

人源 Alg1 蛋白的原核表达及其跨膜结构域性质分析

魏东芝, 陈征辉, 王春迪, 高晓冬, 王宁*

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

魏东芝, 陈征辉, 王春迪, 高晓冬, 王宁. 人源 Alg1 蛋白的原核表达及其跨膜结构域性质分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1535-1546.

WEI Dongzhi, CHEN Zhenghui, WANG Chundi, GAO Xiaodong, WANG Ning. Prokaryotic expression of human Alg1 protein and analysis of the transmembrane domain properties[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1535-1546.

摘 要: 作为最普遍的蛋白质糖基化修饰方式, *N*-糖基化起始于内质网中多萜醇寡糖(dolichol-linked oligosaccharide, DLO)前体的合成。甘露糖基转移酶 Alg1 催化添加 DLO 结构中的第 1 个甘露糖, 是该生化途径中的关键酶。人体中 *ALG1* 基因的缺陷会导致先天性糖基化疾病(congenital disorders of glycosylation, CDG)。为了建立人源 Alg1 (*Homo sapiens* Alg1, *HsAlg1*)的体外表达和活性检测体系, 本研究构建了全长的 pET28a-His6-*HsAlg1* 和截除跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)的 pET28a-His6-*HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ 这 2 种质粒并在大肠杆菌中表达, 以多萜醇磷酸壳二糖(dolichyl-pyrophosphate GlcNAc2, DPGn2)为反应底物, 采用液质联用的方法检测 *HsAlg1* 和 *HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ 重组蛋白的活性。结果显示, *HsAlg1* 具有转糖基活性, 蛋白纯化后活性降低, 重新加入膜组分后得到部分回补, 而 *HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ 不能催化转糖基反应。上述结果表明 *HsAlg1* 蛋白的 N 端 TMD 在催化反应中起到了重要的作用。本研究为后续表达并检测 ALG1-CDG 相关突变蛋白的活性奠定了基础。

关键词: *N*-糖基化; 甘露糖基转移酶 Alg1; 膜蛋白; 多萜醇寡糖

资助项目: 国家自然科学基金(22077053, 32271342); 北京市自然科学基金(2242022); 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX23_2568); 江苏省“青蓝工程”

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22077053, 32271342), the Beijing Natural Science Foundation (2242022), the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX23_2568), and the Qing Lan Project of Jiangsu Province.

*Corresponding author. E-mail: wangning@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-10-21; Accepted: 2025-01-14; Published online: 2025-01-14

Prokaryotic expression of human Alg1 protein and analysis of the transmembrane domain properties

WEI Dongzhi, CHEN Zhenghui, WANG Chundi, GAO Xiaodong, WANG Ning*

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: As the most common type of protein glycosylation, *N*-glycosylation begins with the synthesis of the dolichol-linked oligosaccharide (DLO) precursor in the endoplasmic reticulum. The mannosyltransferase Alg1 catalyzes the addition of the first mannose molecule to DLO, serving as a key enzyme in this biochemical pathway. The defect of human *ALG1* gene can lead to the congenital disorders of glycosylation (CDG), i.e., ALG1-CDG. Therefore, it is of great significance to establish the expression and activity assay system of *Homo sapiens* Alg1 (*HsAlg1*) *in vitro*. In this study, full-length plasmid pET28a-His6-*HsAlg1* and transmembrane domain-lacking plasmid pET28a-His6-*HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ were constructed and expressed in *Escherichia coli*, and the activity of recombinant *HsAlg1* and *HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ was measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS) with dolichyl-pyrophosphate GlcNAc2 (DPGn2) as the substrate. The results showed that *HsAlg1* had transglycosylation activity, while the activity decreased after protein purification, which was partially restored upon re-addition of membrane components. However, *HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ was unable to catalyze glycosylation. The results indicate that the N-terminal transmembrane domain (TMD) of *HsAlg1* plays an important role in the catalytic reaction. This study lays a foundation for further expression and activity analysis of ALG1-CDG-related mutants.

Keywords: *N*-glycosylation; mannosyltransferase Alg1; membrane protein; dolichol-linked oligosaccharide

蛋白质翻译后修饰 (post-translational modifications, PTMs) 是蛋白质在生物合成后的化学修饰, 常见的蛋白质翻译后修饰有磷酸化、泛素化、糖基化、甲基化和乙酰化等^[1]。这些修饰可以改变蛋白质的结构、功能和定位, 在细胞中发挥着重要的调控作用, 同时也参与了许多疾病的发生和发展, 如神经退行性疾病、癌症等^[2-3]。蛋白质糖基化修饰是真核细胞中最重要的蛋白质翻译后修饰之一^[4], *N*-糖基化是生命体中最常见的糖基化修饰, 人体中绝大部分糖蛋白都是 *N*-糖基化修饰, 真核生物中的 *N*-糖基化起始于内质网(endoplasmic reticulum, ER)中多萜醇寡糖前体(dolichol-linked oligosaccharide,

DLO)的合成^[5-6]。

DLO 的结构在原核生物中多种多样, 在真核生物中却高度保守^[7-9]。真核生物的 DLO 生物合成起始于 ER 胞质面的磷酸多萜醇(dolichol phosphate, Dol-P)^[10], 在一系列糖基转移酶(asparagine-linked glycosyltransferase, Alg)的催化下依次添加糖基供体, 从而形成含有 2 个 *N*-乙酰葡萄糖胺(*N*-acetylglucosamine, GlcNAc)、9 个甘露糖(mannose, Man)和 3 个葡萄糖(glucose, Glc)的 Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol 特殊寡糖结构^[11-12]。其中甘露糖基转移酶 I (mannosyltransferase I, MT-I)定位于 ER 的细胞质侧, 利用 GDP-Man 作为供体底物, 催化首个 Man 残基转移到

GlcNAc2-PP-Dol 上, 与相邻的 GlcNAc 残基以 β -1,4 键连接, 形成核心三糖 GlcNAc2Man 结构^[13-14]。在人(*Homo sapiens*)中, MT-I由糖基转移酶 1 (asparagine-linked glycosylation 1, Alg1)编码, 也被称为人类甘露糖基转移酶 1 (human mannosyltransferase 1, HMT1), 是一个由 464 个氨基酸组成的 52.5 kDa 大小非糖基化 II 型跨膜蛋白^[15]。AlphaFold 预测的 HsAlg1 三维结构如图 1A 所示, 在 N 端含有一个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD), 其较低的可信度可能意味着 HsAlg1 的 TMD 结构存在较大的不确定性, 并且其功能也是未知的。

2017 年 Li 等^[16]开发了酵母 Alg1 (ScAlg1) 的异源表达体系, 大量表达了截除跨膜域的 ScAlg1 Δ TM, 并使用液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS)在体外定量检测蛋白活性。至今尚未见

人源 Alg1 蛋白大量表达的报道。人体中, 由 ALG1 基因突变引发的先天性糖基化疾病(congenital disorders of glycosylation, CDG)是一种遗传性疾病, 严重影响人体的正常发育和生长^[17-18]。ScAlg1 与 HsAlg1 存在非保守的氨基酸位点, 其体外活性检测体系对 HsAlg1 并不完全适用, 因此表达 HsAlg1 蛋白并开发新的、更全面的 HsAlg1 蛋白活性检测技术具有重要的意义。然而, 建立 HsAlg1 活性检测体系存在 2 个难点, 即底物合成困难和蛋白无法大量在体外表达。HsAlg1 蛋白的底物多萜醇磷酸壳二糖(dolichyl-pyrophosphate GlcNAc2, DPGn2)目前依赖于从猪肝或细胞中提取, 过程复杂且价格昂贵^[19-20]。陈征辉等^[21]设计了一条简单易行的 DPGn2 合成路线, 为直接表达 HsAlg1 突变蛋白和构建新的活性检测方法提供了可能。此外, 在 Wang 等^[22]的研究中, 预测的 ScAlg1 和 HsAlg1 的二

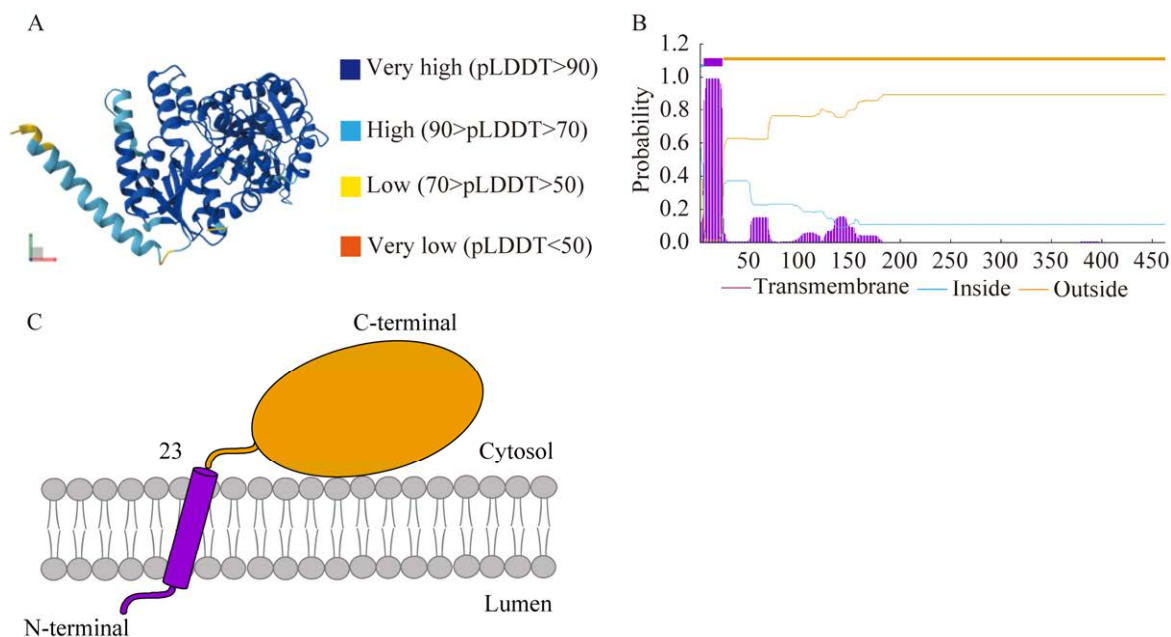


图 1 糖基转移酶 HsAlg1 的结构示意图 A: AlphaFold 预测的三维结构; B: 跨膜拓扑预测; C: N 端跨膜结构域示意图。

Figure 1 The structural diagram of *Homo sapiens* mannosyltransferase 1. A: Three dimensional structures predicted from AlphaFold; B: Transmembrane topology prediction; C: Diagram of the N terminal transmembrane domain.

级结构具有高度保守性,都在 N 端含有 1 个 TMD。因此,为实现高效和稳定地表达 *HsAlg1* 蛋白,本研究构建了重组质粒 pET28a-His6-*HsAlg1* 和 pET28a-His6-*HsAlg1*₂₃₋₄₆₄,在体外利用大肠杆菌表达 *HsAlg1* 蛋白,并深入探究 *HsAlg1* 的 TMD 对其活性的影响,以期为后续以 DPGn2 为底物对 ALG1-CDG 相关突变蛋白活性检测进行研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究使用的原核表达质粒 pET28a 购自默克公司,扩增菌株和表达菌株为实验室保存的大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta(DE3),引物合成和基因测序均由天霖生物科技(上海)有限公司完成。

1.1.2 主要培养基

LB 液体培养基、LB 固体培养基和 TB 液体培养基的配制方法均参考文献[23],其中 TBK 液体培养基是在 TB 液体培养基的基础上添加 2.3 g/L 磷酸氢二钾和 16.4 g/L 磷酸二氢钾进行配制。121 °C 湿热灭菌 15 min,根据实验需要添加终浓度为 50 μ g/mL 的卡那霉素。

1.1.3 主要试剂

生物试剂主要包括:购自宝日医生物技术(北京)有限公司的限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶、Ligation Mix 连接酶和 2 $\times$ Taq 聚合酶;购自北京全式金生物技术股份有限公司的二抗 Goat-anti-mouse IgG-HRP、一抗 Anti-His mouse antibody、1 kb Plus DNA Ladder 和 Blue Plus II Protein Marker;购自上海碧云天生物技术有限公司的 Gel-Green Plus 核酸染料、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒;购自生工生物工程(上海)股份有限公司的 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep PCR 产物纯化试剂盒、

SanPrep 胶回收试剂盒、琼脂糖和脱脂牛奶;购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司的卡那霉素(kanamycin, Kan)、磷酸二氢钾、三羟甲基氨基甲烷、2-吗啉乙磺酸和考马斯亮蓝;购自伯乐(上海)生命科学研究发展有限公司的聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)和 ClarityTM Western ECL Substrate 显色剂。

化学合成试剂主要包括:购自武汉糖智药业有限公司的 GDP-Man;购自圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司的全乙酰壳二糖;购自上海阿达玛斯试剂有限公司的二甲胺、二异丙基氨基锂、焦磷酸四苯基酯、碳负载钨和四丁基磷酸二氢铵;购自东京化成工业株式会社的[(S)-tol-binap-RuCl₂(p-cymene)]和三氯乙腈;购自北京百灵威科技有限公司的 N,N-羰基二咪唑(1,1'-carbonyldiimidazole, CDI);购自伯乐(上海)生命科学研究发展有限公司的阳离子交换树脂(AG 50W-X8)和 Supelclean ENVI-Carb 活性炭;购自默克公司的薄层层析(thin-layer chromatography, TLC)硅胶板。

其他常用试剂购自中国国药集团有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET28a-His6-*HsAlg1* 和 pET28a-His6-*HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ 的构建

在 NCBI 数据库中检索并下载全长为 1 392 bp 的 *HsAlg1* 基因序列,设计上游引物 pET28a-F₁ 和下游引物 pET28a-R,分别引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind* III,构建 N 端带有 6 个 His 标签的重组质粒 pET28a-His6-*HsAlg1*。利用网站 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)对 *HsAlg1* 蛋白进行跨膜结构域分析,为了截除 N 端跨膜域(第 1-22 个氨基酸),在第 23 个氨基酸前后设计上游引物 pET28a-F₂,并引入酶切位点 *Bam*H I,构建 N 端带有 6 个 His 标签的重组质粒 pET28a-His6-*HsAlg1*₂₃₋₄₆₄,实验所用引物见表 1。将构建的重组质粒 pET28a-His6-*HsAlg1* 和 pET28a-His6-*HsAlg1*₂₃₋₄₆₄

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Primer sequences (5'→3')
pET28a-F ₁	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGAT CCGCGGCCTCATGCTTG
pET28a-R	CTGTGCTCCCTTTGGTTATGGACACAT AAAAGCTTGCGGCCGCACTC
pET28a-F ₂	CGCGGATCCGAAGCGCTGGCGCCGG GGGCGGGCGGCC

转化到扩增菌株感受态细胞 DH5 α ，涂布于 LB (Kan⁺)固体平板上，挑选单菌落进行 PCR 验证，阳性结果进一步测序确认。

1.2.2 重组蛋白 HsAlg1 和 HsAlg1₂₃₋₄₆₄ 的表达

将构建成功的重组质粒 pET28a-His6-HsAlg1 和 pET28a-His6-HsAlg1₂₃₋₄₆₄ 转入表达菌株感受态细胞 Rosetta(DE3)中，加入 1 mL 无抗性 LB 液体培养基于 37 °C、220 r/min 摇床预培养 50 min，浓缩至 0.2 mL 涂布于 LB (Kan⁺)固体平板上，37 °C 培养箱过夜培养。挑取单菌落接种于 4 mL 的 LB (Kan⁺)液体培养基中，37 °C、220 r/min 摇床培养 12 h，获得种子液。100 mL 的 TBK (Kan⁺)液体培养基中加入 1 mL 种子液，37 °C、220 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀=0.8，转入 16 °C、200 r/min 摇床冷却培养 1 h 后，加入 100 μ L 浓度为 0.1 mol/L 的 IPTG，16 °C、200 r/min 诱导 18 h。

1.2.3 重组蛋白粗酶 HsAlg1 的提取

4 °C、9 000 r/min 离心 3 min 收集诱导后 HsAlg1 菌体，重悬于 8 mL 预冷的裂解 Buffer I (150 mmol/L 氯化钠，25 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐，pH 8.0)。在 45% 的功率下低温超声破碎 20 min (破碎 5 s，停 5 s)，破碎后的菌体 4 °C、4 000 r/min 离心 30 min，收集上清。上清于 4 °C、15 000 r/min 离心 50 min，收集沉淀，复溶于 400 μ L 预冷的溶膜 Buffer II (20.5 mmol/L 2-吗啉乙磺酸，体积分数 30% 的甘油)，搅拌均匀备用。

1.2.4 重组蛋白 HsAlg1₂₃₋₄₆₄ 的纯化

4 °C、9 000 r/min 离心 3 min 收集诱导后 HsAlg1₂₃₋₄₆₄ 菌体，重悬于 10 mL 预冷的裂解 Buffer I。在 45% 的功率下低温超声破碎 20 min (破碎 5 s，停 5 s)，破碎后的菌体加入 30 μ L 的 Triton X-100 (总体系的 0.3%)，冰上孵育 30 min 后，4 °C、4 000 r/min 离心 40 min，收集上清。上清加入 1 mL 的 Ni NTA Beads，4 °C 旋转结合 50 min，结合后的上清于 4 °C、9 000 r/min 离心 3 min，收集沉淀。

亲和层析柱用 3 mL 裂解 Buffer I 湿润，加入上述收集的沉淀后，用 5 mL 裂解 Buffer I 冲洗。然后依次用含 20、60、250 mmol/L 的咪唑裂解 Buffer I 洗脱蛋白，各梯度洗脱 10 mL 并分别收集，洗脱液经 SDS-PAGE 检测。将含有干净目的蛋白的洗脱液加入超滤管在 4 °C、15 000 r/min 进行浓缩后，重复加入 3 次裂解 Buffer I 在 4 °C、15 000 r/min 进行除盐。

1.2.5 蛋白质 SDS-PAGE 检测和免疫印迹分析

各梯度蛋白样品取 40 μ L 加 10 μ L 的 5 $\times$ SDS PAGE Loading Buffer 混匀，100 °C 孵育 3 min。将蛋白凝胶置于电泳装置，处理后的蛋白样品以 2 μ L 等体积加到对应的凝胶槽中，倒入 SDS-PAGE 缓冲液进行电泳。电泳条件：85 V 恒压进行浓缩胶电泳 25 min，150 V 恒压进行分离胶电泳 65 min。电泳结束后，将 SDS-PAGE 凝胶浸泡在考马斯亮蓝染液孵育 50 min 后，置于 100 °C 沸水中煮 15 min 至条带可见，转置清水中振荡过夜至条带清晰可见。

免疫印迹中，将电泳完成的 SDS-PAGE 凝胶转 PVDF 膜，加入 5% 脱脂牛奶，室温摇晃封闭 50 min。封闭结束后，加入一抗(用 5% 脱脂牛奶稀释至 1/5 000 的 Anti-His Mouse mAb)，室温摇晃孵育 50 min，使用洗膜 Buffer III (150 mmol/L

氯化钠, 10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 体积分数 0.1% 的吐温-20, pH 8.0) 洗涤 3 次, 每次 10 min。加入二抗(用 5% 脱脂牛奶稀释至 1/8 000 的 Goat Anti-Mouse IgG HRP), 室温摇晃孵育 50 min, 使用洗膜 Buffer III 洗涤 3 次, 每次 10 min。用 Clarity™ Western ECL Substrate 显色剂显色, 凝胶成像仪曝光, 观察显色结果并拍照。

利用免疫印迹半定量分析蛋白表达量, 纯化的 GalT 蛋白作为参照蛋白, 稀释为 1/200、1/400、1/600、1/800、1/1 000、1/1 200 这 6 个梯度, 每个梯度取 40 μ L 加 10 μ L 的 5 $\times$ SDS PAGE Loading Buffer 混匀, 100 $^{\circ}$ C 孵育 3 min, 跑 SDS-PAGE 后进行免疫印迹分析。用 Tanon Image 软件分析免疫印迹各个蛋白条带的密度, 拟合参照蛋白条带密度和其稀释浓度的趋势线, 获得线性方程, 根据 HsAlg1 蛋白条带密度计算得到 HsAlg1 蛋白浓度。

1.2.6 蛋白质 HsAlg1 天然底物 DPGn2 的合成

合成天然底物 DPGn2 的方法来自实验室现有的合成路线^[21], 利用高效液相色谱从银杏叶中分离提取 90C 和 95C 长聚戊烯醇作为 DPGn2 合成的底物。以 90C 长为例, 聚戊烯醇不对称加氢的方法为: 在氩气下, 取 90C 聚戊烯醇(63.9 mg)、氢氧化钾(6.3 mg)和[(S)-tolbinap-RuCl₂(p-cymene)] 催化剂(1.5 mg)溶于 0.5 mL 无水异丙醇, 在 84 $^{\circ}$ C 反应 12 h, 减压浓缩后通过柱色谱法纯化, 洗脱剂为 V(甲醇):V(二氯甲烷)=40:1, 得到淡黄色油状产物 S-聚戊烯醇。磷酸化 S-聚戊烯醇的方法为^[23]: 在氩气下, 取 S-聚戊烯醇(31.5 mg)和四丁基磷酸二氢铵(17.2 mg)溶于 0.5 mL 无水二氯甲烷, 加入 16.4 μ L 三氯乙腈, 常温搅拌 20 min 后旋转蒸发溶剂; 重溶于 0.5 mL 四氢呋喃中, 加入 50 μ L

25% 的氨水常温搅拌 45 min 后, 加入 0.4 mL 甲醇:甲苯混合溶液(体积比为 1:1)常温搅拌 20 min 后旋转蒸发溶剂, 通过柱色谱法纯化, 洗脱剂为 V(二氯甲烷):V(甲醇):V(1%氨水)=120:10:1, 得到粗产物, 用离子交换色谱柱(AG 50W-X8 作为填料, 20% 的乙醇作为洗脱剂)进一步纯化, 得到白色固体 S-聚戊烯醇磷酸。磷酸化壳二糖与磷酸化 S-聚戊烯醇耦联的方法为: 在氩气下, 取磷酸化壳二糖(4.1 mg)溶于 0.1 mL 无水甲醇, 加入 0.1 mL 三乙胺反应 10 min, 旋转蒸发溶剂后重溶于 0.1 mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺, 加入溶于 0.2 mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺的 CDI(5 mg), 室温搅拌 1.5 h, 加入 2 μ L 甲醇室温搅拌 30 min, 淬灭所有未反应的 CDI; 再加入溶于 0.6 mL 无水二氯甲烷的 S-聚戊烯醇磷酸(16.6 mg), 室温搅拌 48 h, 加入 0.8 mL 甲苯旋转蒸发终止反应, 通过柱色谱法纯化, 洗脱剂为 V(三氯甲烷):V(甲醇):V(1%氨水)=100:10:1, 得到白色固体 S-聚戊烯醇全乙酰壳二糖。在碱性条件下, 脱除壳二糖的乙酰基, 得到最终产物 DPGn2。

1.2.7 重组蛋白 HsAlg1 和 HsAlg1₂₃₋₄₆₄ 的活性检测

重组蛋白的酶促反应条件: 1 μ L 底物受体 DPGn2 (0.1 mol/L)、1.5 μ L 糖基供体 GDP-Man (0.1 mol/L)、3 μ L 重组蛋白(0.05 mg/mL)和 1 μ L MgCl₂ (1 mol/L)加入 43.5 μ L 酶学反应缓冲液 Buffer IV (13 mmol/L 2-吗啉乙磺酸, 3.85 mmol/L 柠檬酸三钾, 1 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 体积分数 0.1% 的乙基苯基聚乙二醇, pH 6.5), 总体积为 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 3.5 h。反应结束后加入 50 μ L 盐酸(40 mmol/L), 100 $^{\circ}$ C 酸解 50 min。固相萃取柱纯化糖链, 冷冻干燥收集后的糖链, 重溶于 60 μ L 80%乙腈溶液, 加入进样小瓶用 LC-MS 检测分析。LC-MS 条件: 质谱模式为阳离子模式; 色谱柱为氨基柱

(1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm); 样品进样量 10 μL ; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 0.2 mL/min; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为水; 流动条件为 0–2 min 的 80%流动相 A, 2–15 min 的 80%–50%流动相 A。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白的表达与纯化

利用 DeepTMHMM 网站对糖基转移酶 *HsAlg1* 的氨基酸序列进行跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)分析, 从图 1B 可以看出, 其 N 端第 1–22 位的氨基酸是 1 个 TMD, 另外在第 50–200 位的氨基酸中含有多个膜结合区域。图 1C 为 *HsAlg1* 蛋白与膜组分的相互作用结构示意图, 由于磷酸多萜醇(dolichol phosphate, Dol-P)嵌合于内质网膜的内部结构中, 推测在 *N*-糖基化合成过程中 *HsAlg1* 的 TMD 对识别 Dol-P 具有重要作用。本研究构建了 pET28a-His6-*HsAlg1* 和 pET28a-His6-*HsAlg1*_{23–464} 重组质粒, *HsAlg1* 的基因大小为 1 327 bp, *HsAlg1*_{23–464}

的基因大小为 1 327 bp, 构建的质粒分别用限制性内切酶处理, PCR 扩增目的基因条带, 结果如图 2A 所示, 核酸凝胶电泳验证条带大小在 1 000–1 500 bp 之间, 符合目的基因条带大小。抽提质粒进行测序, 测序结果与 NCBI 中的人源 *ALG1* 基因序列比对, 确认 pET28a-His6-*HsAlg1* 和 pET28a-His6-*HsAlg1*_{23–464} 质粒无碱基错配并构建成功。

将上述成功构建的重组质粒导入表达菌株 Rosetta(DE3)中, 诱导后的 *HsAlg1* (55.9 kDa) 和 *HsAlg1*_{23–464} (50.1 kDa) 重组蛋白利用免疫印迹法检测表达结果。结果如图 2B 所示, 加入 IPTG 的 *HsAlg1* 和 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白均成功表达, 免疫印迹显示的条带大小与理论分子量一致。作为膜蛋白的 *HsAlg1* 在破碎离心时主要存在于沉淀之中, 虽然 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白截除了 N 端含有 22 个氨基酸的 TMD, 但由于 50–200 位的氨基酸序列仍含有多个膜结合区域, 在破碎离心时也大量存在于沉淀之中。

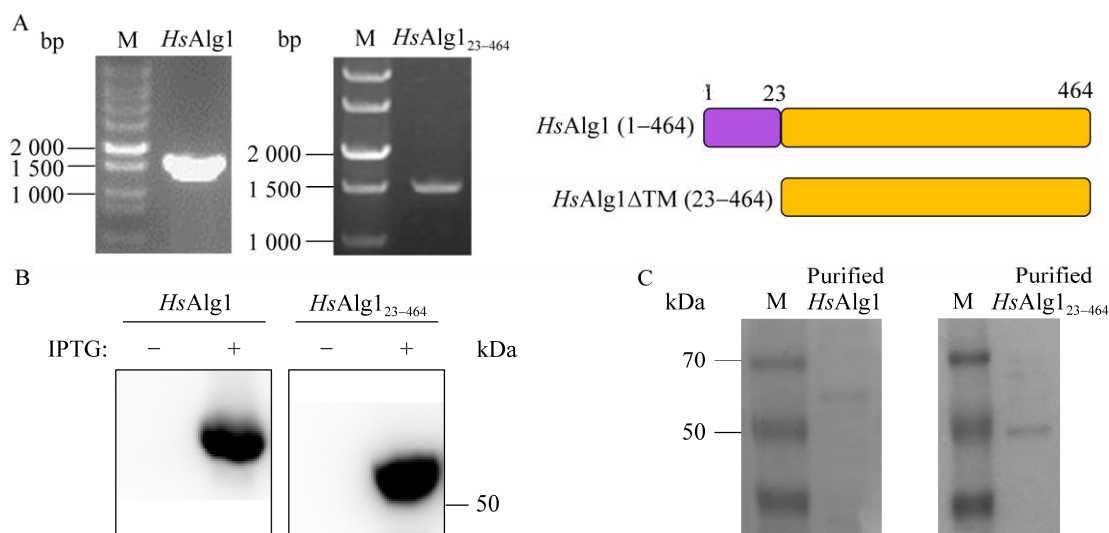


图 2 糖基转移酶 *HsAlg1* 和 *HsAlg1*_{23–464} 的表达和纯化 A: PCR 扩增结果(M: DNA marker); B: 诱导表达蛋白的 Western blotting 结果; C: 纯化蛋白的 SDS-PAGE 结果(M: Protein marker)。“–”为未加入 IPTG 诱导; “+”为加入 IPTG 诱导。

Figure 2 Expression and purification of *HsAlg1* and *HsAlg1*_{23–464}. A: PCR amplification results (M: DNA marker); B: Western blotting result of induced protein expression; C: SDS-PAGE result of protein purification (M: Protein marker). “–” represents without IPTG induction; “+” represents with IPTG induction.

图 2C 显示了重组蛋白的纯化结果, *HsAlg1* 在 Rosetta(DE3) 中表达量较低, 为了表达更多蛋白, 用 3 L TBK (Kan^+) 液体培养基扩大培养, SDS-PAGE 检测纯化后的浓缩液, 在 50–70 kDa 之间发现 1 条与理论分子量相符的条带, 但纯化后的条带并不单一纯净, 如图 2C 左侧所示。相比之下, *HsAlg1*_{23–464} 蛋白表达量较高, 对含有 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白的 250 mmol/L 咪唑洗脱液进行浓缩处理, SDS-PAGE 检测的条带单一纯净, 如图 2C 右侧所示, 产量约 1.75 mg/100 mL 培养基。

2.2 半定量分析重组蛋白的活性蛋白表达量

HsAlg1 和 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白的活性检测结果显示, 纯化后的重组蛋白均未展现活性, 因此后续采用重组蛋白的粗酶进行活性检测。图 3A 显示了重组蛋白 *HsAlg1* 和 *HsAlg1*_{23–464} 的总蛋白和活性蛋白表达量, 2 个重组蛋白的表达量不均一, 其中 *HsAlg1*_{23–464} 活性蛋白表达量较高。使用半定量分析方法计算 2 个重组蛋白的活性蛋白表达量, 为了后续能够在相同的蛋白浓度条件下对比 2 个粗酶的活性(图 3B)。

外源基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中高水平表达时, 通常会形成包涵体, 包涵体是由膜包裹的高密度、不溶性蛋白质颗粒, 其分子量与正常蛋白大小一致, 但不具备生物学活性^[24]。从图 3A 左侧可以看出, 在泳道 1 和泳道 2 中发现 *HsAlg1* 可溶蛋白的特异性条带, 泳道 3 中没有条带显示, 说明 *HsAlg1* 蛋白在表达过程中没有包涵体的生成; 图 3A 右侧可以看出, *HsAlg1*_{23–464} 蛋白 3 个泳道中都有条带显示, 说明 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白在表达过程中有包涵体的生成, 并且通过计算分析, 包涵体占总蛋白的 45.5%。主要原因是截除 N 端 TMD 的 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白大量表达, 使蛋白没有充足的时间进行折

叠, 从而产生除功能性蛋白外的包涵体。

图 3B 展示了 *Alg1* 重组蛋白粗酶表达量的半定量分析结果, 用免疫印迹方法分别检测目标蛋白和参照蛋白的表达量。在 *HsAlg1* 粗酶表达量的分析中, 将 GalT 蛋白作为参照蛋白稀释成 6 个不同梯度, 利用 Tanon Image 软件分析蛋白条带密度, 绘制 GalT 蛋白条带密度和其稀释浓度的线性曲线, 计算得到 *HsAlg1* 蛋白的浓度为 22 $\mu\text{g/mL}$, 是 GalT 蛋白量的 1/261。同样, 在 *HsAlg1*_{23–464} 活性蛋白表达量的分析中, 将 *HsAlg1* 蛋白作为参照蛋白, 半定量结果显示 *HsAlg1*_{23–464} 活性蛋白的浓度为 900 $\mu\text{g/mL}$, 是 *HsAlg1* 蛋白量的 41 倍。

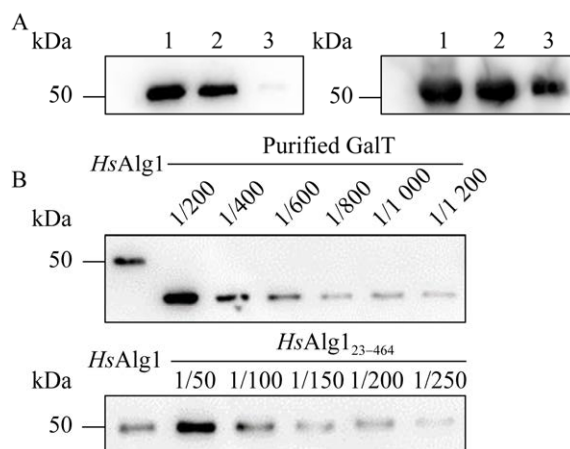


图 3 免疫印迹检测 *Alg1* 重组蛋白的表达水平 A: 重组蛋白表达及其活性蛋白的检测。左图为 *HsAlg1* 蛋白表达的免疫印迹; 右图为 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白表达的免疫印迹; 泳道 1 为总蛋白; 泳道 2 为活性蛋白; 泳道 3 为包涵体。B: 活性蛋白表达量的半定量分析。

Figure 3 Detection of *Alg1* recombinant protein expression levels by Western blotting. A: Detection of recombinant protein expression and active protein. Left panel represents the Western blotting for *HsAlg1* expression; Right panel represents the Western blotting for *HsAlg1*_{23–464} expression; Lane 1 represents total protein; Lane 2 represents active protein; Lane 3 represents inclusion bodies. B: Semi-quantitative analysis of active protein expression levels.

2.3 重组蛋白 *HsAlg1* 的活性检测

人体多萜醇 DPGn2 由 17-21 个异戊二烯单元构成^[25], 为了制备与人体长度相同的脂肪链, 本研究从银杏叶中分离纯化得到 90C 和 95C 长的聚戊烯醇。以聚戊烯醇和全乙酰壳二糖为底

物, 通过 6 步化学反应, 得到与人体结构一致和长度相同的 *S*-构型 DPGn2 (图 4A), 为重组蛋白 *HsAlg1* 和 *HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ 的活性检测提供底物。图 4B 为重组蛋白 *HsAlg1* 以 DPGn2 为底物检测其相对活性的操作示意图。

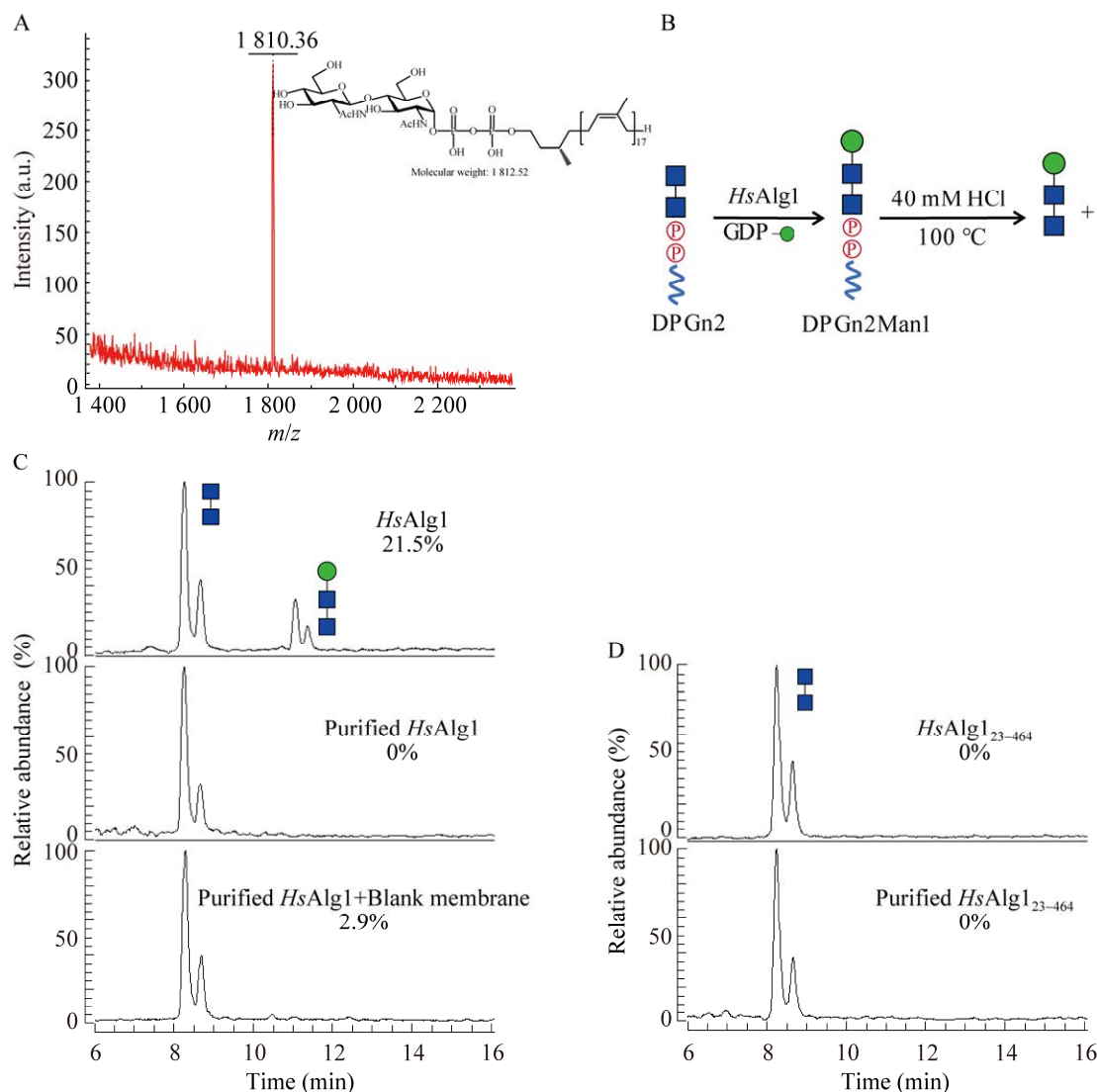


图 4 LC-MS 定量分析糖基转移酶 Alg1 活性 A: 底物 DPGn2 的基质辅助激光解吸 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 分析结果; B: Alg1 蛋白活性检测的反应流程图; C: LC-MS 检测重组蛋白 *HsAlg1* 的转化率; D: LC-MS 检测重组蛋白 *HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ 的转化率。

Figure 4 LC-MS analysis to quantify Alg1 activity. A: Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) analysis result of DPGn2; B: Reaction flowchart for detecting Alg1 protein activity; C: Conversion rate detection of recombinant protein *HsAlg1* using LC-MS; D: Conversion rate detection of recombinant protein *HsAlg1*₂₃₋₄₆₄ using LC-MS.

运用 LC-MS 方法检测酶促体系反应后的底物 Gn2 和产物 Gn2Man1 的含量。图 4C 展示了重组蛋白 *HsAlg1* 粗酶反应 3.5 h 后的转化结果,其底物的出峰时间为 8–9 min,产物的出峰时间为 11–12 min,通过对底物和产物的峰面积计算发现,在未优化反应体系的情况下,*HsAlg1* 粗酶的转化率能达到 21.5%。为了排除蛋白表达中其他组分的干扰,本研究还采用纯化后的重组蛋白 *HsAlg1* 进行活性检测,反应条件一致,但 LC-MS 结果中没有检测到底物 Gn2Man1 的生成,转化率从 21.5%降为 0,纯化后的重组蛋白 *HsAlg1* 反应活性丧失(图 4C)。为了探究纯化后 *HsAlg1* 蛋白活性丧失的原因,在此反应条件上添加未携带外源基因的 *E. coli* 膜组分,转化率从 0 提升至 2.9%,活性得到部分恢复,但未能达到粗酶原有的活性水平。

2.4 重组蛋白 *HsAlg1*_{23–464} 的活性研究

截除跨膜结构域的 *ScAlg1* 具有较高的活性和较强的稳定性^[16]。为了方便后续对重组蛋白 *HsAlg1* 的纯化,减小反应条件带来的误差,本研究构建了截除 N 端跨膜域的重组质粒 pET28a-*HsAlg1*_{23–464},通过表达和纯化获得重组蛋白 *HsAlg1*_{23–464}。检测底物、方法和流程与重组蛋白 *HsAlg1* 一致,利用 LC-MS 检测 *HsAlg1*_{23–464} 转化率并分析其活性。

图 4D 展示的为纯化后的重组蛋白 *HsAlg1*_{23–464} 转化率,在 LC-MS 结果中没有检测到底物 Gn2Man1 的生成,转化率为 0,纯化后的重组蛋白 *HsAlg1*_{23–464} 不具有活性。为了排除是纯化原因导致重组蛋白 *HsAlg1*_{23–464} 丧失活性,检测重组蛋白 *HsAlg1*_{23–464} 粗酶的转化率,在半定量分析中,2 个粗酶活性蛋白浓度表达量不一致,为了保持反应条件一致,粗酶 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白浓度稀释为原来的 1/41,其 LC-MS 结果仍未检测到底物 Gn2Man1 的生成,转化率为 0 (图 4D)。

综上所述,重组蛋白 *HsAlg1*_{23–464} 不具有活性。

3 讨论与结论

为了深入研究 *HsAlg1* 蛋白的表达及其活性的检测,本研究利用 LC-MS 技术在体外定量检测 *HsAlg1* 蛋白活性,然而面临两大挑战:一是底物 DPGn2 的合成,二是 *HsAlg1* 蛋白的体外表达与定量检测。在 DPGn2 的合成方面,本研究应用陈征辉等^[21]开发的化学合成法,合成与天然底物结构一样的 DPGn2,用于 *HsAlg1* 的活性检测。在未优化酶促反应条件的情况下,*HsAlg1* 的粗酶能将 DPGn2 转化为 DPGn2Man1,转化率达到 21.5%,这显示出大肠杆菌表达得到的 *HsAlg1* 蛋白在体外酶活性检测中的应用潜力。

除了全长的 *HsAlg1* 外,本研究还构建了截除跨膜结构域的重组质粒 pET28a-His6-*HsAlg1*_{23–464},以期提高蛋白的体外纯化效率。然而,表达量分析发现虽然 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白的表达量比 *HsAlg1* 显著提升,但其中近半数为包涵体,不具有蛋白活性。进一步对纯化后的 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白及其粗酶进行转化率分析,在 LC-MS 结果中均未检测到产物 Gn2Man1 的生成,这一结果显示跨膜结构域对 *HsAlg1* 蛋白在底物识别过程中具有重要作用。此外,还对纯化后的 *HsAlg1* 蛋白进行了活性检测分析,同样在其 LC-MS 结果中未发现产物 Gn2Man1 的生成。在纯化的 *HsAlg1* 蛋白反应体系中添加膜组分后,观察到反应转化率从 0 提升至 2.9%,表明膜组分的加入对 *HsAlg1* 蛋白活性有一定的恢复作用,但提升幅度相对有限。

综上所述,本研究表达并检测了 *HsAlg1* 和 *HsAlg1*_{23–464} 蛋白活性,发现 *HsAlg1* 蛋白跨膜结构域的存在对维持其活性和功能中起重要作用。由于膜蛋白的结构解析面临多方面的困

难,导致膜蛋白的结构数据在 Protein Data Bank 数据库中相对较少,仅占不到 1%的比例。本研究为以后解析 Alg1 膜蛋白的结构与功能提供了参考,同时也为深入研究 ALG1-CDG 疾病的发病机制以及开发潜在的治疗策略奠定了基础。

作者贡献声明

魏东芝:实验操作、初稿写作、稿件润色修改;陈征辉:数据管理、方案设计、实验操作;王春迪:方案设计、提供材料;高晓冬:监督指导、经费支持;王宁:方案设计、监督指导、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] RAMAZI S, ZAHIRI J. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods[J]. Database, 2021, 2021: baab012.
- [2] ZHANG SJ, ZHU RW, PAN BY, XU H, OLUFEMI MF, GATHAGAN RJ, LI YX, ZHANG LY, ZHANG J, XIANG WX, KAGAN EM, CAO XJ, YUAN CX, KIM SJ, WILLIAMS CK, MAGAKI S, VINTERS HV, LASHUEL HA, GARCIA BA, PETERSSON EJ, et al. Post-translational modifications of soluble α -synuclein regulate the amplification of pathological α -synuclein[J]. Nature Neuroscience, 2023, 26(2): 213-225.
- [3] NEGANOVA ME, KLOCHKOV SG, ALEKSANDROVA YR, ALIEV G. Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: perspectives and achieved progress[J]. Seminars in Cancer Biology, 2022, 83: 452-471.
- [4] BAGDONAITE I, MALAKER SA, POLASKY DA, RILEY NM, SCHJOLDAGER K, VAKHRUSHEV SY, HALIM A, AOKI-KINOSHITA KF, NESVIZHSKII AI, BERTOZZI CR, WANDALL HH, PARKER BL, THAYSEN-ANDERSEN M, SCOTT NE. Glycoproteomics[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2022, 2(1): 48.
- [5] MOREMEN KW, TIEMEYER M, NAIRN AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012, 13(7): 448-462.
- [6] SUN SS, HU YW, AO MH, SHAH P, CHEN J, YANG WM, JIA XW, TIAN Y, THOMAS S, ZHANG H. N-GlycositeAtlas: a database resource for mass spectrometry-based human N-linked glycoprotein and glycosylation site mapping[J]. Clinical Proteomics, 2019, 16: 35.
- [7] CAIN JA, DALE AL, NIEWOLD P, KLARE WP, MAN L, WHITE MY, SCOTT NE, CORDWELL SJ. Proteomics reveals multiple phenotypes associated with N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni*[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2019, 18(4): 715-734.
- [8] 谭亚红, 高利娟, 宋文霞, 卢雪梅. 原核生物蛋白质 N-糖基化修饰的研究进展[J]. 生物学杂志, 2022, 39(5): 87-92.
TAN YH, GAO LJ, SONG WX, LU XM. Research progress of protein N-glycosylation modification in prokaryotes[J]. Journal of Biology, 2022, 39(5): 87-92 (in Chinese).
- [9] HIRATA T, KIZUKA Y. N-glycosylation[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2021, 1325: 3-24.
- [10] HARADA Y, OHKAWA Y, MAEDA K, TANIGUCHI N. Glycan quality control in and out of the endoplasmic reticulum of mammalian cells[J]. The FEBS Journal, 2022, 289(22): 7147-7162.
- [11] JONES MB, ROSENBERG JN, BETENBAUGH MJ, KRAG SS. Structure and synthesis of polyisoprenoids used in N-glycosylation across the three domains of life[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1790(6): 485-494.
- [12] AEBI M. N-linked protein glycosylation in the ER[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1833(11): 2430-2437.
- [13] GAO XD, NISHIKAWA A, DEAN N. Physical interactions between the Alg1, Alg2, and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum[J]. Glycobiology, 2004, 14(6): 559-570.
- [14] SCHWARZ M, THIEL C, LÜBBEHUSEN J, DORLAND B, de KONING T, von FIGURA K, LEHLE L, KÖRNER C. Deficiency of GDP-Man:GlcNAc₂-PP-dolichol mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ik[J]. American Journal of Human Genetics, 2004, 74(3): 472-481.
- [15] KRANZ C, DENECKE J, LEHLE L, SOHLBACH K, JESKE S, MEINHARDT F, ROSSI R, GUDOWIUS S, MARQUARDT T. Congenital disorder of glycosylation type Ik (CDG-Ik): a defect of mannosyltransferase I[J]. American Journal of Human Genetics, 2004, 74(3): 545-551.
- [16] LI ST, WANG N, XU S, YIN J, NAKANISHI H, DEAN N, GAO XD. Quantitative study of yeast Alg1 beta-1,4 mannosyltransferase activity, a key enzyme involved in protein N-glycosylation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2017, 1861(1 Pt A): 2934-2941.
- [17] DHAMIJA R, CHAMBERS C. Clinical and molecular characterization of ALG1-CDG[J]. Pediatric Neurology Briefs, 2016, 30(2): 14.
- [18] GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ CA, FIESCO-ROA MO, GÓMEZ-CARMONA S, KLEINERT-ALTAMIRANO API, HE M, DANIEL EJP, RAYMOND KM, ABREU-GONZÁLEZ M, MANRIQUE-HERNÁNDEZ S, GONZÁLEZ-JAÍMES A, SALINAS-MARÍN R,

- MOLINA-GARAY C, CARRILLO-SÁNCHEZ K, FLORES-LAGUNES LL, JIMÉNEZ-OLIVARES M, MUÑOZ-RIVAS A, CRUZ-MUÑOZ ME, RUÍZ-GARCÍA M, FREEZE HH, MORA-MONTES HM, et al. ALG1-CDG caused by non-functional alternative splicing involving a novel pathogenic complex allele[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 744884.
- [19] BURGOS J, HEMMING FW, PENNOCK JF, MORTON RA. Dolichol: a naturally-occurring c100 isoprenoid alcohol[J]. *Biochemical Journal*, 1963, 88(3): 470-482.
- [20] ABSMANNER B, SCHMEISER V, KÄMPF M, LEHLE L. Biochemical characterization, membrane association and identification of amino acids essential for the function of Alg11 from *Saccharomyces cerevisiae*, an α 1,2-mannosyltransferase catalysing two sequential glycosylation steps in the formation of the lipid-linked core oligosaccharide[J]. *Biochemical Journal*, 2010, 426(2): 205-217.
- [21] 陈征辉, 晁强, 高晓冬, 王宁. 多萜醇 N,N'-二乙酰壳二糖的合成[J]. *化学世界*, 2021, 62(8): 473-478.
CHEN ZH, CHAO Q, GAO XD, WANG N. Synthesis of the dolichol linked N,N'-diacetylchitobiose[J]. *Chemical World*, 2021, 62(8): 473-478 (in Chinese).
- [22] WANG N, LI ST, XIANG MH, GAO XD. Alg mannosyltransferases: from functional and structural analyses to the lipid-linked oligosaccharide pathway reconstitution[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*, 2022, 1866(5): 130112.
- [23] 栗瑞杰, 胡芸, 尚尔菲, 高晓冬, 王宁. 多萜醇磷酸 β -葡萄糖基转移酶的活性和底物特异性分析[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(6): 1833-1844.
LI RJ, HU Y, SHANG EF, GAO XD, WANG N. Analysis of enzyme activity and substrate specificity of dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(6): 1833-1844 (in Chinese).
- [24] 方敏, 黄华. 包涵体蛋白体外复性的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(6): 5.
FANG M, HUANG H. Advances in *in vitro* refolding of inclusion body proteins[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(6): 5 (in Chinese).
- [25] PENNOCK JF, HEMMING FW, MORTON RA. Dolichol: a naturally occurring isoprenoid alcohol[J]. *Nature*, 1960, 186: 470-472.