

植烷醇磷酸甘露糖的酶法合成及应用

李盛陶^{1,2}, 王宁^{1,2}, 高晓冬^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 内质网(ER)腔内的甘露糖基化修饰共同存在于 N-糖基化、糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定化、O-和 C-甘露糖基化中, 对于真核生物来说具有重要的作用。ER 腔内的甘露糖基化的底物供体为多萜醇磷酸甘露糖(Dol-P-Man), 因此 Dol-P-Man 的合成对于理解不同种类的糖基化修饰具有重要的意义。本研究原核表达纯化酵母 Dol-P-Man 的合成酶(Dpm1), 并鉴定了重要的 DXD motif。利用纯化的 Dpm1 蛋白, 及简单的植烷醇(Phytanol)代替复杂的多萜醇(Dolichol), 体外酶法合成了 Dol-P-Man 的替代结构 Phy-P-Man。在 N-糖基化途径中 Alg3 催化 Dol-PP-GlcNAc2-Man5 和 Dol-P-Man 生成 Dol-PP-GlcNAc2-Man6。通过体外酶反应, 本研究证明 Phy-P-Man 同样能够作为 Alg3 的底物供体用于 N-糖基化途径的研究, 为以后合成高甘露糖型的 N 糖结构及 GPI、O-和 C-甘露糖基化的研究奠定了基础。

关键词: 甘露糖基化; Dpm1; 植烷醇; Alg3

中图分类号: Q 81 文章编号: 1673-1689(2020)03-0049-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.007

Enzymatic Synthesis and Application of Phytanol-Phosphate Mannose

LI Shengtao^{1,2}, WANG Ning^{1,2}, GAO Xiaodong^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Mannosylation in the endoplasmic reticulum(ER) lumen is common to four glycosylation pathways, and involves N-linked glycosylation, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor and protein O- and C-mannosylation. Thus, mannosylation in the ER lumen is vital for eukaryotes. The donor for mannosylation in the ER lumen is dolichol-phosphate-mannose (Dol-P-Man), thus the synthesis of Dol-P-Man is important for understanding different kinds of glycosylation modification. Dol-P-Man synthase catalyzes the transfer of mannose from GDP-mannose (GDP-Man) to dolichol-phosphate (Dol-P) to produce Dol-P-Man. This study expressed yeast Dol-P-Man synthase (Dpm1) in *Escherichia coli*, and purified it. The conserved DXD motif in Dpm1 played crucial roles for these activities. We used phytanol with a short lipid chain to substitute for its dolichol homologue with a long lipid chain, and synthesized phytanol-phosphate mannose (Phy-P-Man) using purified

收稿日期: 2018-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(21778023); 江苏省自然科学基金项目(BK20170174)。

* 通信作者: 高晓冬(1965—), 男, 博士, 教授, 主要从事细胞分子生物学及糖生物学方面研究。E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

Dpm1. Furthermore, Phy-P-Man could be used as a substrate for Alg3 for N-glycosylation research.

Keywords: mannosylation, Dpm1, phytanol, Alg3

蛋白质的糖基化修饰是真核细胞翻译后修饰的主要形式之一,在蛋白质折叠、转运和定位过程中发挥着重要作用^[1]。分泌蛋白和细胞表面蛋白的糖基化发生在内质网(ER)和高尔基体上,主要包括有:N-糖基化^[2]、糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定化^[3]、O-^[4]及C-甘露糖基化^[5]等4种修饰。在ER腔内的甘露糖基化修饰共同存在于上述4种途径中,在糖基化修饰过程中起着重要的作用。ER腔内的甘露糖基化是利用糖基转移酶将甘露糖(Man)从供体多萜醇磷酸甘露糖(Dol-P-Man)转移到受体上,因此Dol-P-Man的合成对于理解不同种类的蛋白糖基化修饰具有重要的意义^[6]。

在所有真核生物中,Dol-P-Man的合成发生在ER胞质区,利用多萜醇磷酸甘露糖合成酶(DPM合成酶)将Man从供体鸟苷二磷酸甘露糖(GDP-Man)转移到受体多萜醇磷酸(Dol-P)上^[7]。为了体外酶法合成Dol-P-Man,早期的研究利用酵母细胞及猪肝破碎后分离微粒体(含ER成份),制备天然的DPM合成酶,体外催化GDP-Man和Dol-P生成Dol-P-Man^[8-9]。随着酵母DPM合成酶基因(*DPM1*)的克隆鉴定^[9],后面的研究采用了重组大量表达酵母Dpm1用于Dol-P-Man的合成^[11]。但是由于多萜醇(Dolichol)的结构非常复杂,含有超过100个碳原子的脂肪链^[12],因此难以获得及在体外反应中难以溶解等因素进一步地限制了Dol-P-Man的体外合成。Wilson等发现植烷醇(Phytanol)作为一个简单的结构(含有20个碳),能够替代Dolichol,在体外反应中酵母Dpm1能够催化植烷醇磷酸(Phy-P)与GDP-Man形成Phy-P-Man^[13]。但是结构简单的替代物Phy-P-Man作为供体能否被ER腔内的甘露糖基转移酶(如N-糖基化途径中的酶Alg3)所识别并不知道。

为了解决上述存在的问题,本文作者成功地原核表达并纯化了酵母Dpm1,利用简单的结构Phy-P与GDP-Man催化合成了Phy-P-Man。更进一步地证明,Phy-P-Man能够作为Alg3的底物用于N-糖基化的研究。

1 材料与方法

1.1 原核表达载体的构建

原核表达酵母Dpm1蛋白质重组载体的构建如下:首先从NCBI中下载酿酒酵母*DPM1*基因序列,设计一对引物分别在5'端和3'端引入*Bam*HI和*Eco*RI酶切位点。以酿酒酵母基因组为模板,扩增得到*DPM1*PCR产物,酶切连接构建得到重组载体pET28a-Dpm1。Dpm1的突变蛋白质采用定点突变重叠PCR方法引入^[14]。酵母Alg3蛋白质的原核表达在N端融合了Mistic标签,Mistic的序列参照以前的文献^[15]。载体构建如下:首先人工合成Mistic基因序列,连接到pET28a的*Nde*I和*Nhe*I酶切位点之间构建载体pET28a-Mistic。酿酒酵母*ALG3*基因从酿酒酵母基因组上扩增,连接到载体pET28a-Mistic的*Bam*HI和*Xho*I酶切位点之间构建载体pET28a-Mistic-Alg3。所有载体都经过测序确认(华大基因)。

1.2 重组蛋白Dpm1的大量表达与纯化

将重组原核表达质粒pET28a-Dpm1转入Rosetta(DE3)(Thermo Scientific)原核表达宿主菌,构建重组原核表达宿主菌。挑取单菌落接种于5 mL LB(含Kan 50 μ g/mL 氯霉素 34 μ g/mL)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜。取2 mL过夜培养的菌液接种于200 mL TB(含Kan、氯霉素)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min振荡培养3 h,使OD₆₀₀达到0.6~0.8,然后转移至16 $^{\circ}$ C继续培养1 h再加入IPTG使其终浓度达到0.1 mmol/L,200 r/min诱导培养20 h。离心收集菌体,重悬于20 mL A缓冲液(25 mmol/L Tris/HCl(pH 8.0), 150 mmol/L NaCl)中,超声破碎,4 000 g、4 $^{\circ}$ C离心20 min,弃沉淀,收集上清液20 000 g、4 $^{\circ}$ C高速离心90 min,弃上清液,沉淀重悬于10 mL B缓冲液(25 mmol/L Tris/HCl(pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 体积分数1% Triton X-100)4 $^{\circ}$ C放置30 min后12 000 g离心30 min,收集上清用于纯化。纯化步骤如下:HisTrap HP 1 mL亲和层析柱(GE)先用10倍体积的B液流速1 min/mL平衡后,上样10 mL

左右上清液,然后分别用含20、60、500 mmol/L 咪唑的B液各10 mL洗柱子,分别收集与离心管中,取样进行SDS-PAGE电泳检测。

1.3 重组蛋白 Mistic-Alg3 的大量表达、膜成份制备及 western blotting 检测

将重组原核表达质粒 pET28a-Mistic-Alg3 转入 Rosetta(DE3)原核表达宿主菌。表达条件与上述 Dpm1 一致。为了制备含有 Mistic-Alg3(M-Alg3)蛋白的大肠杆菌膜成份,离心收集诱导表达的10 mL重组菌体,重悬于1 mL A 缓冲液中,超声破碎,4 000 g、4 ℃离心20 min,弃沉淀,收集上清液100 000 g、4 ℃高速离心60 min,弃上清液,沉淀重悬溶解于0.1 mL 缓冲液(50 mmol/L 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES) pH 6.5,体积分数30% glycerol),即得到大肠杆菌细胞膜成分,蛋白免疫印迹(Western blotting)进行检测 M-Alg3 的表达。具体操作如下:取10 μg 细胞膜成份进行 SDS-PAGE,然后转到 PVDF 膜上。5 g/dL 的脱脂牛奶(上海生工)封闭1 h后,2 000 倍稀释的一抗(anti-His Mouse mAb, TRANS)孵育1 h, TBST 洗涤3次。5 000 倍稀释的二抗(HRP-Goat Anti-Mous IgG, TRANS)孵育1 h, TBST 洗涤3次后, ECL 显色试剂(BIO-RAD)显色,放入 ImageQuant LAS 4000 凝胶成像系统(GE)中曝光观察结果。

1.4 重组蛋白 Dpm1 的酶活检测

Dpm1 的底物 phytanyl-phosphate(Phy-P)根据早期的文献和作者之前的文章化学合成^[16-17]。标准的酶反应条件如下(50 μL 体系):50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.5),10 mmol/L MgCl₂, 体积分数1% NP-40, 20 mmol/L Phy-P, 50 mmol/L GDP-Man (Sigma) 和 2 mg/mL 纯化的 Dpm1 蛋白。反应在30 ℃下孵育10 h。酶的活性检测用薄层层析方法(TLC)检测,具体如下:反应结束后,用毛细管取少量点于硅胶板(Merck),吹干后在氯仿/甲醇/水(6.5:3.5:0.4, 体积比)的展开剂中层析。结束后,浸于乙醇/硫酸(19:1, 体积比)溶液中,然后加热显色。

1.5 重组蛋白 M-Alg3 的酶活检测

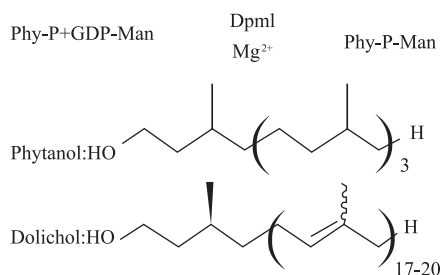
重组蛋白 M-Alg3 的底物 Phy-PP-GlcNAc₂-Man₅(Phy-PP-M5) 在我们之前的文章中合成^[17-18]。标准的酶反应条件如下(60 μL 体系):14 mmol/L MES(pH 6.0),4 mmol/L potassium citrate,10 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L MnCl₂,1 mmol/L sucrose,50 μmol/L

Phy-PP-M5,2 mmol/L Phy-P-Man, 体积分数0.05% NP-40 和 20 mg/mL 的 M-Alg3 膜成份。反应在30 ℃下孵育12 h。反应结束后加入0.2 mL 浓度为20 mmol/L 的 HCl 于100 ℃下酸解1 h,释放糖链与脂肪链 Phytanol。酸解产物12 000 g 离心1 min,上清液通过1 mL 固相萃取填料 Supelclean ENVI-Carb Slurry(Sigma)进行纯化,糖链成分用3 mL 体积分数25%的乙腈洗脱后冷冻干燥。最终得到的纯化糖链溶解于40 μL 的纯水中,通过超效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000 UPLC(Thermo Scientific)自动进样1 μL 到氨基色谱柱(Waters Acquity UPLC BEH Amide Column 1.7 μm 2.1 mm×100 mm)中,乙腈线性梯度洗脱(溶液A:乙腈;B:水;洗脱条件(体积分数):0~2 min,20% B;2~15 min,20%~50% B;15%~18 min;50% B;流速:0.2 mL/min)分离底物与产物。流出液通过 ESI-MS 仪器 TSQ Quantum Ultra(thermo Scientific)步检测相对分子质量(离子模式下扫描400~1 600 m/z 范围)

2 结果与分析

2.1 重组蛋白 Dpm1 的纯化及活性检测

基于多萜醇磷酸甘露糖(Dol-P-Man)在ER糖基化4种修饰中的重要作用,本研究将利用酵母 Dpm1 进行酶法合成,并采用结构简单的 Phytanol(含有20个碳),替代 Dolichol(含有100个碳以上)(图1)。



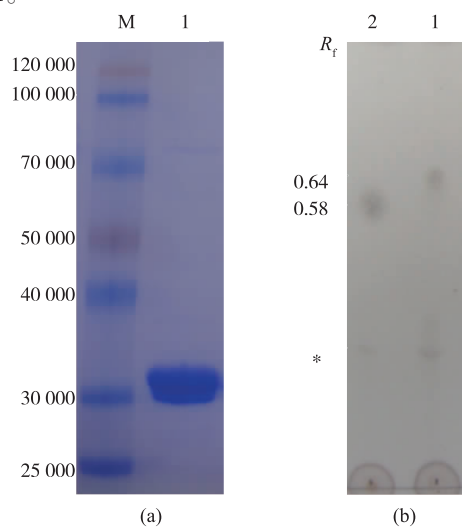
Phytanol 包含4个异戊烷,Dolichol 包含超过20个异戊二烯。

图1 Dpm1 催化生产 Phy-P-Man 的反应示意图

Fig. 1 Yeast Dpm1 catalyzes the transfer of mannose from GDP-Man to Phy-P to produce Phy-P-Man

首先构建了原核表达质粒 pET28a-Dpm1,转入 Rosetta DE3)大肠杆菌中,低温过夜诱导。诱导菌体破碎提取细胞膜成份,溶解于去污剂 Triton X-100,利用镍亲和层析纯化。对500 mmol/L 咪唑洗脱液

SDS-PAGE 分析,结果如图 2(a)显示 3×10^4 左右,有一条明显的条带,与 Dpm1 预期的大小相一致,成功实现了 Dpm1 的纯化。接下来,利用纯化的 Dpm1 催化 Phy-P 与 GDP-Man 形成 Phy-P-Man。如图 2(b)的 TLC 结果所示,底物 Phy-P 的比移值(R_f)为 0.64(条带 1),在加入 Dpm1 后 R_f 变为 0.58(条带 2)。 R_f 的降低是由于亲水性的 Man 基团加入到底物中形成了产物 Phy-P-Man 导致极性变大,从而在展开剂中迁移率变慢。此结果说明原核表达纯化的 Dpm1 活性很高,能完全催化 Phy-P 生成 Phy-P-Man。



(a) 中 M 为蛋白质相对分子质量标准;条带 1 为纯化后的 Dpm1 蛋白质。(b)中条带 1 为反应中未加入 Dpm1 的对照;条带 2 为反应中加入 Dpm1 纯化蛋白。标记的 R_f 值:0.58 和 0.64 分别代表产物 Phy-P-Man 和底物 Phy-P。其中代表非特异性背景条带。

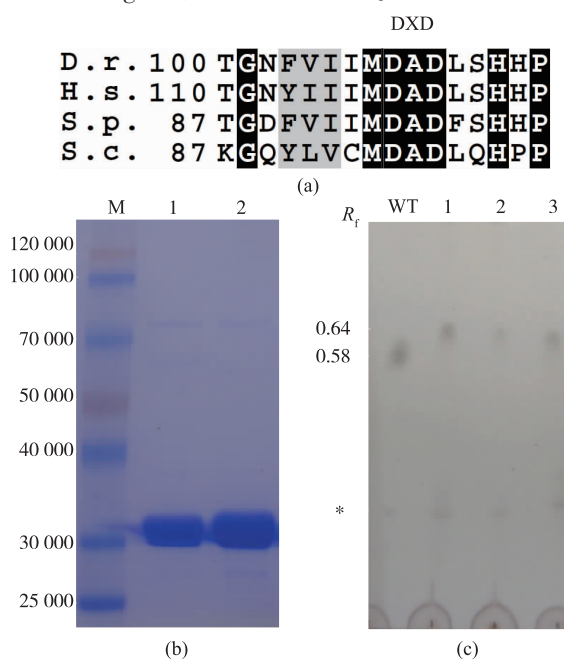
图 2 酿酒酵母 Dpm1 的纯化及活性检测

Fig. 2 Purification and activity detection of yeast Dpm1

2.2 Dpm1 的保守性模体 (motif) DXD 为活性所必须

前期的文章证明了 Dpm1 的酶活依赖于 Mg^{2+} 的加入^[19-20]。目前,大量的研究表明采用 GT-A 方式折叠的糖基转移酶含有 DXD motif,2 个天冬氨酸能够与 Mg^{2+} 结合发挥催化功能^[21]。我们通过 carbohydrate active enZyme(CAZy)数据库检索,Dpm1 属于 GT2 类,采用 GT-A 方式折叠(<http://www.cazy.org>)。我们因此推测 Dpm1 依赖于 Mg^{2+} 的原因可能存在 DXD motif。接下来,对不同物种来源的 Dpm1 进行序列比对,发现存在一个保守性的 DXD motif(图 3(a)),在酵母 Dpm1 的 95-97 位氨基酸序列上。为了

验证酵母 Dpm1 的 DXD motif 的重要作用,我们构建了 D95A 和 D97A 2 个突变,在大肠杆菌中进行了纯化(图 3(b)),并测定了它们的活性。TLC 结果如图 3(c)所示,D95A(条带 1)和 D97A(条带 2)相对于野生型(WT)完全丧失了活性,说明了 DXD motif 对 Dpm1 活性的重要作用。更进一步地,与以前的报告一致,当在野生型 Dpm1 的反应中不加 Mg^{2+} 同样地丧失了活性(条带 3)。因此,推测 DXD motif 在 Dpm1 的作用可能和别的 GT-A 类糖基转移酶一样能够与 Mg^{2+} 结合参与催化功能。



其中 D.r.为斑马鱼;H.s.为人类;S.p.为裂殖酵母;S.c.为酿酒酵母,所有氨基酸序列从 NCBI 数据库下载。M 指蛋白质相对分子质量标准;1、2 分别为 Dpm1 的 D95A 和 D97A 突变纯化蛋白。其中 WT 指野生型 Dpm1;1、2 分别为 D95A 和 D97A 突变蛋白;3 指在野生型 Dpm1 反应中未加入 Mg^{2+} 。标记的 R_f 值:0.58 和 0.64 分别代表产物 Phy-P-Man 和底物 Phy-P。其中 * 代表非特异性背景条带。

图 3 Dpm1 的 DXD motif 突变蛋白的纯化及活性检测

Fig. 3 Purification and activity detection of Dpm1 mutants in DXD motif

2.3 Dpm1 的产物 Phy-P-Man 能够被糖基转移酶 Alg3 催化

通过纯化的 Dpm1 合成了 Phy-P-Man,但能否替代 Dol-P-Man 应用于 ER 腔内的甘露糖基化修饰并不清楚。为了弄清上述问题,选择了 N-糖基化途径中以 Dol-P-Man 为底物供体的酶 Alg3 作为研究对象。糖基转移酶 Alg3 能够催化 Dol-PP-

GlcNAc2-Man5 和 Dol-P-Man 生成 Dol-PP-GlcNAc2-Man6^[22]。为了验证 Alg3 能否以 Phy-P-Man 为底物供体,利用实验室前期合成的 Alg3 的替代底物 Phy-PP-GlcNAc2-Man5(Phy-PP-M5),并表达 Alg3 蛋白进行体外反应(图 4)。

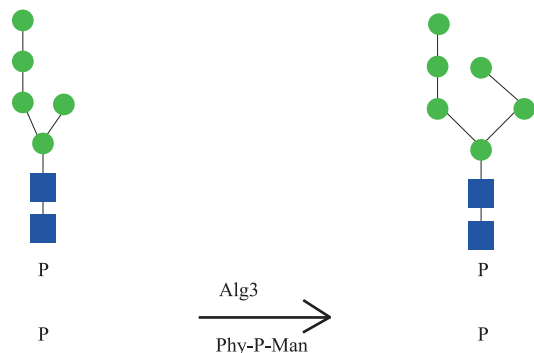
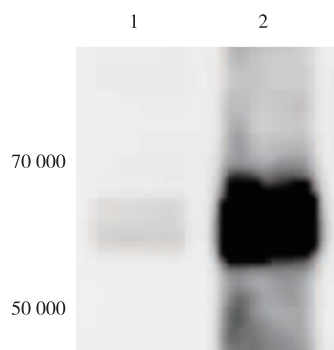


图 4 Alg3 催化 Phy-PP-M5 与 Phy-P-Man 生成 Phy-PP-M6 的反应示意图

Fig. 4 Alg3 catalyzes the transfer of mannose from Phy-P-Man to Phy-PP-M5 to produce Phy-PP-M6

首先,尝试原核表达酿酒酵母 Alg3,由于 Alg3 为多跨膜域蛋白质,在大肠杆菌中容易降解,因此在 N 端融合了促进真核膜蛋白表达的 Mistic 标签(M-Alg3)^[15]。图 5 的 Western blotting 结果显示相对于空载对照(条带 1)在 6.5×10^4 左右处,有一条明显的条带(条带 2),与 M-Alg3 预期的大小相一致,从而证明 M-Alg3 成功的在大肠杆菌中进行了表达。

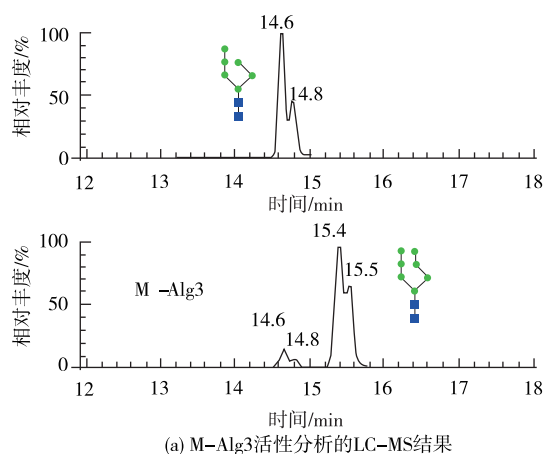


条带 1 为空载对照大肠杆菌膜成份;条带 2 为含有重组蛋白 M-Alg3 的大肠杆菌膜成份。

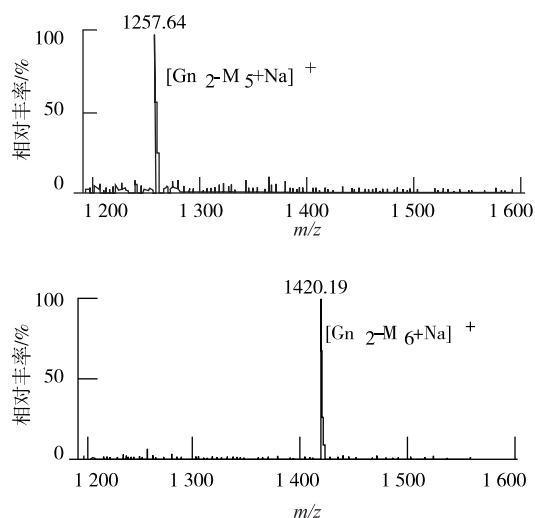
图 5 酵母重组蛋白 M-Alg3 的原核表达 Western blotting 图
Fig. 5 Western blot analysis of expression of yeast M-Alg3

接下来,利用含有重组蛋白 M-Alg3 的大肠杆菌膜成份催化 Phy-PP-M5 与 Phy-P-Man,反应结束后酸解去掉脂肪链部分,纯化糖链后 LC-MS 分析结果。如图 6(a)所示,与空载大肠杆菌膜成份比

较,含有重组蛋白 M-Alg3 的大肠杆菌膜成份催化后多了一组峰。ESI-MS 确证了 2 组峰分别起源于底物 Phy-PP-M5 (14.6,14.8) 和产物 Phy-PP-M6 (15.4,15.5)(图 6(b))。综上证明 Phy-P-Man 能够被 Alg3 所催化应用到 N-糖基化途径研究。



(a) M-Alg3 活性分析的 LC-MS 结果



(a) 图中底物(14.6,14.8)和产物(15.4,15.5)的糖链加钠相对分子质量
(b) ESI-MS 分析

(a) 上面为在反应中加入空载对照大肠杆菌膜成份;下面为加入含有重组蛋白 M-Alg3 的大肠杆菌膜成份。注:底物和产物的糖链结构标记在图片中。(b) 上面为底物加钠的相对分子质量:1257.64 ($\text{Gn}_2\text{-M}_5\text{+Na}^+$);下面为产物加钠的相对分子质量:1420.19 ($\text{Gn}_2\text{-M}_6\text{+Na}^+$)。

图 6 Phy-P-Man 用于重组蛋白 M-Alg3 的催化反应
Fig. 6 Activity detection of recombinant M-Alg3 using Phy-P-Man as a donor

3 结 语

Dpm1 为所有真核生物的必须基因,人体 Dpm1 发生突变会导致严重的先天性糖基化缺陷综合症

(CDG)^[23]。本研究获得了纯化的酵母 Dpm1 蛋白,并鉴定了重要的 DXD motif,有可能跟 Mg^{2+} 结合参与催化。未来的研究将利用纯化的蛋白质,获得 Dpm1 蛋白的晶体结构,解释其催化机制,更重要的是,结构信息的获得对于理解 CDG 发病的分子机制具有重要的意义。另外,本研究中通过 Dpm1 将 Phy-P 与 GDP-Man 催化合成了 Phy-P-Man。Phy-P-Man 相对于天然结构 Dol-P-Man 具有结构简单,水溶性好等优点,并且 Phy-P-Man 能够被 Alg3 所催化应用到 N-糖基化途径研究。另外,N-糖基化途径中 Alg3 反应后,Alg9 和 Alg12 催化的后三步的反应形

成高甘露糖结构 (Dol-PP-M9) 也是以 Dol-P-Man 为底物供体^[2]。接下来的研究将进一步地以 Phy-P-Man 为底物供体期望能够体外合成 Phy-PP-M9 结构。同样的,Phy-P-Man 将来也可应用于 GPI 锚定化、O-及 C-甘露糖基化的研究。特别是在人体中 ER 腔内的甘露糖基化修饰途径中的酶发生突变将会导致严重的先天性糖基化缺陷综合症 (CDG)^[24],我们合成的 Phy-P-Man 作为这些酶的底物,将会应用于对 CDG 相关突变酶的活性检测乃至开发出衡量疾病严重程度的定量方法。

参考文献:

- [1] MOREMEN K W, TIEMEYER M, NAIRN A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2012, 13(7): 448-462.
- [2] AEBI M. N-linked protein glycosylation in the ER[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research**, 2013, 1833(11): 2430-2437.
- [3] PAULICK M G, BERTOZZI C R. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins [J]. **Biochemistry**, 2008, 47(27): 6991-7000.
- [4] MANYA H, CHIBA A, YOSHIDA A, et al. Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004, 101(2): 500-505.
- [5] DOUCEY M A, HESS D, CACAN R, et al. Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor[J]. **Molecular Biology of the Cell**, 1998, 9(2): 291-300.
- [6] MAEDA Y, KINOSHITA T. Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation[J]. **Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects**, 2008, 1780(6): 861-868.
- [7] BANERJEE D K, ZHANG Z, BAKSI K, et al. Dolichol phosphate mannose synthase: a glycosyltransferase with unity in molecular diversities[J]. **Glycoconjugate Journal**, 2017, 34(4): 1-13.
- [8] TANNER W, JUNG P, BEHRENS N H. Dolicholmonophosphates: mannosyl acceptors in a particulate in vitro system of *S. cerevisiae*[J]. **Febs Letters**, 1971, 16(4): 245-248.
- [9] RICHARDS J B, HEMMING F W. The transfer of mannose from guanosine diphosphate mannose to dolichol phosphate and protein by pig liver endoplasmic reticulum[J]. **Biochemical Journal**, 1972, 130(1): 77-93.
- [10] ORLEAN P, ALBRIGHT C, ROBBINS P W. Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1988, 263(33): 17499.
- [11] SCHUTZBACH J S, ZIMMERMAN J W, FORSEE W T. The purification and characterization of recombinant yeast dolichyl-phosphate-mannose synthase. Site-directed mutagenesis of the putative dolichol recognition sequence[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1993, 268(32): 24190-24196.
- [12] BURGOS J, HEMMING F, PENNOCK J, et al. Dolichol: a naturally-occurring C100 isoprenoid alcohol[J]. **Biochemical Journal**, 1963, 88(3): 470-482.
- [13] WILSON I, WEBBERLEY M, REVERS L, et al. Dolichol is not a necessary moiety for lipid-linked oligosaccharide substrates of the mannosyltransferases involved in in vitro N-linked-oligosaccharide assembly[J]. **Biochemical Journal**, 1995, 310(3): 909-916.
- [14] HO S N, HUNT H D, HORTON R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction

- [J]. *Gene*, 1989, 77(1):51-59.
- [15] ROOSILD T P, GREENWALD J, VEGA M, et al. NMR structure of mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression[J]. *Science*, 2005, 307(5713):1317-1321.
- [16] FLITSCH S L, PINCHES H L, TAYLOR J P, et al. Chemo-enzymatic synthesis of a lipid-linked core trisaccharide of N-linked glycoproteins[J]. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1992, (16):2087-2093.
- [17] LI S T, NING W, SHA X, et al. 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.
- [18] LI S T, WANG N, XU X X, et al. Alternative routes for synthesis of N-linked glycans by Alg2 mannosyltransferase[J]. *The FASEB Journal*, 2018, 32(5):2492-2506.
- [19] SHARMA C B, BABCZINSKI P, LEHLE L, et al. The role of dolicholmonophosphate in Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 46(1):35-41.
- [20] BABCZINSKI P, HASELBECK A, TANNER W. Yeast mannosyl transferases requiring dolichyl phosphate and dolichyl phosphate mannose as substrate. Partial purification and characterization of the solubilized enzyme[J]. *Febs Journal*, 1980, 105(3):509-515.
- [21] GLOSTER T M. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 28(1):131-141.
- [22] AEBI M, GASSENHUBER J, DOMDEY H, et al. Cloning and characterization of the ALG3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Glycobiology*, 1996, 6(4):439-444.
- [23] KIM S, WESTPHAL V, SRIKRISHNA G, et al. Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ic (CDG-Ic)[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105(2):191-198.
- [24] JONES M A, HEGDE M R. Congenital disorders of glycosylation[M]. Springer International Publishing, 2016.

科技信息

欧盟批准由黑曲霉产生的 3-植酸酶作为仔猪等饲料添加剂

2020 年 2 月 7 日, 欧盟发布条例(EU)2020/172, 批准由黑曲霉(*Aspergillus niger*)(CBS 101.672)产生的 3-植酸酶(3-phytase)作为仔猪等的饲料添加剂, 本条例自发布之日起第 20 天生效。

该添加剂所属类别为“动物技术性添加剂”, 功能组别为“消化增强剂”; 识别号为 4a1600; 用于仔猪(哺乳和断奶)、母猪时在含水率 12%全价饲料中的最大用量活性单位为 500 FTU/kg; 用于猪育肥时在含水率 12%全价饲料中的最大用量活性单位为 100 FTU/kg; 用于鸡育肥、产蛋或繁殖时在含水率 12%全价饲料中的最大用量活性单位为 375 FTU/kg; 用于产蛋鸡、火鸡育肥、火鸡产蛋和种鸡、观赏鸟类和除鸭以外的所有小型鸟类时在含水率 12%全价饲料中的最大用量活性单位为 250 FTU/kg; 用于鸭时在含水率 12%全价饲料中的最大用量活性单位为 300 FTU/kg; 批准期限至 2030 年 2 月 27 日。

[信息来源] 厦门 WTO/TBT-SPS 通报咨询工作站. 欧盟批准由黑曲霉产生的 3-植酸酶作为仔猪等饲料添加剂 [EB/OL]. (2020-2-7). <http://swj.xm.gov.cn/xmtbt-sps/show.asp?id=61277>