

用中国仓鼠卵巢细胞构建内切- β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶筛选系统

薛威, 喜多岛敏彦, 高晓冬*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 糖苷水解酶 85 家族的内切- β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶具有糖基转移酶活性, 利用该类酶, 可以合成特定结构 *N*-糖链修饰的糖基化复合物。为构建糖基转移酶筛选系统, 将 *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶的跨膜定位区域与绿色荧光蛋白融合表达, 成功把带有天冬酰胺连接糖基化位点的单体增强绿色荧光蛋白定位到中国仓鼠卵巢细胞的高尔基体中。流式细胞仪分析显示, 融合了定位区域后, 绿色荧光蛋白仍可以发出荧光, 且在引入糖基化位点后, 细胞荧光强度约降低 10 倍。经衣霉素处理, 细胞糖基化被抑制, 同时荧光强度减弱。此细胞株荧光强度对于糖基化水平的依赖性表明其在糖基转移酶的进化筛选方面的应用潜力。

关键词: 绿色荧光蛋白; *N*-糖基化; 内切- β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶

中图分类号: Q 784 文章编号: 1673-1689(2019)11-0049-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.007

Construction of A Screening System for Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase Using Chinese Hamster Ovary Cell

XUE Wei, KITA JIMA Toshihiko, GAO Xiaodong*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase belonging to glycoside hydrolase family 85 (ENGase) exhibits transglycosylation activity, which is a useful tool for the synthesis of glycoconjugates with a defined structure of *N*-glycan. In the present study, we constructed a cell-based screening system to obtain mutant ENGase. As a substrate for ENGase, we expressed monomer enhanced green fluorescent protein (mEGFP) with *N*-glycan in the Golgi of Chinese hamster ovary cells. Cells expressing *N*-glycosylated mEGFP provided 10 times lower fluorescence than those expressing mEGFP. Inhibition of protein glycosylation by tunicamycin caused further decrease of fluorescence from the *N*-glycosylated mEGFP. Our results suggest that this cell line can be used for the high throughput screening of mutant ENGase.

Keywords: green fluorescent protein, *N*-glycosylation, endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase

收稿日期: 2017-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400693); 江苏省自然科学基金项目(BK20140141); 中央高校基本科研业务费项目(JUSRP51508)。

* 通信作者: 高晓冬(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事糖生物化学、微生物学、细胞工程和分子遗传学等方面的研究。

E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

引用本文: 薛威, 喜多岛敏彦, 高晓冬. 用中国仓鼠卵巢细胞构建内切- β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶筛选系统[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 49-54.

NotI 位点。

1.4 质粒构建

用 1.3 中引物,以 pRS-424-TEF- α factor-mEGFP-HDEL 或 pRS-424-TEF- α factor-Ng-mEGFP-HDEL 为模板 PCR 扩增得到 mEGFP 和 Ng-mEGFP 的 DNA 片段。PCR 条件如下:94 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 30 s;50 °C 退火 30 s;68 °C 延伸 80 s,35 个循环。以上 PCR 产物经纯化后双酶切 (*MluI* 和 *NotI*);质粒 pME-Zeo-hGnTI-EGFP-Flag 双酶切 (*XhoI* 和 *MluI*) 得到高尔基体定位序列 hGnTI;质粒 pME18sf-PGKpPuro 双酶切 (*XhoI* 和 *NotI*) 得到整合质粒空载体。以上双酶切(37 °C,3 h)产物用 1 g/dL 琼脂糖凝胶做胶回收,得到的产物按照 2:2:1(V:V:V)比例加入 10 μ L 体系连接(16 °C,3 h)。取 5 μ L 连接产物转化大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5 α ,氨苄青霉素平板筛选阳性克隆子,得到整合质粒 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-mEGFP 和 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-Ng-mEGFP。所有质粒均送上海 Sangon Biotech 测序。

1.5 整合质粒线性化

按以下操作顺序将整合质粒 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-mEGFP 和 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-Ng-mEGFP 线性化:取 10 μ g 质粒单酶切 (*FspI*,37 °C,3 h);向酶切体系中加入 1/10 体积的醋酸钠和 2.5 倍体积无水乙醇 (-20 °C,20 min);离心 (15 000 r/min,5 min),去上清液;加入 500 μ L 70% 乙醇,振荡混匀;离心 (15 000 r/min,5 min),去上清液;室温干燥;将 DNA 沉淀溶于 20 μ L TE 用于线性化转染。

1.6 细胞培养和线性化转染

CHO K1 细胞用含 10% 胎牛血清(BI)的 DMEM (Gibco)培养基在 37 °C、5% CO₂ 条件下于 10 cm 培养皿贴壁生长。转染前,胰酶(Gibco)消化细胞接种于 6 cm 培养皿(接种密度 40%)。培养 24 h 后换 4 mL 新培养基,同时加入线性化质粒(Lipofectamine2000 操作手册)。培养 12 h 后换新培养基。

1.7 单克隆细胞株筛选和细胞药物处理

线性化转染 3 d 后,消化细胞,用含 6 μ g/mL 嘌呤霉素的 DMEM 培养基传代培养 3 周获得稳定表达嘌呤霉素抗性基因的混合细胞株,利用有限稀释法筛选单细胞株。

对于衣霉素(Tunicamycin)处理实验,细胞接种于 6 孔板(接种密度 30%),用不同浓度衣霉素的 DMEM 培养基培养 48 h,胰酶消化收集细胞用于分析。

1.8 流式细胞仪荧光分析

胰酶消化收集细胞于 1.5 mL 离心管,用 500 μ L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS,Sangon)洗涤并重悬。用 BD Accuri C6(BD)流式细胞分析仪检测细胞绿色荧光蛋白质信号。

1.9 激光共聚焦荧光定位分析

细胞经 4 °C PBS 洗两次后,用 4% 多聚甲醛 PBS 溶液孵育 20 min 使其固定。PBS 清洗两次,然后用 50 mmol/L 氯化铵 PBS 溶液孵育 10 min。吸去氯化铵溶液,用封闭缓冲液 A 透化细胞 60 min,然后用含一抗(Mouse Anti-GFP 或 Rabbit Anti-GFP130;1:400)的封闭缓冲液 B 孵育 60 min。用封闭缓冲液 A 清洗两次除去一抗,然后加入含二抗(Alexa Fluor[®] 488 chicken anti-mouse IgG (H+L) conjugate 或 Alexa Fluor[®] 555 donkey anti-rabbit IgG(H+L),1:800)的封闭缓冲液 A 孵育 60 min。用 Nikon C2si 共聚焦显微镜收集细胞荧光信号数据,NIS-Elements AR analysis4.20.00 处理输出图片,Photoshop 调整图片对比度。

1.10 Endo Hf,PNGaseF 处理和蛋白质免疫印迹

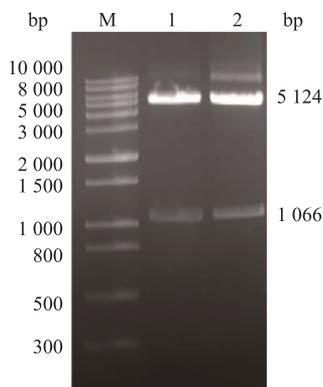
6 孔板长满后收集细胞于 1.5 mL 离心管,用 500 μ L 4 °C PBS 洗一次,离心除去 PBS。用 100 μ L 细胞裂解液裂冰上解细胞 30 min,离心(1 500 r/min,10 min)收集上清液蛋白质。在蛋白质溶液中加入变性剂,使其终浓度为 0.5% SDS 和 0.5 mmol/L DTT,然后于 95 °C 加热 5 min,使蛋白质彻底变性。每 30 微升蛋白质中加入 1 μ L Endo Hf 或 PNGaseF 于 37 °C 孵育 3 h。用 10% 聚丙烯酰胺凝胶跑蛋白质电泳,用 Mouse Anti-GFP (1:5 000) 和 Goat Anti-Mouse HRP(1:6 000)检测目标蛋白质。

2 结果与讨论

2.1 mEGFP 和 Ng-mEGFP 整合质粒的构建

按照 1.4 中的方法,成功构建整合质粒 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-mEGFP 和 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-Ng-mEGFP。双酶切经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,在 1 066 bp 处为目标基因片段 hGnTI-mEGFP(图 1 泳道 1)和 hGnTI-Ng-mEGFP

(图 1 泳道 2), 5 124 bp 处为空载体。



M: 1 kb Plus DNA ladder Marker; 泳道 1: pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-mEGFP 双酶切 (*XhoI/NotI*); 泳道 2: pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-Ng-mEGFP 双酶切 (*XhoI/NotI*)

图 1 整合质粒双酶切验证

Fig. 1 Confirmation of the plasmids expressing GE and GN

2.2 mEGFP 和 Ng-mEGFP 在 CHO K1 细胞中的表达

利用 1.6 中的方法将 2.1 中质粒线性化后转染 CHO K1 细胞, 线性化转染的整合效率较低, 作者用嘌呤霉素筛选整合成功的基因。转染 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-mEGFP 后, 有 39.9% 的存活细胞获得了 GN (图 2 红色峰图); 转染 pME18sf-PGKpPuro-hGnTI-Ng-mEGFP 后, 有 58.0% 存活细胞获得了 GE (图 2 绿色峰图)。结果显示, 融合了 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶的跨膜区域后, 蛋白质仍然可以发出荧光, 且整合了 GN 的细胞荧光明显弱于 GE 的细胞荧光。可以用此混合细胞株筛选出单细胞株用于进一步研究。

2.3 K1GN 和 K1GE 单细胞株的筛选及绿色荧光蛋白质定位分析

得到稳定表达 GN 和 GE 的混合细胞株后, 作者用有限稀释法筛选出单细胞株 K1GN 和 K1GE。单细胞株 K1GN 细胞荧光强度约为 K1GE 细胞的 1/10 (图 3(a))。

GPP130 是一个定位在高尔基体的膜蛋白^[16], 被广泛用于高尔基体定位研究^[17]。作者用 GPP130 作为高尔基体定位参照, 图 3(b) 中间一列红色荧光定位图给出了结合抗 GPP130 抗体的二抗发出的荧光, 显示高尔基体的位置信息。左侧一列绿色图给出了结合抗 GFP 抗体的二抗发出的荧光, 显示 GN

在细胞中的位置。可以看出 GN 与 GPP130 定位在相同位置。结果表明, 作者构建的融合蛋白质成功定位到了高尔基体。

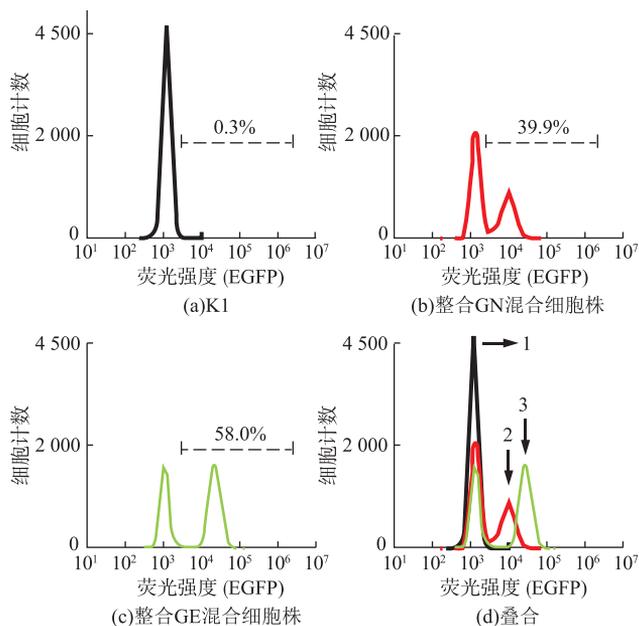
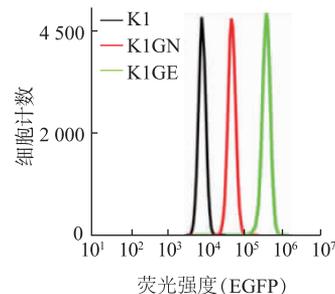


图 2 线性化转染后混和细胞株荧光分析

Fig. 2 Fluorescence of bulk population after linear transfection

2.4 N-糖链对 K1GN 细胞荧光的影响

衣霉素 (Tunicamycin) 是一种类核苷酸抗生素, 可以抑制阻断细胞 N-糖链合成途径^[18]。使用含有不同质量浓度衣霉素的 DMEM 培养基培养细胞, 2 d 后收集细胞做流式细胞仪分析。用 DMSO 作为对照处理细胞, K1GN 的荧光信号强度约为 1.4×10^4 。当衣霉素质量浓度大于 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞荧光信号开始有明显降低 (图 4(b))。当衣霉素质量浓度大于 $1 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞 EGFP 荧光信号峰出现明显偏移 (图 4(a)), 此时细胞荧光强度约降低 30% (图 4(b) (c))。



(a) 单细胞株 K1、K1GN 和 K1GE 流式细胞荧光分析

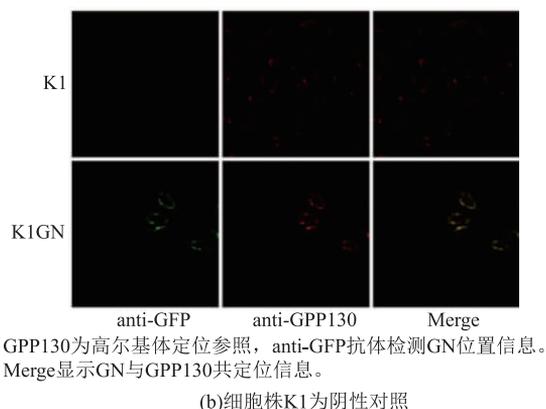
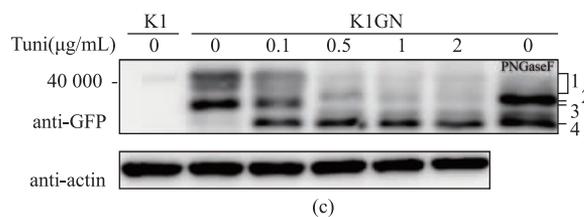
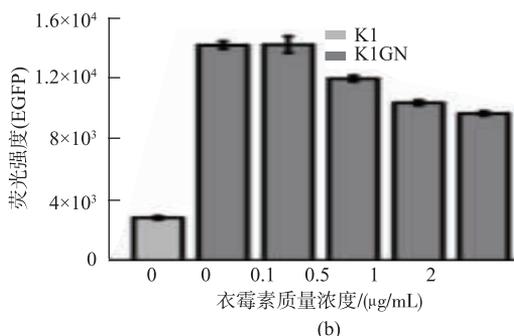
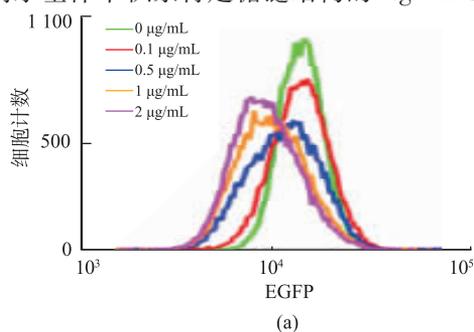


图3 单细胞株荧光分析及GN定位分析

Fig. 3 Fluorescence microscopy of single cell line expressing GN

为确定细胞荧光强度降低与绿色荧光蛋白的糖基化程度是否有关系,作者提取图4A中流式细胞仪分析所剩细胞的蛋白质,做蛋白质免疫印迹分析。当衣霉素质量浓度大于0.5 μg/mL时,蛋白质糖基化水平明显降低,且随着衣霉素质量浓度逐渐提高,蛋白质糖基化水平会进一步降低,与细胞荧光强度变化有很好的相关性(图4(b)和图4(c))。这一表型在该细胞株中稳定存在。另外,被糖基化的蛋白质条带1呈弥散状态,用PNGaseF切除糖链后该条带消失(图4(c)),表明该蛋白质上糖链结构不均一,可以通过基因组编辑敲除高尔基体中蛋白质N-糖基化途径中下游特定基因,如St8sia IV、Fut4等^[19-20],在高尔基体中积累特定糖链结构的Ng-mEGFP。



(a)流式细胞荧光分析。细胞株 K1GN 经过不同质量浓度衣霉素(0~2 μg/mL)处理 48 h 后荧光变化。(b)图 3(a)中细胞荧光强度定量分析,数据来自 3 次独立实验。(c)蛋白质免疫印迹,actin 为内参,anti-GFP 检测 GN 及其降解条带。Tuni:衣霉素;条带 1:糖基化 GN;条带 2:非糖基化 GN;条带 3:糖基化 GN 的降解条带;条带 4:非糖基化 GN 的降解条带。

图4 N-糖基化对 K1GN 细胞荧光的影响

Fig. 4 Effect of N-glycosylation on mEGFP fluorescence

3 结语

将 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶的跨膜定位区域与绿色荧光蛋白质融合表达,成功把带有天冬酰胺连接糖基化位点的单体增强绿色荧光蛋白质定位到中国仓鼠卵巢细胞的高尔基体中,并筛选得到单细胞株 K1GN。流式细胞仪分析显示,融合了定位区域后的绿色荧光蛋白质仍可以发出荧光,在引入糖基化位点后,其荧光强度约降低 10 倍。用含不同质量浓度衣霉素的培养基培养细胞,蛋白质糖基化被抑制,同时细胞荧光信号强度相应减弱。当衣霉素质量浓度大于 1 μg/mL 时,细胞 EGFP 荧光信号峰出现明显偏移,此时细胞荧光强度约降低 30%。本研究证明了该细胞株荧光强度对 N-糖基化敏感,可以在其高尔基体中表达 ENGase,检测细胞荧光强度及蛋白质糖基化水平以判定 ENGase 的糖苷水解酶活性。

本研究所用 mEGFP 第 147 位糖基化突变体,内源表达该突变体的 CHO 细胞在有无糖链情况下表现出一定荧光差异。可以在 mEGFP 不同位置引入糖基化位点,以筛选出在有无糖链下荧光差异更明显的突变体。

值得注意的是,细胞荧光强度不仅与 GN 的糖基化程度有关,还与该蛋白质在细胞中的表达量有关^[11]。因此,该细胞株还可以用于蛋白质表达相关功能基因的高通量筛选研究。

参考文献:

- [1] MCCAFFREY K, BRAAKMAN I. Protein quality control at the endoplasmic reticulum[J]. **Essays in Biochemistry**, 2016, 60(2):227-235.
- [2] CHEN W, UNLIGIL U M, RINI J M, et al. Independent Lec1A CHO glycosylation mutants arise from point mutations in N-acetylglucosaminyltransferase I that reduce affinity for both substrates. molecular consequences based on the crystal structure of GlcNAc-TI[J]. **Biochemistry**, 2001, 40(30):8765-8772.
- [3] FERRARA C, BRNKER P, SUTER T, et al. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II[J]. **Biotechnology & Bioengineering**, 2006, 93(5):851-861.
- [4] ELLIOTT S, EGRIE J, BROWNE J, et al. Control of rHuEPO biological activity; the role of carbohydrate[J]. **Experimental Hematology**, 2005, 32(12):1146-1155.
- [5] MEURIS L, SANTENS F, ELSON G, et al. GlycoDelete engineering of mammalian cells simplifies N-glycosylation of recombinant proteins[J]. **Nature Biotechnology**, 2014, 32(5):485-489.
- [6] MURAKAMI S, TAKAOKA Y, ASHIDA H, et al. Identification and characterization of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from methylotrophic yeast *Ogataea minuta*[J]. **Glycobiology**, 2013, 23(6):736-744.
- [7] YIN J, LI L, SHAW N, et al. Structural basis and catalytic mechanism for the dual functional endo-b-N-acetylglucosaminidase A [J]. **Plos One**, 2009, 4(3):e4658.
- [8] UMEKAWA M, LI C, HIGASHIYAMA T, et al. Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural N-glycan[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2010, 285(1):511-521.
- [9] UMEKAWA M, HUANG W, LI B, et al. Mutants of *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2008, 283(8):4469-4479.
- [10] TSIEN R Y. The green fluorescent protein[J]. **Annual Review of Biochemistry**, 1998, 67(67):509-544
- [11] LO C A, KAYS I, EMRAN F, et al. Quantification of protein levels in single living cells[J]. **Cell Reports**, 2015, 13(11):2634-2644.
- [12] LEE H, MIN J, VON HEIJNE G, et al. Glycosylatable GFP as a compartment-specific membrane topology reporter[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2012, 427(4):780-784.
- [13] SHRIMAL S, NG B G, LOSFELD M E, et al. Mutations in STT3A and STT3B cause two congenital disorders of glycosylation[J]. **Human Molecular Genetics**, 2013, 22(22):4638-4645.
- [14] LOSFELD M E, SONCIN F, NG B G, et al. A sensitive green fluorescent protein biomarker of N-glycosylation site occupancy[J]. **FASEB Journal; Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 2012, 26(10):4210-4217.
- [15] YANG Mingyu, LIU Xiang, ZHU Huashuo, et al. Using green fluorescent protein as a reporter gene to detect transgenic plant[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(2):98-102. (in Chinese)
- [16] STARR T, FORSTEN-WILLIAMS K, STORRIE B. Both post-golgi and intra-golgi cycling affect the distribution of the golgi phosphoprotein GPP130[J]. **Traffic**, 2007, 8(9):1265-1279.
- [17] PURI S, BACHERT C, FIMMEL C J, et al. Cycling of early golgi proteins via the cell surface and endosomes upon luminal pH disruption[J]. **Traffic**, 2002, 3(9):641-653.
- [18] XIAO H, SMEEKENS J M, WU R. Quantification of tunicamycin-induced protein expression and N-glycosylation changes in yeast[J]. **Analyst**, 2016, 141(12):3737-3745.
- [19] CHEN T L, CHEN C, BERGERON N Q, et al. The two rat alpha 2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) isoforms: evaluation of catalytic activity and intra-Golgi localization[J]. **Glycobiology**, 2003, 13(2):109-117.
- [20] PATNAIK S K, ZHANG A, SHI S, et al. alpha(1,3)fucosyltransferases expressed by the gain-of-function Chinese hamster ovary glycosylation mutants LEC12, LEC29, and LEC30[J]. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, 2000, 375(2):322-332.