelclean ENVI-Carb) 为 Supelco 公司产品; Gene Pulser Xcell 电穿孔仪为 Bio-rad 公司产品;

基金项目 国家自然科学基金(30470399); 山东省中青年科学家奖励基金(2006BS02011)

* 通讯作者。Tel 86-531-88365628 Fax 86-531-88565610 E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

作者简介: 周峻岗(1978-)男, 江西玉山人, 博士研究生, 主要从事糖生物学研究。E-mail: zhoujungang@tom.com

收稿日期 2007-02-08 接受日期 2007-03-22 修回日期 2007-07-08

AKTA explorer100 为 GE Healthcare 公司产品 ;LC-VP 型 HPLC 为日本 Shimadzu 公司产品 ;MALDI TOF/MS 质谱仪 ,AUTOFLEX 型 ,德国 Bruker 公司。

1.1.3 培养基 ① YPD 培养基 :每升含 Tryptone 20g , Yeast extract 10g ,Glucose 20g ;② YNB 选择培养基 :每升含 Yeast nitrogen base 6.7g ,glucose 20g ,补加适量的必需元素。固体培养基添加 2%(W/V)的琼脂。

1.2 酵母细胞培养 基因组提取和 PCR

参考文献 5 进行操作。

表 1 构建 *OCH1* 和 *MNN1* 基因敲除引物

Table 1 Oligonucleotides of constructing the *OCH1* and *MNN1* deletion alleles

Primer No.	Sequence(5'→3')	Size/bp
1	GTTTAAGAAAGTGTACTGTATTAAATGTCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGC	56
2	GTTAGAAAAACACTGGTTAATGCATTTTGTGTTGGCCGCATCTTCTCAAATATG	59
3	CITATCTTTAGACACCGCTCTCGCAG	25
4	GCACGTTCCITATATGTAGCTTTTCGACATTTAATACACAGTAACACTTTCTTAAAC	56
5	CATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACTAAATGCATTAACCAGTGTTTTTTCTAAC	59
6	CCTATTATCACAGGTACTTAAAG	22
7	AAAGAAAGCAAGTAAAGAAAGAGATCATGACAGAGCAGAAAGCCCTAGTAA	55
8	AGAGAGGGTATGATGAAAGGAGAGCCTCGCTACATAAGAACACCTTTTGGTGGAGGG	56
9	GCGCCCGTGGTGTACGTACTGG	24
10	TTACTAGGGCTTTCTGCTCTGTCATGATCTCTTTCTTTTACTTGTCTTTCTTT	55
11	CCCTCCACCAAAGGTGTTCTTATGTACGAGGCTCTCCTTTTCATCATACCCTCTCT	55
12	ATGTCTAGGAAGTTGTCCACCTGATCG	28

The *Ura3* was amplified with Primer 1 and 2 ; the fragment A was amplified Primer 3 and 4 ; the fragment B was amplified Primer 5 and 6 ; the fragment A was amplified Primer 3 and 4 ; the *HIS3* was amplified Primer 7 and 8 ; the fragment C was amplified Primer 9 and 10 ; the fragment D was amplified Primer 11 and 12. Oligonucleotides in italics represented the selectable marker sequences.

1.4 基因 *MNN1* 和 *OCH1* 同源重组置换及重组菌株的筛选和验证

酿酒酵母电转化的细胞制备和 DNA 片段的电击转化方法参照 Gene Pulser Xcell 操作手册进行。*MNN1* 基因敲除的菌株在 *Ura*⁻ 选择培养基 ,*MNN1* 和 *OCH1* 双敲除的菌株在 *Ura*⁻ 和 *His*⁻ 的选择培养基上筛选。阳性重组子利用基因组 PCR 法进行验证。

1.5 *mnn1 och1* 菌株 N-glycan 的糖型分析

1.5.1 酿酒酵母细胞壁蛋白的制备 :*mnn1 och1* 菌株在 YNB 补加 100mg/L 的 (adenine , Leucine , Tryptophane) 28℃ 培养至稳定期收集细胞后经反复冻融破碎。酿酒酵母甘露糖蛋白采用热柠檬酸法抽提^[7]。在抽提液中加入 3 倍体积的无水乙醇 ,离心收集的蛋白沉淀用 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)溶解。甘露糖蛋白的进一步纯化用亲和柱 concanavalin A-sepharose 4B。甘露糖蛋白洗脱用 0.2mol/L α -methyl-D-mannoside ,洗脱液透析后冷冻干燥。

1.5.2 N-glycan 的水解和纯化 :甘露糖蛋白 N-glycan 的 PNGase F 水解参照 Verostek 等^[8]。糖链与蛋白的

1.3 *MNN1* 和 *OCH1* 敲除引物及同源置换 DNA 片段的重叠延伸 PCR 的构建

表 1 为构建 *MNN1* 和 *OCH1* 敲除 DNA 片段所用的引物。同源置换 DNA 片段的构建采用重叠延伸 PCR 法 ,方法参照文献 6 进行 ,并做了些优化 :同源片断、筛选标记基因的片段扩增和第一步延伸都选用 *Pfu* DNA 聚合酶 ;融合产物的扩增用 *Taq* DNA 聚合酶 ,并将退火和复性时间缩短为 15s 以提高特异性产物扩增效率。

粗分离用 2 倍体积的冰丙酮沉淀蛋白 ,离心 ,上清旋转蒸发除去丙酮。残留的蛋白和去污剂利用离子交换层析予以去除。N-糖连的脱盐过石墨碳黑柱 ,以 25%(V/V)的乙睛洗脱 N-糖连^[9] ,冷冻干燥。

1.6 N-糖链的 HPLC 和 MALDI TOF/MS 分析

1.6.1 高效液相分析 :寡糖的 2-氨基吡啶(2-aminopyridine)吡啶化衍生物方法参照 Fan 等^[10]。过量的 2-氨基吡啶经过 phenol(pH 7.0)chloroform(1:1 , V/V)抽提 ,chloroform 抽提 ,重复 3 次^[11]。吡啶化的 N-glycan 采用 Shim-pack cle-NH2 柱(0.46x15cm) HPLC 分析。

1.6.2 MALDI TOF/MS :收集洗脱峰真空干燥 ,吡啶化的 PA-糖链溶解在水中。1 μ L 的样品和 1 μ L 基质混合(2 ,5-dihydroxybenzoic acid 10mg/mL 溶于 30% acetonitrile)。取 1 μ L 的混合物点板 ,在空气中迅速干燥。

2 结果

2.1 敲除线性 DNA 片段的构建

从酵母基因组中 PCR 扩增到的 *MNN1* 上下游

的同源 A、B 片段分别是 0.3kb 和 0.5kb, *OCH1* 上下游的同源片段 C、D 则为 1.3kb 和 1.4kb。 *URA3*、*HIS3* 的基因大小为约 0.8kb 和 0.7kb。 *URA3* 和 A、B, *HIS3* 和 C、D 分别经过重叠延伸 PCR 融合成大小为 1.6kb 和 3.3kb 的片段 E、F, 电泳结果与预期一致 (图 1)。

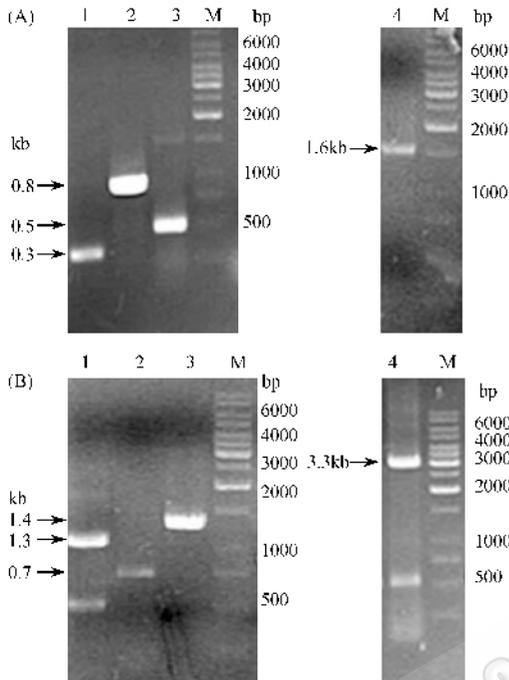


图 1 基因置换 DNA 片段的 PCR 扩增电泳图

Fig.1 The *MNN1* and *OCH1* genes was deleted by replacing with the selectable marker. A: The 5' homology region (fragment A) of *mnn1* (lane 1) the *URA3* selectable marker (lane 2) and the 3' region of *och1* (fragment B) (lane 3). The three products were used as templates to amplify the *mnn1::URA3* deletion allele (lane 4). B: The 5' homology region (fragment C) of *och1* (lane 1) the *HIS3* selectable marker (lane 2) and the 3' region of *och1* (fragment D) (lane 3). The three products were used as templates to amplify the *och1::HIS3* deletion allele (lane 4).

2.2 *mnn1* 和 *mnn1 och1* 突变菌株的构建

体外构建的带 *MNN1* 同源片段和筛选标记 *URA3* 基因的 DNA 片段, 电击转化 *S. cerevisiae* w303-1A 菌株, 在缺少 Ura 的选择固体平板培养基上筛选到阳性重组置换菌株。挑取阳性重组子若干, 用于 *MNN1* 基因上游 319bp, 下游 187bp 的引物 F: 5'-CTTATCTTTAGACACGCTCTCGCAG-3' 和 R: 5'-TTCTTTTCTAGAGTTTATGTGCAAAG-3' 基因组 PCR 筛选发生正确重组置换的重组子, 结果如图 (图 2-A)。对照菌株 w303-1A 的扩增产物为 2.8kb, *URA3* 置换 *MNN1* 后则扩增产物为 1.3kb。结果表明构建得 *mnn1* 突变株。

构建的带 *OCH1* 同源片段和筛选标记 *HIS3* 基

因的 DNA 片段转化 *mnn1* 突变株, 在缺少 His 的选择固体平板培养基上筛选到阳性重组菌株。用分别位于 *MNN1* 基因上游 94bp, 下游 181bp 的引物 F: 5'-GGGATAGGTTGTTTTAGTCTTTG-3' 和 R: 5'-CTGCTCACAGTTGTCTACGGAAGG-3', 基因组 PCR 筛选 *OCH1* 敲除菌株。 *His3* 置换 *OCH1* 则扩增产物为 950bp。对照菌株 w303-1A 则扩增产物为 1.7kb, 结果表明构建得 *mnn1 och1* 突变株, 结果如图 (图 2-B)。

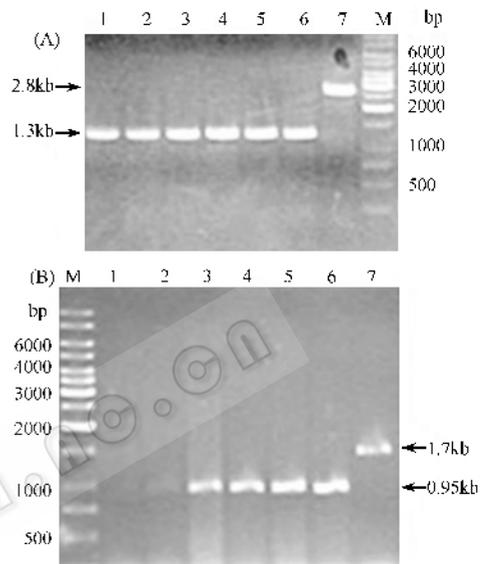


图 2 PCR 验证重组敲除菌株

Fig.2 deletions of *MNN1* and *OCH1* was confirmed by PCR. A: 1-6, positives of Ura-screening; 7. control strain (w303-1a); M. DNA ladder. B: 1-6. positives of His-screening; 7. control strain (w303-1a); M. DNA ladder.

2.3 *mnn1 och1* 菌株蛋白糖基化分析

核心糖链在高尔基体可分为两条不同的修饰途径, 形成比较短的 $\text{Man}_{8-13}\text{GlcNAc}_2$ 糖链结构或形成甘露糖聚合度超过 200 的糖链。 *Och1p* 在高尔基体中催化内质网的核心结构 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 形成一个 α -1, 6 甘露糖苷键, 从而引发酵母高尔基体过度甘露糖基化。 *MNN1* 则编码 α -1, 3 甘露糖基转移酶 (*Mnn1p*), 催化的酶促反应是在甘露聚糖末端形成 α -1, 3 甘露糖苷键。 *Och1p* 和 *Mnn1p* 都是 Type II 跨膜蛋白, 定位与高尔基膜上, 敲除 *OCH1* 和 *MNN1* 阻断了蛋白在高尔基体的糖基化修饰。突变株 *mnn1 och1* 分离纯化的糖蛋白的 N-糖链分析结果表明从突变菌甘露糖蛋白酶解的糖链主要为单一的寡糖链 (图 3)。

MALDI TOF/MS 分析表明, 此寡糖链的 sodium adducts $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 为 1818, potassium adducts $[\text{M} + \text{K}]^+$ 为 1834, 证实该单一的糖链分子量大小为 1794.66

与 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 的分子量大小吻合(图4)

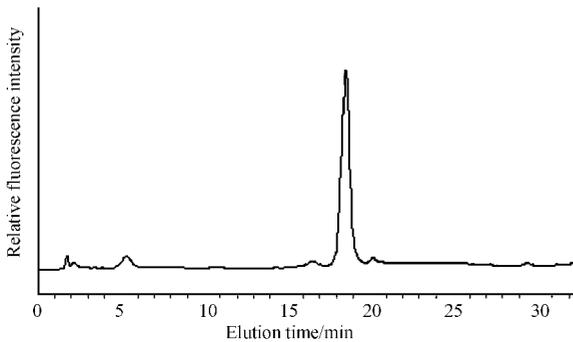


图3 *mnn1 och1* 突变株甘露糖蛋白的 2-氨基吡啶化 N-glycan HPLC 分析

Fig.3 HPLC profile of N-glycans released from *mnn1 och1* mutant *S. cerevisiae*. Analytical conditions: HPLC was applied onto a Shim-pack c1c-NH₂ column (Shimadzu) and eluted for 50min with a linear gradient of 65% ~ 50% acetonitrile in 3% acetic acid/triethylamine (pH 7.3) at a flow rate of 0.6ml/min at room temperature. The chromatogram was recorded with a fluorescence monitor at an excitation wavelength of 320nm and an emission wavelength of 390nm.

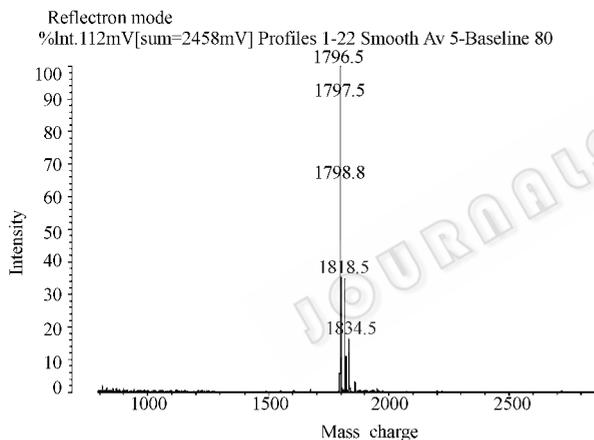


图4 PA-oligomannose 的 MALDI TOF/MS 分析

Fig.4 MALDI TOF/MS of PA-oligomannose. Positive-ion MALDI TOF/mass spectra of N-linked glycans released from *mnn1 och1* mannoprotein. The pyridylaminated N-linked glycans were analyzed by MALDI TOF mass spectrometry, appearing as the sodium and potassium adducts.

3 讨论

很多关键的生物过程,包括细胞迁移和细胞因子作用、肿瘤发生及发展、病原微生物感染、免疫反应包括炎症和自身免疫病等^[2,12-14],都与糖复合物有关。这些发现使得糖复合物,主要是糖蛋白,成为治疗各种疾病,如癌症、传染病、代谢性疾病和心血管疾病等的主要药物。N-糖基化在细胞生命过程中起重要作用,能促进新生肽链的折叠^[15]。原核表达系统如大肠杆菌、乳酸杆菌等在蛋白加工修饰过程中没有糖基化,大部分真核蛋白都不能用细菌表达

系统表达。酿酒酵母具有无毒、容易培养和遗传背景清晰等优点,具有潜在的巨大经济价值因此通常为首选的真核表达系统。然而酿酒酵母高尔基的糖基化修饰导致过度甘露糖基化,而且形成潜在免疫源性的 α -1,3 甘露糖苷键,从而限制了酿酒酵母在蛋白药物生产的应用。

在酵母中, *Och1p* 是 N-糖基化过程中的关键酶,催化核心糖链 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 形成一个 α -1,6 甘露糖苷键^[16],从而引发蛋白过度甘露糖基化。*Mnn1p* 在 O-连接和 N-连接的糖基化过程中形成最外端的甘露糖苷键,因此也能催化核心糖链 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 形成 $\text{Man}_{9-10}\text{GlcNAc}_2$ 糖型,然而这种 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 糖型与动物细胞糖基化过程中 ER 中间体结构 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 不同。通过敲除酿酒酵母 *MNN1* 和 *OCH1*,消除在蛋白 N-糖基化过程中形成 α -1,3 甘露糖,同时阻断了高尔基体中主糖链骨架延伸,使得酵母糖基化过程经过 ER 修饰后就成为成熟的 N-连接的糖链。*mnn1 och1* 突变株蛋白糖基化形式与人等高等动物糖基化过程中间休同样的结构,消除了酿酒酵母表达的糖蛋白药物在人体内存在免疫源性,因而 *mnn1 och1* 突变工程菌能应用于药用蛋白的微生物生产。

基于 *mnn1 och1* 突变工程菌的在医药工业上的应用前景,我们对 *mnn1 och1* 突变作为表达外源蛋白的宿主细胞做了一些研究,选用目前广泛应用于抗病毒的药物 β 干扰素作为目的蛋白,在野生型及 *mnn1 och1* 突变株中表达。结果发现与野生型酿酒酵母相比, *mnn1 och1* 突变株作为蛋白表达宿主细胞时存在一些缺陷。首先是菌体生长缓慢,在生长的稳定期,菌体的生长密度明显小于野生型。其次是质粒转化效率低,在缺少担体 ssDNA 的情况下,100ng 当量的质粒 DNA 的电转化仅获得 6 个转化子,相同条件下,野生型和 *mnn1* 突变株能达到 10^2 数量级,其可能的原因是敲除 *MNN1 OCH1* 破坏酵母细胞壁结构,在高压电击时细胞死亡率高导致的。然而干扰素蛋白在胞内表达,并没有分泌的胞外。原因可能是 β 干扰素对酿酒酵母有毒性, β 干扰素蛋白翻译后直接在周质空间堆积,并没有经过分泌途径分泌到胞外。因此,我们无法对 *mnn1 och1* 突变工程菌对外源蛋白的糖基化进行分析。目前我们正在 *mnn1 och1* 突变菌表达促红细胞生成素(EPO),并分析 N-glycan 结构,系统地研究 *mnn1 och1* 突变菌作为微生物药用蛋白生产工程菌的性状,为下一步

酵母表达重组药用糖蛋白奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Chin JW ,Cropp TA ,Anderson JC ,et al. An expanded eukaryotic genetic code. *Science* 2003 **301** :964 – 967.
- [2] Wacker M ,Linton D ,Hitchen PG ,et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002 **298** :1790 – 1793.
- [3] Choi BK ,Bobrowicz P ,Davidson RC ,et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 **100** :5022 – 5027.
- [4] Macauley-Patrick S ,Fazenda ML ,McNeil B ,et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 2005 **22** :249 – 270.
- [5] Joseph S ,David WR. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] Davidson RC ,Blankenship JR ,Kraus PR ,et al. A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. *Microbiology* 2002 **148** :2607 – 2615.
- [7] Peat S ,Whelan WJ. Polysaccharides of baker's yeast. IV. Mannan. *J Chem Soc* ,1961 **29** – 34.
- [8] Verostek MF ,Atkinson PH ,Trimble RB. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* alg3 ,sec18 mutant oligosaccharides. *J Biol Chem* ,1991 , **266** :5547 – 5551.
- [9] Grubenmann CE ,Frank CG ,Hulsmeier AJ ,et al. Deficiency of the first mannosylation step in the N-glycosylation pathway causes

congenital disorder of glycosylation type 1k. *Hum Mol Genet* ,2004 , **13** :535 – 542.

- [10] Fan JQ ,Huynh LH ,Lee YC. Purification of 2-aminopyridine derivatives of oligosaccharides and related compounds by cation-exchange chromatography. *Anal Biochem* ,1995 **232** :65 – 68.
- [11] Kuraya N ,Hase S. Release of O-linked sugar chains from glycoproteins with anhydrous hydrazine and pyridylation of the sugar chains with improved reaction conditions. *J Biochem (Tokyo)* ,1992 **112** :122 – 126.
- [12] Feldman MF ,Wacker M ,Hernandez M ,et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2005 **102** :3016 – 3021.
- [13] Wacker M ,Feldman MF ,Callewaert N ,et al. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 **103** :7088 – 7093.
- [14] Alaïme C ,Catrein I ,Morf L ,et al. Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *Embo J* , 2006 **25** :967 – 976.
- [15] Hamilton SR ,Davidson RC ,Sethuraman N ,et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* 2006 **313** :1441 – 1443.
- [16] Nakayama K ,Nagasu T ,Shimma Y ,et al. *OCHI* encodes a novel membrane bound mannosyltransferase : outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *Embo J* ,1992 **11** :2511 – 2519.

Construction of the Man₈GlcNAc₂ glycosylation *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain

ZHOU Jun-gang ZHANG Hou-cheng ,WANG Peng* ,QI Qing-sheng*
(State Key Laboratory of Microbial Technology ,Shandong University ,Jinan 250100 ,China)

Abstract :In *Saccharomyces cerevisiae* ,protein glycosylation passed two different N-linked modification pathways after the export of predominantly Man₈GlcNAc₂-containing glycoproteins from ER to the Golgi. The core oligosaccharide undergoes maturation in the Golgi resulting in a Man₈₋₁₃GlcNAc₂ structure. Alternatively ,core structures may be hypermannosylated with up to 200 mannose residues composing of a backbone of α 1 ,6-mannosyl residues with branched α 1 ,2- and α 1 ,3-mannosyl side chains. Mnn1p and Och1p play an important role in this process. The null disruption of *MNN1* ,*OCHI* was replaced by the *S. cerevisiae* *URA3* ,*HIS3* ,respectively. To characterize the N-glycosylation in the *mnn1 och1* mutant ,mannoproteins were obtained by hot citrate buffer extraction after the *mnn1 och1* cells were crumbled. The extracted mannoprotein was precipitated by ethanol ,and further purified by concanavalin A-sepharose 4B. The N-oligomannose saccharides were released from mannoprotein by PNGase F digestion ,and then peptides and detergents were removed by passage through ion exchange columns. For desalting ,glycans were applied to porous graphitic-carbon cartridge. 2-aminopyridine pyridylaminated sugars were profiled and purified by size fractionation HPLC with Shim-pack clc-NH₂ column ,and result showed dominantly a single peak. MALDI TOF/MS analysis of this peak revealed that its molecular weight was 1796.5Da ,which corresponds to the calculated mass of Man₈GlcNAc₂-PA. These results indicated that disruptions of *MNN1* and *OCHI* eliminated the hypermannosylation of the N-linked glycans and glycoproteins were glycosylated with a single core type glycan Man₈GlcNAc₂ in the *mnn1 och1* mutant.

Keywords : *Saccharomyces cerevisiae* ; Glycosylation ; Mannoprotein ; Mannosyltransferase