

真菌 N-糖基化系统在异源表达中的研究进展

陈天铭¹, 曾斌^{*1,2}

1 江西科技师范大学生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室, 江西 南昌 330013

2 深圳技术大学药学院, 广东 深圳 518118

陈天铭, 曾斌. 真菌 N-糖基化系统在异源表达中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3420-3434

Chen Tianming, Zeng Bin. Research progress of the fungal N-glycosylation system in heterologous expression[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3420-3434

摘要: 在近 20 年来, 越来越多的真菌被开发成异源蛋白表达宿主, 用来生产各种药用蛋白和酶类。随着对真菌异源表达系统的研究, 人们也渐渐意识到真菌 N-糖基化系统与高等动物的 N-糖基化系统有着明显的区别, 这也成为真菌生产高等动物源性糖蛋白的一个技术瓶颈。本文综述了真菌在异源表达糖蛋白工程中其 N-糖基化系统的研究进展。包括 N-糖基的检测技术和改造策略, 并重点介绍了真菌 N-糖基化系统与高等动物的 N-糖基化系统的差异, 以期为日后真菌 N-糖基化系统动物源化甚至人源化改造提供参考。

关键词: 真菌; 异源表达; 糖蛋白; N-糖基化

Research progress of the fungal N-glycosylation system in heterologous expression

CHEN Tianming¹, ZENG Bin^{*1,2}

1 Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess Engineering, College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

2 College of Pharmacy, Shenzhen Technology University, Shenzhen 518118, Guangdong, China

Abstract: Increasing fungi have been developed as hosts of heterologous expression for the production of pharmaceutical proteins and enzymes in the last two decades. With the deepening research on the heterologous expression systems of fungi, people have gradually understood that the fungal N-glycosylation system is visibly different from that of higher animals, which has become a technological

基金项目: 江西省技术创新引导类计划“一带一路”一般项目(20202BDH80007); 国家重点研发计划(2021YFA1301302)

Supported by: Technology Innovation Guidance Program “the Belt and Road” General Project of Jiangxi Province (20202BDH80007); National Key Research and Development Program of China (2021YFA1301302)

*Corresponding author: E-mail: Zengtx001@aliyun.com

Received: 2021-12-17; Accepted: 2022-01-29; Published online: 2022-03-31

obstacle for fungi to produce higher animal-derived glycoproteins. This paper reviews the research progress of fungal N-glycosylation system in heterologous expression. Specifically, we introduced the detection techniques and transformation strategies of N-glycosylation in fungi, and compared the N-glycosylation system between fungi and higher animals, aiming to provide reference for the animalization and even humanization of fungal N-glycosylation system in the future.

Keywords: fungi; heterologous expression; glycoproteins; N-glycosylation

真菌在食品发酵业、产酶工业等领域已经被广泛使用多年,如酿酒酵母、毕赤酵母、米曲霉等在工业发酵中不仅安全性较高、发酵成本较低,而且具有非常高的蛋白表达和分泌能力^[1-4]。与原核表达系统相比,真菌又拥有更完整的翻译后修饰系统,如糖基化、二硫键形成和寡聚,这些通常对蛋白质活性和功能至关重要。近年来,越来越多的真菌逐渐被开发成可

靠且高效的异源表达宿主(表 1)。然而,随着真菌异源表达系统的不断开发和使用,人们发现真菌 N-糖基化系统通常无法将翻译的异源蛋白前体加工成有活性的糖蛋白。目前大部分高等动物的糖蛋白都需要正确的 N-糖基化才能保证正确地折叠,从而获得正常的功能和活性:如人因子 VIII (factor VIII, FVIII) 上有多个 N-糖基化位点,对任意一个糖基化位点进行突变后均会

表 1 以真菌作为宿主生产的异源蛋白

Table 1 Heterologous proteins produced by fungi as hosts

菌株	异源蛋白	基因供体	表达量	参考文献
Strains	Heterologous proteins	Gene donors	Yield (mg/L)	References
<i>A. nidulans</i>	IL6	<i>Homo sapiens</i>	5	[5]
<i>A. sojae</i>	IL6	<i>Homo sapiens</i>	300	[6]
<i>T. reesei</i>	Cellobiose dehydrogenase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	150	[7]
	Thermophilic xylanase B	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	200-1 000	[8]
<i>A. niger</i>	Manganese peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	100	[9]
	Erythropoietin	<i>Homo sapiens</i>	1.8	[10]
<i>A. oryzae</i>	Chymosin	<i>Bos taurus</i>	156.1	[11]
	Anti-EGFR VHH	<i>Lama glama</i>	73.8	[12]
	Lysozyme	<i>Homo sapiens</i>	24.6	[13]
<i>Y. lipolytica</i>	Human interferon α 2b	<i>Homo sapiens</i>	1 483	[14]
	Cytochrome P450sc	<i>Homo sapiens</i>	-	[15]
<i>S. cerevisiae</i>	GM-CSF	<i>Homo sapiens</i>	285	[16]
	hirudin	<i>Hirudo</i>	40-500	[17]
	Insulin	<i>Homo sapiens</i>	-	[18]
<i>H. polymorpha</i>	HPV type 16 L1-L2 chimeric protein	<i>human papilloma virus</i>	132.1	[19]
	Lipase	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2 700	[20]
	IGF-1	<i>Homo sapiens</i>	-	[21]
<i>P. pastoris</i>	Endoxanthanase	<i>Microbacterium</i>	501.12	[22]
	Single-chain variable fragments (ScFv)	<i>Homo sapiens</i>	-	[23]
	Anti-CH2	<i>Homo sapiens</i>	150	[24]
	GH78- α -1-rhamnosidase	<i>Aspergillus terreus</i>	-	[25]

注: -: 文中未标明产量或产量未以质量浓度(mg/L)表示

Note: -: The yield is not indicated in the reference or that the yield is not expressed in mass concentration (mg/L).

导致 FVIII 的表达量和活性降低^[26]。尽管真菌也具有 N-糖基化系统,但是真菌的 N-聚糖的结构与高等动物并不完全相同,比如酵母中的 N-糖基是由多达几十个甘露聚糖的主干组成的高聚甘露糖结构(图 1A),而在高等动物中有功能的 N-聚糖则主要为低聚糖基(图 1B、1C),杂合型和复合型的 N-聚糖可以带两个或多个含 GlcNAc 的分支结构,这种分支结构被称为外链^[27]。在形成多外链的 N-聚糖结构时, GlcNAc 残基可以通过不同的 GlcNAc 转移酶连接到三甘露糖基。带有高聚甘露糖结构的糖蛋白在人体中会与人的甘露糖受体相互作用,导致重组蛋白在人体血液中被迅速清除,此外它们还可以引起人体的免疫原性反应,这些现象都不利于将其作为使用于人体内的药用蛋白^[28-29]。为了将真菌作为高等动物糖蛋白的高效表达宿主,就需要对真菌和高等动物的 N-糖基化进行研究且开发对应的策略。

1 N-聚糖的鉴定策略

蛋白质的 N-糖基化是一种重要的蛋白质翻

译后修饰,这种修饰主要发生在蛋白质特定的氨基酸序列(Asn-X-Ser/Thr)上,这里的 X 指非脯氨酸的任意氨基酸,而连接在该序列中 Asn 上的糖链则称为 N-聚糖^[30]。然而对 N-聚糖结构以及修饰位点的鉴定与分析是研究蛋白 N-糖基化的基础。

1.1 核磁共振氢谱

早期用来鉴定 N-聚糖结构的技术主要为核磁共振氢谱(H NMR), Gleeson 等在研究小仓鼠肾细胞抗蓖麻毒素突变体的 N-聚糖结构时,通过使用 500-MHz H NMR 成功鉴定出高甘露糖型和杂合型的 N-聚糖^[31]。随后更多的科学家通过不同频率的 H NMR 分析大量的动物与植物的 N-聚糖,并根据 N-聚糖的结构将其分为三种基本型:高甘露糖型(high mannose)、复合型(complex)、杂合型(hybrid)^[32-34]。通过核磁共振氢谱技术制定的分型标准为后续 N-聚糖的检测鉴定提供了便利。

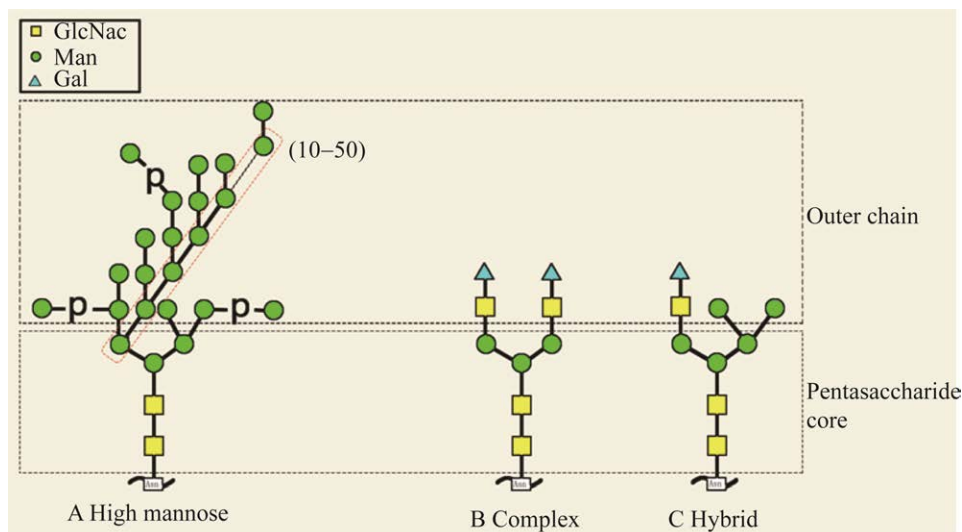


图 1 不同的 N-聚糖结构 A: 真菌中的高聚甘露糖结构; B: 动物中的低聚的复合型 N-聚糖; C: 动物中的低聚的杂合型 N-聚糖

Figure 1 Different N-glycan structures. A: High mannose structure in fungi; B: Oligomeric complex N-glycans in animals; C: Oligomeric heterozygous N-glycans in animals.

1.2 基于质谱技术的复合方案

质谱技术是目前用来鉴定 N-聚糖最广泛和常用的技术, 其具有速度快、灵敏度高、对混合结构识别能力强等优点, 大部分的 N-聚糖鉴定策略都是以质谱作为核心工具^[35]。即使在 2021 年, 质谱技术依旧是主流的 N-聚糖检测技术, De MA Coura 等通过 LC/MS 技术和 MALDI-TOF/MS 技术的联合使用, 鉴定结肠癌患者血清和组织中的差异 N-聚糖成分^[36]。而使用单个质谱方案进行分析通常不能满足检测需求, 比如使用电喷雾电离质谱(ESI-MS)对 N-聚糖进行分析时, 在制样过程中特别容易混入样品添加剂或各种缓冲液, 从而对 ESI-MS 的检测造成干扰, 因此在使用 ESI-MS 时通常会同时使用高效液相(HPLC)、毛细管电泳(CE)等分离技术来制备样品^[37-38]。高伟娜等利用多种分离和检测方法集成 LC-Chip-ESI-QTOF-MS 技术对 IgG 唾液酸聚糖结构进行了鉴定和分析, 通过使用石墨芯片和液相处理样品, 成功分离并检测到 IgG 上 29 种唾液酸聚糖; 而 Zhang 等则通过使用电子转移/高能碰撞解离(ETcD)和阶梯式碰撞能量/高能碰撞解离(sceHCD)组合质谱(ETcD-sceHCD-MS/MS)对慢性肾病患者血浆 IgG 完整的 N-糖肽进行组合分析, 成功检测到 N-糖肽在健康人群与糖尿病患者中差异表达, 可见通过多种分离技术和质谱组合, 通常能得到更加精确的结果^[39-40]。

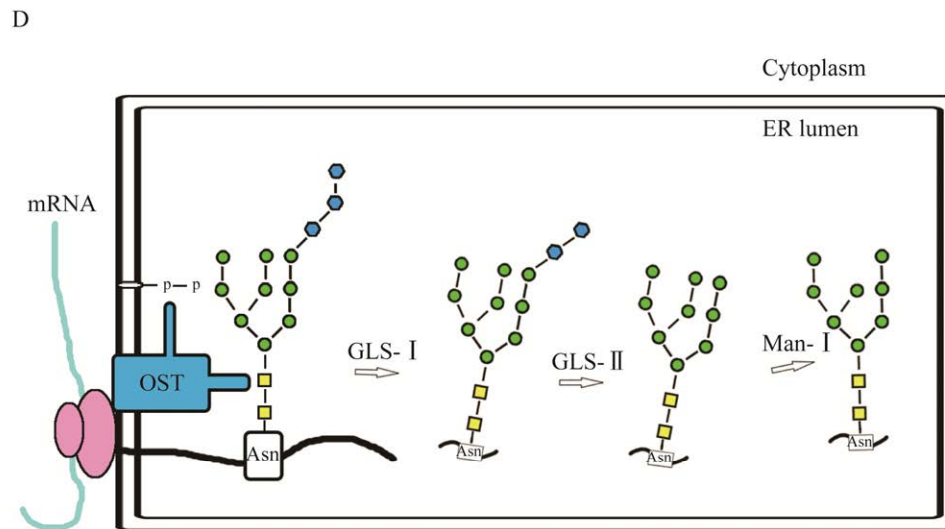
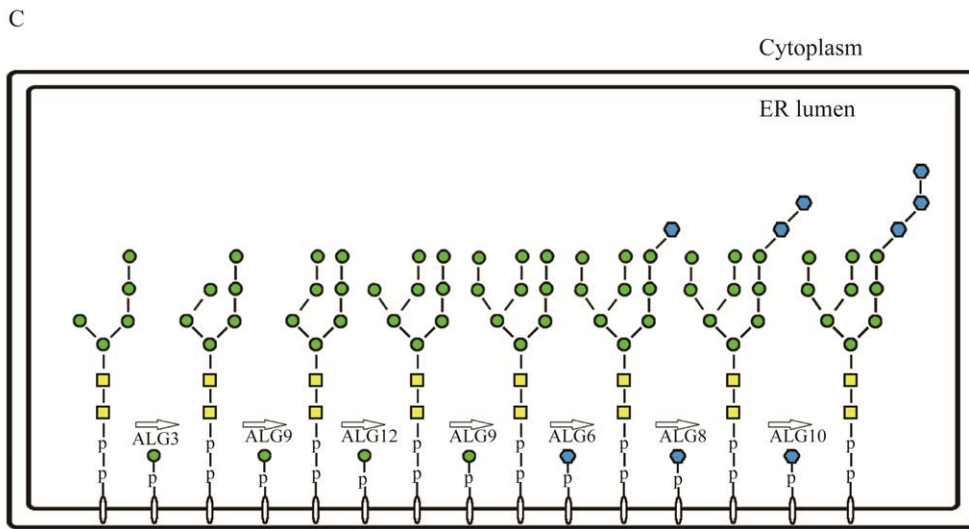
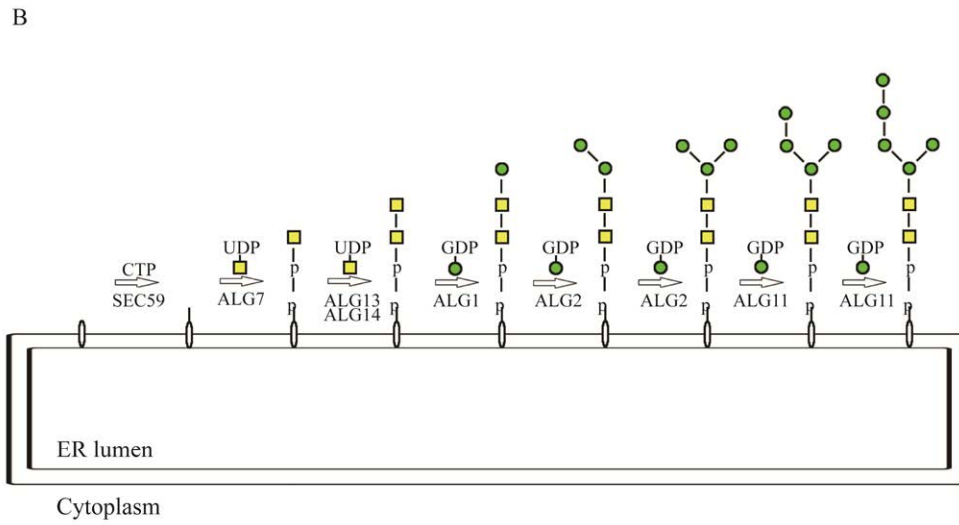
质谱分析前分离技术的发展很大程度上解决了质谱分析样品制备的困难, 但还是无法解决传统的质谱分析的局限性。质谱分析可以得到聚糖对应残基的数目, 但却无法区分同分异构体, 而且为了提高分析的精度和效果, 进行质谱分析前几乎都需要将 N-聚糖从糖蛋白上分离出来, 因此会造成与 N-聚糖连接的蛋白结构及其糖基化位点信息的丢失^[41-44]。为了得到整个

N-糖基化糖蛋白的结构信息, 很多能够完整分析糖蛋白的软件被开发出来, 例如 Byonic, GPQuest 和 pGlyco2.0 以及最近发表的 MSFragger-Glyco, 这类软件大多数都是基于庞大的聚糖数据库来计算聚糖的结构, 从而能够揭示位点特异性糖基化的微观异质性, 但这类软件目前主要的局限在于缺乏完善的糖基数据库, 因此只能解释部分聚糖的组成, 依旧无法识别功能性聚糖结构和同分异构体^[45-48]。Shen 等针对上述问题开发了基于模块化策略的 StrucGP, 对糖蛋白上位点特异性 N-聚糖进行从头结构测序, 从而区分聚糖组成中的同分异构体, 还能识别新的聚糖结构^[49]。

2 N-聚糖的合成通路

2.1 Asn-GlcNAc₂Man₈ 复合体的合成

真菌和人的 N-糖基化初始阶段的基本相同, 首先在内质网膜的细胞质侧以磷酸多萜醇(Dol-P)、2 个 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)和 5 个甘露糖(mannose, Man)残基为主要原料, 逐步合成 Dol-PP-GlcNAc₂Man₅ (图2A); 随后 Dol-PP-GlcNAc₂Man₅ 被转移到内质网膜管腔侧, 在 α -1,3-甘露糖基转移酶的催化下继续添加 4 个 Man 得到 Dol-PP-GlcNAc₂Man₉; 最后再通过 α -1,3-葡萄糖基转移酶依次添加 3 个葡萄糖(glucose, Glc)得到多萜醇寡聚糖前体(Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃) (图2B)^[50]。寡糖基转移酶(OST)是一个由多亚基组成的跨膜蛋白, 在内质网膜内有 1-8 个跨膜结构域, 能结合多萜醇寡聚糖前体并切断 P-GlcNAc 之间的高能键, 从而将 GlcNAc₂Man₉Glc₃ 转移到 Asn-X-Ser/Thr 序列的天冬酰胺残基上并释放 Dol-PP^[51]。当 GlcNAc₂Man₉Glc₃ 与多肽链的 N-糖基化位点(Asn)结合后, 葡萄糖苷酶 I (GLS-I)和葡萄糖苷酶 II (GLS-II)依次剪切掉外链中的 3 个葡萄糖基, 再通过甘露糖苷酶 I (Man-I)去除末端的 α -1,2 甘露



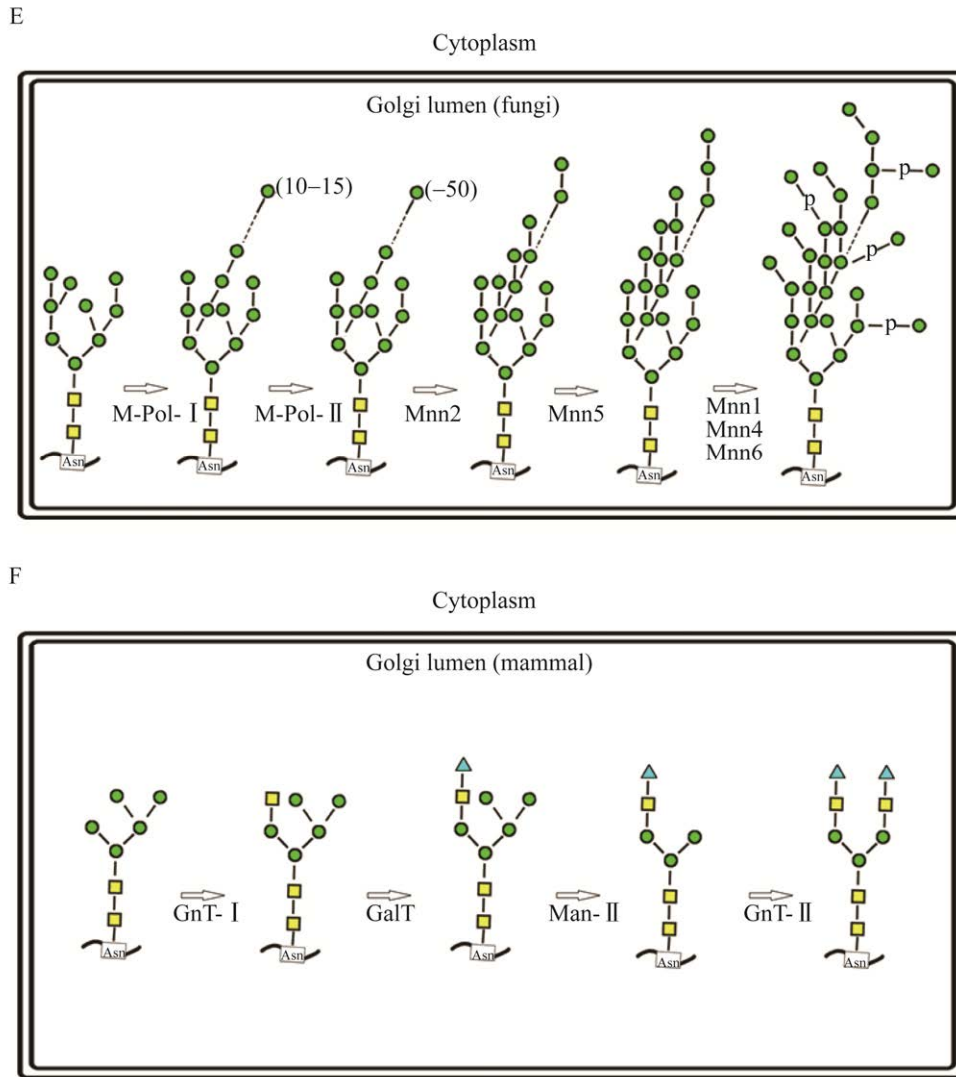


图2 N-聚糖的合成 A: 真菌与哺乳动物糖蛋白N-糖基化通路总图; B: Dol-PP-GlcNAc₂Man₅在内质网外膜上合成; C: Dol-PP-GlcNAc₂Man₅转入内质网内膜中逐步合成 Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃; D: 寡糖基转移酶(OST)将 GlcNAc₂Man₉Glc₃ 转移到 Asn-X-Ser/Thr 序列的天冬酰胺残基上形成 Asn-GlcNAc₂Man₉, 再逐步修剪成 Asn-GlcNAc₂Man₈ 并离开内质网; E: Asn-GlcNAc₂Man₈ 在真菌高尔基体中合成高聚甘露糖结构; F: Asn-GlcNAc₂Man₈ 在高等动物高尔基体中合成复合型或杂合型的低聚 N-聚糖结构

Figure 2 Synthesis of the N-glycans. A: N-glycosylation of glycoproteins in fungi and mammals. B: Dol-PP-GlcNAc₂Man₅ was synthesized on the outer membrane of endoplasmic reticulum. C: Dol-PP-GlcNAc₂Man₅ was transferred into endoplasmic reticulum intima to gradually synthesise; D: Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ Oligosaccharide transferase (OST) attaches GlcNAc₂Man₉Glc₃ to the asparagine residue of the Asn-X-Ser/Thr sequence to create Asn-GlcNAc₂Man₉, which is subsequently pruned to Asn-GlcNAc₂Man₈ and exits the endoplasmic reticulum; E: Asn-GlcNAc₂Man₈ synthesized high mannose structure in fungal Golgi; F: Asn-GlcNAc₂Man₈ synthesized complex or heterozygous oligomeric N-glycan structures in higher animal Golgi matrix.

2.2 高等动物的 N-聚糖多样性的形成

高等动物的 N-聚糖具有多样性, 即使同一个体同一种糖蛋白的同一个 N-糖基化部位也可能存在不同结构的 N-聚糖, 这个现象被称为微观不均一性, 但是其起始物质都起源于 Asn-GlcNAc₂Man₅^[55]。高等动物在生成 Asn-GlcNAc₂Man₈后会被一些 α -1,2-甘露糖苷酶进一步修剪。通常先由甘露糖苷酶 I (Man-I) 去除 3 个末端 Man 基团生成 Asn-GlcNAc₂Man₅; 其中部分 N-聚糖通过 GlcNAc 转移酶 I (GnT-I) 添加 β -1,2-GlcNAc 进行修饰得到杂合型(hybrid) N-聚糖; 而杂合型 N-聚糖则可以再通过甘露糖苷酶 II (Man-II) 去除两个 Man 基团并在 GlcNAc 转移酶 II (GnT-II) 的催化下添加第 2 个 β -1,2-GlcNAc (图 2E); 这种 α -3 和 α -6 核心甘露糖残基都被 GlcNAc 所取代的 N-聚糖则被称为复合型(complex) N-聚糖; 杂合型的 N-聚糖和复合型的 N-聚糖都有不同的通路进行继续修饰, 比如可以通过半乳糖转移酶(GalT)添加半乳糖残基, 或者通过唾液酸转移酶添加唾液酸残基^[56]。其他分支也可以由 GnT-IV、GnT-V 和 GnT-VI 等启动^[6,54]。

2.3 真菌的 N-聚糖多样性的形成

真菌中的 N-聚糖后续修饰则与高等动物不同, 真菌的 N-聚糖多样性主要是通过内源性糖基转移酶(OCH1)在 N-聚糖前体的基础上继续添加甘露糖或甘露糖-磷酸残基产生的^[57]。OCH1 最早在 *S. cerevisiae* 中被发现和研究, 随后通过基因比对, 几乎所有真菌都存在 OCH1 的同源基因。Asn-GlcNAc₂Man₈ 在 OCH1 的催化下, 在 α -1,3-核心甘露糖残基上添加 α -1,6-甘露糖或磷酸甘露糖, 随后在多种甘露糖转移酶或磷酸甘露糖转移酶的催化下进一步添加甘露糖或磷酸甘露糖, 从而产生由十几个到几十个不等的 α -1,6-甘露糖和其分支组成主干的聚糖(图 2D), 这些聚糖通常被称为高聚糖基(hyperglycosyl)或高聚甘露糖

基型结构(hyper-mannosyl-type structures)^[58]。

3 N-聚糖的改造策略

由于高等动物与真菌的 N-糖基化差异主要在于 Asn-GlcNAc₂Man₈ 生成后的部分, 因此在使用真菌作为高等动物糖蛋白异源表达宿主时, 其 N-糖修饰的改造重心也主要集中在 Asn-GlcNAc₂Man₈ 生成后的部分, 通常会通过敲除或插入相关基因以满足改造需求, 常见的改造基因如表 2 所示。

3.1 终止高聚甘露糖基的形成并引入 N-糖基化的外源酶系

真菌中的高聚甘露糖基型结构是影响真菌生产高等动物糖蛋白的主要因素。真菌源的高聚甘露糖基型结构在人体内具有高免疫原性, 当这类糖蛋白进入人体血液时, 有可能会引起超敏反应而对人体造成损害^[72]。同时高聚甘露糖结构也不利于后续工程对 N-聚糖的定点修饰, 因此要改造真菌生产的高等动物糖基时通常都会先终止高聚甘露糖结构的生成, 而敲除 OCH1 基因是终止真菌合成高聚甘露糖结构最普遍的选择。Nagasu 等首先在酿酒酵母 *S. cerevisiae* 中敲除了 OCH1 基因, 得到 OCH1 基因缺陷型的酿酒酵母, 该实验证明了敲除 OCH1 基因后, 酿酒酵母虽然在生长发育中表现出一定程度的障碍, 但并不会产生致死现象, 为后续对此基因进行敲除提供了可行性^[59]。Vervecken 等在对毕赤酵母 *P. pastoris* 的 OCH1 基因进行敲除时发现, 毕赤酵母在 OCH1 缺失时, 不仅终止了 Asn-GlcNAc₂Man₈ 合成高聚甘露糖基结构的通路, 而且没有表现出生长障碍, 这也意味着毕赤酵母比酿酒酵母更适合作为糖蛋白生产的工程菌株^[60]。除了敲除 OCH1 基因, 还有另一种方法是通过敲除 N-聚糖早期合成的关键基因, Verostek 等通过敲除酿酒酵母中 α -1,3-甘露糖转移酶基因(ALG3), 终止了 α -1,3-甘

表 2 真菌 N-糖基化系统改造常用基因

Table 2 Genes for fungal N-glycosylation system modification

基因	酶	功能	改造方式	改造菌种	参考文献
Gene	Enzyme	Function	Genetic alteration	Strains	References
<i>OCHI</i>	α -1,6 甘露糖转移酶	在 GlcNAc ₂ Man ₈ 添加甘露糖或磷酸甘露糖残基	敲除	<i>S. cerevisiae</i>	[59]
	α -1,6-mannosyltransferase	Adding mannose or mannose phosphate to GlcNAc ₂ Man ₈	Knockout	<i>P. pastoris</i>	[60]
				<i>A. oryzae</i>	[61]
<i>ALG3</i>	α -1,3-甘露糖转移酶	在 GlcNAc ₂ Man ₃ 和 GlcNAc ₂ Man ₅ 等继续添加甘露糖残基	敲除	<i>S. cerevisiae</i>	[63]
	α -1,3-mannosyltransferase	Adding mannose to GlcNAc ₂ Man ₃ or GlcNAc ₂ Man ₅	Knockout	<i>T. reesei</i>	[64]
				<i>P. pastoris</i>	[65]
				<i>K. marxianus</i>	[62]
				<i>S. commune</i>	[66]
<i>GnTI</i>	N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I	在五糖核心继续添加 β -1,2-GlcNAc	引入	<i>S. cerevisiae</i>	[68]
	N-acetylglucosamine transferase I	Adding β -1,2-GlcNAc to pentasaccharide core	Introduction	<i>P. pastoris</i>	[54]
				<i>T. reesei</i>	[64]
<i>GalT</i>	半乳糖转移酶 I	添加半乳糖残基修饰外链	引入	<i>S. cerevisiae</i>	[69]
	Galactosyltransferase I	Adding galactose to modify the outer chain	Introduction	<i>P. pastoris</i>	[54]
				<i>T. reesei</i>	[64]
<i>endoT</i>	β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶	水解 N-聚糖	引入	<i>P. pastoris</i>	[70]
	β -N-acetylglucosaminidase	Hydrolyzing the N-glycans	Introduction	<i>A. oryzae</i>	[71]

露糖与 α -1,6-甘露糖残基和 GlcNAc₂Man₅ 连接, 使 N-聚糖加工停留在 GlcNAc₂Man₅ 部分而不形成高聚甘露糖基^[63]。

终止高聚甘露糖基的形成后, 需要进一步模拟人或其他动物的 N-糖基化而继续引入对应的糖苷转移酶和糖苷酶, 必要时可能还需要引入辅助蛋白和定位蛋白, 否则会造成异源蛋白部分功能缺失。Huynh 等在使用米曲霉合成抗体 IgG 时, 单敲除了 *OCHI* 后未引入外源糖苷修饰酶系, 导致其合成抗体的 Fc 段与野生型抗体相比缺乏 Asn297 位置人源性 N-聚糖, 因此无法参与 ADCC 效应^[61]。张莹宽在敲除瑞氏木霉(*T. reesei*)的 *ALG3* 基因后, 再引入了人源性的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (GnTI)和半乳糖转移酶 I (GalT)来对瑞氏木霉进行 N-糖基化的人源化改造^[64]。顾鹏飞等则在毕赤酵母同时敲

除了 *OCHI* 基因和 *ALG3* 基因的基础上导入了甘露糖苷酶 I (MnsI) 基因并成功表达糖蛋白 CSF^[65]。

由于 N-糖基化是一个连续的过程, 一种酶合成的糖链作为下一个酶的底物, 因此对引入的糖苷酶和糖苷转移酶都需要进行正确的亚细胞靶向定位。 α -1,2-甘露糖苷酶可以切除 GlcNAc₂Man₈ 的 3 个甘露糖残基得到 GlcNAc₂Man₅, 当其要定位在高尔基内膜中时, 其 C 端会与一个由 4 个氨基酸残基组成的信号肽融合, 这个信号肽在真菌中主要是 His-Asp-Glu-Leu(HDEL), 而在高等动物则为 Lys-Asp-Glu-Leu(KDEL), 融合后的 α -1,2-甘露糖苷酶可以识别并结合 HDEL 或 KDEL 受体, 从而靶向定位在高尔基体内膜上^[73-75]。大部分催化 N-聚糖化反应的糖苷酶和糖基转移酶则是

II型膜蛋白,它们可以通过自身的 N 端区域直接在亚细胞上正确定位,但是在很多研究中发现,在酵母中表达全长哺乳动物糖基转移酶时其 N 端并不能正确地定位,这说明高等动物的高尔基定位区域与真菌并不通用^[68,76]。Vervecken 等通过构建融合蛋白,将每个引入的外源糖基化酶 N 端定位信号替换为已知亚细胞定位的酵母蛋白 N 端,成功地将人 GnT-I 和 GalT 靶向定位在毕赤酵母的高尔基内膜上^[60]。

3.2 N-聚糖删除

并非所有高等动物源的糖蛋白都依赖 N-聚糖的结构,也有部分糖蛋白可以在去除 N-聚糖的情况下保留其活性,如 Meuris 等生产治疗性人 IgG 时,引入了一种来自真菌 *Hypocrea jecorina* 的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶(endoT),该酶可以水解 IgG 的 N-聚糖外链,只留下单个 GlcNAc 残基;实验表明这种经过糖删除的 IgG 不仅保留了抗体的中和能力,还使其初始血浆清除率降低^[77]。一些 N-糖基化位点由于距离重组酶活性位点较远,这类 N-聚糖对折叠与活性的影响很小,因此删除这类 N-聚糖后并不会改变糖蛋白活性, Li 等利用 endoT 删除策略,构建了无 N-聚糖的 α 淀粉酶并发现其与野生型相比活性没有下降^[71]。某些酶删除了糖链,不仅不会影响其活性反而会使其活性增高, Liu 等将人脂肪酶去糖基化后,该酶活性提高了 2 倍^[78]。可见在使用真菌生产异源糖蛋白时,并非一定要引入多种异源糖基化酶系,而是根据所需蛋白的性质来定制最符合效益的表达株。

4 展望

近 30 年来,重组糖蛋白的需求量不断增加,尤其在医疗领域极为突出,据统计仅已被批准或正处于临床前和临床开发阶段中的重组蛋白药物就已经超过 600 多种,而其中有 70%

是糖蛋白,因此需要更高性能的糖蛋白表达系统来满足广大人民的需求^[79]。真菌与传统的哺乳动物细胞相比分泌能力更强、培养成本更低,是最有潜力的替代系统,但是截至目前,哺乳动物细胞依旧是主流的疫苗生产宿主,如中国使用的新型冠状病毒灭活疫苗是通过非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)生产、狂犬病疫苗主要是通过人二倍体细胞生产^[80-81]。真菌目前无法普遍取缔哺乳动物细胞生产治疗性糖蛋白的主要原因是真菌的翻译后修饰系统与哺乳动物相差较大,特别是 N-糖基化会直接影响糖蛋白的免疫原性及其活性。

为了克服真菌无法生产人源性 N-聚糖的缺点,大量科学家对真菌的 N-糖基化系不断进行改造,比如敲除真菌自身糖基化系统的关键基因,引入高等动物糖基化系统的相关酶系,或者直接删除糖蛋白的 N-聚糖等,并取得了一定的成效。但无论是真菌还是哺乳动物的糖基化系统都极其复杂,导致目前尚无一套完全通用的真菌 N-糖基化系统改造方案来满足不同糖蛋白的生产需求。对真菌的 N-糖基化系统进行改造还面临着一些问题,比如当前真菌的 N-糖基化改造策略都是基于基因编辑技术对真菌的 N-糖基化的关键基因进行敲除或插入,而现有的真菌基因编辑技术精确性还不够,因此在对真菌进行基因编辑时不仅效率不高,可能还会意外激活相关毒素的表达,从而带来安全性风险;同时真菌与哺乳动物 N-聚糖的结构数据库和位点数据库也尚未完善,对 N-糖基化系统改造的指导作用有限,需要提交更多的 N-聚糖相关数据。目前基因编辑技术正在不断发展,本课题组张哲等基于 CRISPR 系统的改良方案能够更高效且精确地对米曲霉基因进行敲除,而且越来越多的真菌基因功能也被不断确定,因此真菌 N-糖基化系统改造的效率和安全性必然会逐渐提高;而不断开发

的 N-聚糖检测技术和分析技术使得真菌和高等动物的 N-聚糖结构以及其糖基化位点信息在不断被揭露, N-聚糖的结构数据库和位点数据也必定逐渐完善^[82]。期望能有更多研究人员参与 N-糖基化研究, 共同努力提高 N-聚糖的相关技术且丰富 N-聚糖的相关信息, 相信真菌异源糖蛋白表达系统能够通过不断优化和改造, 逐渐取代哺乳动物细胞, 最终成为首选的医用糖蛋白生产工具。

REFERENCES

- [1] Zhuang SW, Renault N, Archer I. A brief review on recent development of multidisciplinary engineering in fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 339: 32-41
- [2] Duman-Özdamar ZE, Binay B. Production of industrial enzymes via *Pichia pastoris* as a cell factory in bioreactor: current status and future aspects[J]. *The Protein Journal*, 2021, 40(3): 367-376
- [3] 刘琪聪, 曾斌. 米曲霉异源蛋白表达系统研究进展及展望[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4932-4942
Liu QC, Zeng B. Research progress and prospects of *Aspergillus oryzae* heterologous protein expression system[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4932-4942 (in Chinese)
- [4] Zhang X, Wang Z, Jan S, Yang Q, Wang M. Expression and functional analysis of the lysine decarboxylase and copper amine oxidase genes from the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* ES026[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2766
- [5] Hintz WE, Kalsner I, Plawinski E, Guo ZM, Lagosky PA. Improved gene expression in *Aspergillus nidulans*[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1995, 73(S1): 876-884
- [6] Punt PJ, Van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, Van Den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(5): 200-206
- [7] Wohlschlager L, Csarman F, Chang HC, Fitz E, Seiboth B, Ludwig R. Heterologous expression of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in *Trichoderma reesei*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 2
- [8] Nevalainen H, Bergquist P, Te'o VSJ. Making a bacterial thermophilic enzyme in a fungal expression system[J]. *Current Protocols in Protein Science*, 2018, 92(1): e52
- [9] Conesa A, Van Den Hondel CA, Punt PJ. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 3016-3023
- [10] Rojas-Sánchez U, López-Calleja AC, Millán-Chiu BE, Fernández F, Loske AM, Gómez-Lim MA. Enhancing the yield of human erythropoietin in *Aspergillus niger* by introns and CRISPR-Cas9[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 168: 105570
- [11] Zhu L, Maruyama JI, Kitamoto K. Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption ($\Delta AosedD \Delta Aovps10$) in a hyper-producing mutant of *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6347-6357
- [12] Okazaki F, Aoki JI, Tabuchi S, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Efficient heterologous expression and secretion in *Aspergillus oryzae* of a llama variable heavy-chain antibody fragment V_{HH} against EGFR[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(1): 81-88
- [13] Yoon J, Maruyama JI, Kitamoto K. Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 747-759
- [14] Katla S, Mohan N, Pavan SS, Pal U, Sivaprakasam S. Control of specific growth rate for the enhanced production of human interferon $\alpha 2b$ in glycoengineered *Pichia pastoris*: process analytical technology guided approach[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 94(10): 3111-3123
- [15] Novikova LA, Yovkova V, Luzikov VN, Barth G, Mauersberger S. Recombinant *Yarrowia lipolytica* strains for the heterologous expression of multi-component enzyme systems: expression of mammalian steroidogenic proteins[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 339: 42-52
- [16] Tran AM, Nguyen TT, Nguyen CT, Huynh-Thi XM, Nguyen CT, Trinh MT, Tran LT, Cartwright SP, Bill RM, Tran-Van H. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating

- factor[J]. BMC Research Notes, 2017, 10(1): 148
- [17] Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(3): 297-306
- [18] Çelik E, Çalık P. Production of recombinant proteins by yeast cells[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 1108-1118
- [19] Bredell H, Smith JJ, Görgens JF, Van Zyl WH. Expression of unique chimeric human papilloma virus type 16 (HPV-16) L1-L2 proteins in *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*[J]. Yeast, 2018, 35(9): 519-529
- [20] Kumari A, Baronian K, Kunze G, Gupta R. Extracellular expression of YILip11 with a native signal peptide from *Yarrowialipolytica* MSR80 in three different yeast hosts[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 110: 138-144
- [21] Wagner JM, Alper HS. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 89: 126-136
- [22] 杨国帅, 许颖, 詹晓北, 蒋芸, 李志涛, 高敏杰. *Microbacterium* sp. XT11 黄原胶内切酶在毕赤酵母中的异源表达、性质及应用[J/OL]. 食品与发酵工业, 2021, DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028973
- Yang GS, Xu YB, Zhan XB, Jiang Y, Li ZT, Gao MJ. Characterization and application of an endoxanthanase from *Microbacterium* sp. XT11 heterologous expressed in *Pichia pastoris*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028973 (in Chinese)
- [23] Montoliu-Gaya L, Villegas S. Production of therapeutic single-chain variable fragments (ScFv) in *Pichia pastoris*[J]. Methods in Molecular Biology: Clifton, NJ, 2022, 2313: 151-167
- [24] Oyama K, Ohkuri T, Inoue M, Caaveiro JMM, Ueda T. High-level expression of human CH₂ domain from the Fc region in *Pichia pastoris* and preparation of anti-CH₂ antibodies[J]. The Journal of Biochemistry, 2021, 170(2): 289-297
- [25] Li Q, Ge L, Zheng DY, Zhang XM, Zhao LG. Screening and characterization of a GH78 α -l-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the bioconversion of icariin to icaritin with recombinant β -glucosidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 153: 109940
- [26] Ito J, Baldwin WH, Cox C, Healey JF, Parker ET, Legan ER, Li RH, Gill S, Batsuli G. Removal of single-site N-linked glycans on factor VIII alters binding of domain-specific monoclonal antibodies[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2022, 20(3): 574-588
- [27] Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides[J]. Annual Review of Biochemistry, 1985, 54: 631-664
- [28] 刘浩, 邢益平, 贾一琼, 李军, 王世霞, 卢山, 黄祖瑚. N-糖基化移位对乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白核酸疫苗的表达及免疫原性的影响[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(13): 2443-2446, 2431
- Liu H, Xing YP, Jia YQ, Li J, Wang SX, Lu S, Huang ZH. Effects of N-glycosylation shift on protein expression *in vitro* of protein nucleic acid vaccine and immunogenicity in HBsAg[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(13): 2443-2446, 2431 (in Chinese)
- [29] Kreer C, Kuepper JM, Zehner M, Quast T, Kolanus W, Schumak B, Burgdorf S. N-glycosylation converts non-glycoproteins into mannose receptor ligands and reveals antigen-specific T cell responses *in vivo*[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 6857-6872
- [30] Schachter H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches[J]. Glycoconjugate Journal, 2000, 17(7/8/9): 465-483
- [31] Gleeson PA, Feeney J, Hughes RC. Structures of N-glycans of a ricin-resistant mutant of baby hamster kidney cells. Synthesis of high-mannose and hybrid N-glycans[J]. Biochemistry, 1985, 24(2): 493-503
- [32] Sturm A, Kuik JAV, Vliegenthart JF, Chrispeels MJ. Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(28): 13392-13403
- [33] Marti T, Schaller J, Rickli EE, Schmid K, Kamerling JP, Gerwig GJ, Halbeek HV, Vliegenthart JF. The N- and O-linked carbohydrate chains of human, bovine and porcine plasminogen[J]. European Journal of Biochemistry, 1988, 173(1): 57-63
- [34] Schachter H. The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans[J]. Glycobiology, 1991, 1(5): 453-461
- [35] Bittremieux W, Tabb DL, Impens F, Staes A, Timmerman E, Martens L, Laukens K. Quality control in mass spectrometry-based proteomics[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2018, 37(5): 697-711

- [36] De MA Coura M, Barbosa EA, Brand GD, Bloch C Jr, De Sousa JB. Identification of differential N-glycan compositions in the serum and tissue of colon cancer patients by mass spectrometry[J]. *Biology*, 2021, 10(4): 343
- [37] Zaia J. Mass spectrometry and the emerging field of glycomics[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(9): 881-892
- [38] Szabo M, Filep C, Nagy M, Sarkozy D, Szigeti M, Sperling E, Csanky E, Guttman A. N-glycosylation structure - function characterization of omalizumab, an anti-asthma biotherapeutic product[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 209: 114483
- [39] 高伟娜, 丘利芳, 王静蓉. 基于 LC-Chip-ESI-QTOF-MS 的 IgG 唾液酸糖基化的分析方法研究[A]//第八届全国化学生物学学术会议论文集[C]. 上海: 中国化学会, 2013: 308
- Gao W, Qiu L, Wang J. Analysis of IgG sialic acid glycosylation based on LC-Chip-ESI-QTOF-MS[A]// Proceedings of the 8th National Conference on Chemical Biology[C]. Shanghai: Chinese Chemical Society, 2013: 308 (in Chinese)
- [40] Zhang Y, Zheng SS, Mao YH, Cao W, Zhao LJ, Wu CW, Cheng JQ, Liu F, Li GS, Yang H. Systems analysis of plasma IgG intact N-glycopeptides from patients with chronic kidney diseases via EThcD-sceHCD-MS/MS[J]. *The Analyst*, 2021, 146(23): 7274-7283
- [41] Lubec G, Afjehi-Sadat L. Limitations and pitfalls in protein identification by mass spectrometry[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(8): 3568-3584
- [42] 张小倩, 张腾腾, 闫攀, 杨毕超, 安凤霞. 蛋白 N-糖基化分析方法研究进展[J]. *生物技术进展*, 2019, 9(3): 246-252
- Zhang XQ, Zhang TT, Yan P, Yang BC, An FX. Advances on the analysis methods of N-glycosylation[J]. *Current Biotechnology*, 2019, 9(3): 246-252 (in Chinese)
- [43] Jensen PH, Karlsson NG, Kolarich D, Packer NH. Structural analysis of N- and O- glycans released from glycoproteins[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(7): 1299-1310
- [44] Rojas-Macias MA, Mariethoz J, Andersson P, Jin C, Venkatakrisnan V, Aoki NP, Shinmachi D, Ashwood C, Madunic K, Zhang T, et al. Towards a standardized bioinformatics infrastructure for N- and O- glycomics[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3275
- [45] Bern M, Kil YJ, Becker C. Byonic: advanced peptide and protein identification software[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2012, 40(1): 13.20.1-13.20.14
- [46] Toghi Eshghi S, Shah P, Yang WM, Li XD, Zhang H. GPQuest: a spectral library matching algorithm for site-specific assignment of tandem mass spectra to intact N-glycopeptides[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(10): 5181-5188
- [47] Liu MQ, Zeng WF, Fang P, Cao WQ, Liu C, Yan GQ, Zhang Y, Peng C, Wu JQ, Zhang XJ, et al. pGlyco 2.0 enables precision N-glycoproteomics with comprehensive quality control and one-step mass spectrometry for intact glycopeptide identification[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 438
- [48] Polasky DA, Yu FC, Teo GC, Nesvizhskii AI. Fast and comprehensive N- and O-glycoproteomics analysis with MSFragger-Glyco[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(11): 1125-1132
- [49] Shen JC, Jia L, Dang LY, Su YJ, Zhang J, Xu Y, Zhu B, Chen ZX, Wu JY, Lan RX, et al. StrucGP: *de novo* structural sequencing of site-specific N-glycan on glycoproteins using a modularization strategy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(8): 921-929
- [50] Shpakov AO, Derkach KV. The structural and functional characteristics of the dolichol cycle enzymes[J]. *Tsitologiya*, 1996, 38(9): 889-913
- [51] Lennarz WJ. Studies on oligosaccharyl transferase in yeast[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, 54(4): 673-677
- [52] Kukuruzinska MA, Bergh ML, Jackson BJ. Protein glycosylation in yeast[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1987, 56: 915-944
- [53] De Pourcq K, De Schutter K, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(5): 1617-1631
- [54] Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R, Callewaert N. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 58-70
- [55] Mathew C, Weiß RG, Giese C, Lin CW, Losfeld ME, Glockshuber R, Riniker S, Aebersold M. Glycan-protein interactions determine kinetics of N-glycan remodeling[J]. *RSC Chemical Biology*, 2021, 2(3): 917-931
- [56] Pierce-cretel A, Pamblanco M, Strecker G, Montreuil J, Spik G, Dorland L, Van Halbeek H, Vliegthart JFG. Primary structure of the N-glycosidically linked

- sialoglycans of secretory immunoglobulins A from human milk[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1982, 125(2): 383-388
- [57] Jacobs PP, Callewaert N. N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems[J]. *Current Molecular Medicine*, 2009, 9(7): 774-800
- [58] Nakayama K, Nagasu T, Shimma Y, Kuromitsu J, Jigami Y. OCH₁ encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides[J]. *The EMBO Journal*, 1992, 11(7): 2511-2519
- [59] Nagasu T, Shimma YI, Nakanishi Y, Kuromitsu J, Iwama K, Nakayama KI, Suzuki K, Jigami Y. Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation[J]. *Yeast*, 1992, 8(7): 535-547
- [60] Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, De Vusser K, Contreras R. *In vivo* synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2639-2646
- [61] Huynh HH, Morita N, Sakamoto T, Katayama T, Miyakawa T, Tanokura M, Chiba Y, Shinkura R, Maruyama JI. Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2020, 7: 7
- [62] Lee MH, Hsu TL, Lin JJ, Lin YJ, Kao YY, Chang JJ, Li WH. Constructing a human complex type N-linked glycosylation pathway in *Kluyveromyces marxianus*[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233492
- [63] Verostek MF, Atkinson PH, Trimble RB. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* alg3, sec18 mutant oligosaccharides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(9): 5547-5551
- [64] 张莹宽. 瑞氏木霉 N-糖基化途径的人源化改造初探[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2008
Zhang YK. Preliminary study of the humanization of N-glycosylation pathways in *Trichoderma reesei*[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2008 (in Chinese)
- [65] 顾鹏飞, 李萌, 朱瑞宇, 金坚. 双缺陷型毕赤酵母 X33 突变株的诱变育种[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(2): 129-135
Gu PF, Li M, Zhu RY, Jin J. Mutation breeding of double deficient mutant *Pichia pastoris* X33 strain[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(2): 129-135 (in Chinese)
- [66] Berends E, Lehle L, Henquet M, Hesselink T, Wösten HA, Lugones LG, Bosch D. Identification of alg3 in the mushroom-forming fungus *Schizophyllum commune* and analysis of the Δ alg3 knockout mutant[J]. *Glycobiology*, 2013, 23(2): 147-154
- [67] De Pourcq K, Tiels P, Van Hecke A, Geysens S, Vervecken W, Callewaert N. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce glycoproteins homogeneously modified with the universal Man₃GlcNAc₂ N-glycan core[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39976
- [68] Yoshida S, Suzuki M, Yamano S, Takeuchi M, Ikenaga H, Kioka N, Sakai H, Komano T. Expression and characterization of rat UDP-N-acetylglucosamine: alpha-3-D-mannoside beta-1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase I in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Glycobiology*, 1999, 9(1): 53-58
- [69] Malissard M, Borsig L, Di Marco S, Grütter MG, Kragl U, Wandrey C, Berger EG. Recombinant soluble beta-1, 4-galactosyltransferases expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, characterization and comparison with human enzyme[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 239(2): 340-348
- [70] Claes K, Vandewalle K, Laukens B, Laeremans T, Vosters O, Langer I, Parmentier M, Steyaert J, Callewaert N. Modular integrated secretory system engineering in *Pichia pastoris* to enhance G-protein coupled receptor expression[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(10): 1070-1075
- [71] Li QS, Higuchi Y, Tanabe K, Katakura Y, Takegawa K. Secretory production of N-glycan-deleted glycoprotein in *Aspergillus oryzae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(5): 573-580
- [72] 杜力, 刘晓志, 魏敬双, 高健. 蛋白质药物糖基化工程化改造研究进展[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(5): 448-455
Du L, Liu XZ, Wei JS, Gao J. Research progress of glycosylation engineering of protein drug[J]. *Current Biotechnology*, 2020, 10(5): 448-455 (in Chinese)
- [73] Lewis MJ, Pelham HR. A human homologue of the yeast HDEL receptor[J]. *Nature*, 1990, 348(6297): 162-163
- [74] Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S, Yoshida A, Ikenaga H, Takeuchi M, Jigami Y, Ichishima E. Production of human compatible high mannose-type (Man₅GlcNAc₂)

- sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(41): 26298-26304
- [75] Pelham HR, Hardwick KG, Lewis MJ. Sorting of soluble ER proteins in yeast[J]. The EMBO Journal, 1988, 7(6): 1757-1762
- [76] Krezdorn CH, Kleene RB, Watzel M, Ivanov SX, Hokke CH, Kamerling JP, Berger EG. Human beta 1,4 galactosyltransferase and alpha 2,6 sialyltransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* are retained as active enzymes in the endoplasmic reticulum[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 220(3): 809-817
- [77] Meuris L, Santens F, Elson G, Festjens N, Boone M, Santos AD, Devos S, Rousseau F, Plets E, Houthuys E, et al. GlycoDelete engineering of mammalian cells simplifies N-glycosylation of recombinant proteins[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(5): 485-489
- [78] Liu Y, Xie WP, Yu HW. Enhanced activity of *Rhizomucor miehei* lipase by deglycosylation of its propeptide in *Pichia pastoris*[J]. Current Microbiology, 2014, 68(2): 186-191
- [79] Park KY, Wi SJ. Potential of plants to produce recombinant protein products[J]. Journal of Plant Biology, 2016, 59(6): 559-568
- [80] 杨中楠, 赵韵芽, 李璐, 高汇迪, 蔡琪, 孙晓霞, 张福生, 苏锦锋, 张轶楠, 舒祥, 等. 新型冠状病毒灭活疫苗(Vero 细胞)大规模紧急使用安全性评价[J]. 中华流行病学杂志, 2021(6): 977-982
- Yang ZN, Zhao YY, Li L, Gao HD, Cai Q, Sun XX, Zhang FS, Su JF, Zhang YN, Shu X, et al. Evaluation of safety of two inactivated COVID-19 vaccines in a large-scale emergency use[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2021(6): 977-982 (in Chinese)
- [81] 范斌, 乔发涛, 张小华, 雷向凯, 王娜, 唐梅松, 苗亚莉, 郭金花. 人二倍体细胞狂犬疫苗与 Vero 细胞纯化狂犬疫苗的安全性对比分析[J]. 中国实用医药, 2019, 14(36): 143-144
- Fan B, Qiao FT, Zhang XH, Lei XK, Wang N, Tang MS, Miao YL, Guo JH. Comparative analysis on the safety of human diploid cell rabies vaccine and Vero cell purified rabies vaccine[J]. China Practical Medicine, 2019, 14(36): 143-144 (in Chinese)
- [82] 张哲, 曾斌, 龙传南, 范俊侠. 一种基于 CRISPR 技术定向遗传改造米曲霉基因的方法: CN110592073A[P]. 2019-12-20
- Zhang Z, Zeng B, Long CN, Fan JX. Method for directionally and genetically modifying *Aspergillus oryzae* gene based on CRISPR technology: CN110592073A[P]. 2019-12-20 (in Chinese)