

β -N-乙酰葡萄糖苷内切酶 Endo S 异源表达及发酵优化

杨 敏, 赵 恺, 濮晶晶, 洪皓飞, 赵鑫锐, 吴志猛*

(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: Endo S(EC 3.2.1.96)是一种来源于化脓链球菌的 β -N-乙酰葡萄糖苷内切酶,可以特异性水解免疫球蛋白 G(IgG)可结晶区(Fc 片段)N 糖链。为实现其高效表达,本研究构建 endo S 重组表达大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET28a-endo S,并验证表达蛋白糖苷水解活性,在摇瓶水平单因素优化蛋白质表达,考察了基础培养基种类、碳源、氮源、无机盐、培养基初始 pH、发酵温度和时间等因素对产酶的影响,确定最优发酵培养基组成为(g/L):酵母粉 10.0,甘油 4.0,牛肉浸膏 25.4,NaCl 5.0,pH 8.0,最优培养条件为:20 °C诱导表达 24 h,蛋白表达量为 225 mg/L 发酵液,是优化前的 4.5 倍,同时也是目前报道最高表达量的 5.6 倍。

关键词: β -N-乙酰葡萄糖苷内切酶 endo S;重组大肠杆菌;异源表达;发酵优化

中图分类号: Q 81 文章编号:1673-1689(2020)05-0043-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.007

Heterologous Expression and Fermentation Optimization of Endo S from *Streptococcus pyogenes*

YANG Min, ZHAO Kai, PU Jingjing, HONG Haofei, ZHAO xinrui, WU Zhimeng*

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Endo S (EC 3.2.1.96) is a β -N-acetylglucosaminidases from *Streptococcus pyogenes*, which can specifically hydrolyze the Fc N-glycan of immunoglobulin G (IgG). In this study, recombinant plasmid BL21 (DE3)/pET28a-endo S was constructed and the protein was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells with confirmed enzymatic activity. Then, single-factor optimization, including screening of basal mediums, nitrogen and carbon sources, mineral salts, expression temperature and time, and initial pH of cultural medium, was performed at shake flask level to express the Endo S in a high level. Under the optimized medium (beef extract 25.4 g/L, yeast powder 10.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, glycerol 4.0 g/L, pH 8.0) and condition (induced by 0.25 mM IPTG at 20 °C for 24 h), the yield of recombinant enzyme was 225 mg/L after purification by Ni-resin affinity chromatography, which was 3.5 times higher than that before optimization and 5.6 fold higher than

收稿日期: 2018-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(21472070);江苏省特聘教授项目(2014);江苏省“六大人才高峰”项目(2014-SWYY-017)。

* 通信作者: 吴志猛(1976—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事糖类药物化学方面的研究。E-mail: zwu@jiangnan.edu.cn

the highest yield reported.

Keywords: endo S, recombinant *E. coli*, heterologous expression, fermentation optimization

Endo S (EC 3.2.1.96) 是一种来源于化脓链球菌的 β -N-乙酰葡萄糖苷内切酶, 属于糖苷水解酶GH18家族。其主要的生物学功能是特异性水解免疫球蛋白G(IgG)可结晶区(Fc片段)N糖链, 作用位点为N糖链核心五糖中两个N-乙酰葡萄糖胺之间的糖苷键^[1]。由于IgG抗体糖基化修饰影响抗体介导的细胞毒作用(ADCC)及补体依赖的细胞毒作用等一系列免疫反应^[2-4], endo S逐步被开发应用于自身免疫疾病治疗^[5-7]和抗体糖基修饰功能化改造^[8-10]。随着endo S应用的增多, 对其需求量也越来越大, 但是目前关于endo S异源表达发酵优化研究较少, 在一定程度上限制了endo S的应用。

2001年, Mattias Collin等第一次利用pET30a载体克隆了完整的endo S基因, 并在BL21(DE3) pLys中成功表达, 但是未实现蛋白质纯化, 也未对其产量进行报道^[1]; 随后该课题组又利用载体pGEX表达了与谷胱甘肽转移酶(GST)标签融合表达的endo S, 纯化后并把GST标签切除得到endo S纯蛋白质, 其表达量未报道^[11]; 2012年, Wei Huang等报道使用上述表达体系BL21(DE3)-pGEX-GST-endo S在以LB为发酵培养基, 0.1 mmol/L IPTG、25 °C诱导表达16 h后蛋白质产量为40 mg/L发酵液^[9]。同年, Good-fellow等以pGEX-4T-1为载体, BL21(DE3)为宿主表达了密码子优化后的GST-endo S, 产量大约10 mg/L发酵液^[12]。2013年, Trastoy等人在C端融合霍乱弧菌MARTX毒素半胱氨酸蛋白酶结构域(his6-CPD)的载体pCPD上表达endo S, 宿主同样为BL21(DE3), 通过镍柱纯化, 肌醇六磷酸处理最后得到endo S蛋白, 同样蛋白质表达情况未进行报道^[13]。以上关于endo S表达的研究多以获得蛋白质为目的, 未对蛋白质表达进行优化且已报道产量不高。

作者构建了endo S外源表达重组大肠杆菌BL21(DE3)/pET28a-endo S, 并在摇瓶水平优化重组菌发酵产酶条件, 使endo S表达量得到大幅提升。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株及质粒

表达宿主*Escherichia coli*

BL21 (DE3): 由作者所在实验室保存提供; 质粒pET28a: 购自Novagen有限公司; 模板质粒pET30a-endo S: 由上海药物所黄蔚课题组提供。

1.1.2 培养基

1) LB培养基(g/L) 酵母粉5.0, 蛋白胨10.0, NaCl 10.0。

2) TB培养基 蛋白胨12.0 g, 酵母提取物24.0 g, 甘油4.0 mL, 900 mL去离子水溶解后高压灭菌。冷却至60 °C后, 加入100 mL灭菌的含1.7 mol/L KH_2PO_4 和7.2 mol/L K_2HPO_4 的溶液混匀。

3) SOB培养基(g/L) 酵母粉5.0, 蛋白胨20.0, NaCl 0.5, KCl 0.2。

4) 2×YT培养基(g/L) 酵母粉10.0, 蛋白胨16.0, NaCl 5.0; pH 7.0。

5) SB培养基(g/L) 酵母粉20.0, 蛋白胨30.0, MOPS 10.0; pH 7.0。

1.1.3 引物和主要试剂 Endo S基因和pET28a空载扩增引物见表1。质粒提取试剂盒: 购自上海生工生物工程有限公司; 胶回收试剂盒: 购自赛默飞世尔科技; T₄ DNA聚合酶: 购自大连TaKaRa公司; his-tag蛋白纯化磁珠: 购自苏州海狸生物医学工程有限公司; Nu PAGE预制胶: 购自Invitrogen; 唾液酸糖肽SGP: 自提取; 其他试剂: 均为进口或国产分析纯。

表1 PCR引物

Table 1 Primers for endo S and vector cloning

引物名称	引物序列(5'-3')
endo S-F	AGATATACCATGGCGAAGAGAAGACAGTTCAGGTTTCAG
endo S-R	GATCCTCAGTGCTGCTGATGATGATGTTTCTTCAGCAGCTGGCG
28a-F	GAAACATCATCATCACCACCACTGAGGTCCGAATTCCGAGCTC
28a-R	AACTGTCTTCTCTTCGCCCATGGTATATCTCCTTCT

1.2 实验方法

1.2.1 Endo S基因的克隆及表达载体的构建 以质粒pET30a-endo S为模板, 用表1中正反向引物通过PCR扩增endo S基因和pET28a载体。首先用T₄ DNA聚合酶消化扩增得到线性载体及目的基因, 按表2所

示加入反应体系,反应温度22 ℃,时间45 min。反应结束后,在上述体系中迅速加入1 μ L dCTP(100 μ mol/L)混匀终止反应,放置在冰上,加入10 μ L退火缓冲液(5 $\times$),于PCR仪中退火:75 ℃处理10 min,然后每8秒降低0.1~25 ℃,退火完成,柱回收。柱回收完成后,限制性内切酶DpnI处理回收片段去除模板质粒,37 ℃反应1 h,转化预先融化的BL21(DE3)感受态细胞,涂布卡纳抗性平板37 ℃倒置培养过夜,挑选单菌落进行菌落PCR,最后挑选阳性克隆子送至公司测序,将测序正确的菌株制成甘油菌-80 ℃保存。

表 2 T_4 DNA聚合酶处理反应体系

Table 2 Reaction system of DNA treated with T_4 polymerase

成分	质量或体积
DNA 片段(载体与基因等摩尔数混合)	2 μ g
5 $\times T_4$ DNA 聚合酶缓冲液	8 μ L
T_4 DNA 聚合酶	0.2 μ L
ddH ₂ O	上述总体积不足 40 μ L, 加入 ddH ₂ O 补足至 40 μ L

1.2.2 糖苷内切酶endo S初步表达 挑取保藏的重组甘油菌接种至液体LB培养基(含终质量浓度10 μ g/mL的卡纳霉素),37 ℃、250 r/min过夜培养。将上述种子液以4%接种体积分数接入TB发酵培养基,37 ℃、250 r/min培养至OD为0.6,加入终浓度250 μ mol/L的IPTG于30 ℃诱导12 h。发酵液9 000 r/min离心3 min,弃上清液,加入10 mmol/L、pH 8.0的 Tris-HCl 缓冲液(含500 mmol/L NaCl)重悬菌体,碾磨仪破碎,设定程序为:频率60 Hz,工作1 min间隔30 s,8个循环。菌体破碎后于4 ℃、9 000 r/min离心20 min除去菌体碎片,上清液即为粗酶液。蛋白质纯化步骤参照BeaverBeads™组氨酸标签蛋白质纯化磁珠使用说明,蛋白质洗脱液利用截留相对分子质量30 000的超滤管(Millipore)进行浓缩脱盐处理。

1.2.3 菌体生物量测定 采用比色法,将菌液稀释一定倍数于波长600 nm处测定OD值。

$OD_{600}=OD\text{读数}\times\text{稀释倍数}$ 。

1.2.4 蛋白质浓度测定 采用考马斯亮蓝法(Bradford)测定蛋白质浓度。以牛血清白蛋白(BSA)为标准品制作标准曲线。

1.2.5 蛋白质电泳 12 μ L蛋白质样品与4 μ L Nu PAGE® LDS Sample Buffer(4 $\times$)混合均匀,99 ℃变

性10 min。蛋白胶为Nu PAGE预制胶(分离胶质量浓度12 g/dL),电泳缓冲液为pH 7.3的NuPAGE® MES SDS电泳缓冲液,每孔上样量10 μ L,电压120 V电泳2 h左右。

1.2.6 糖苷内切酶活性鉴定 以唾液酸糖肽SGP为底物,反应体系见表3。37 ℃反应,HPLC检测条件为:DIKMA C18-A反向色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm),柱温40 ℃,214 nm检测,梯度洗脱条件见表4。

表 3 Endo S催化唾液酸糖肽SGP水解反应体系

Table 3 Reaction system of SGP hydrolysis catalyzed by endo S

反应体系(200 μ L)	体积/ μ L	最终浓度
PBS buffer(pH 6.3,0.1 mol/L)	100	0.05 mol/L
endo S(1.1 mg/mL)	20	0.11 mg/mL
SGP (5 mg/mL)	80	2 mg/mL

表 4 梯度洗脱条件

Table 4 Gradient elution condition

时间/min	流速/(mL/min)	水/(0.1% TFA)	乙腈/(0.1%TFA)
0	1	98	2
15	1	95	5
30	1	10	90
32	1	98	2
40	1	98	2

1.2.7 糖苷内切酶endo S表达优化

1) 基础培养基筛选 在1.2.2的基础上,选用5种培养基作为初始发酵培养基,分别为LB、TB、SB、2 $\times$ YT和SOB培养基,30 ℃诱导12 h后,振荡混匀,测定菌体浓度,取5 mL发酵液离心收集菌体,800 μ L缓冲液重悬,破壁离心,收集上清液,500 μ L纯化磁珠结合目的蛋白质,洗涤,最后用150 μ L体积10 mmol/L、pH 8.0 Tris-HCl缓冲液(含500 mmol/L NaCl和500 mmol/L咪唑)洗脱蛋白质测定表达量。

2) 氮源对菌体生长及酶表达的影响 去除基础培养基中的氮源,分别加入与基础培养基中氮含量相等的各类氮源(蛋白胨工业级胰蛋白胨、工业级牛肉浸膏、酪蛋白、柠檬酸三铵、氯化铵、硫酸铵、鱼粉蛋白胨、牛肉浸膏、大豆蛋白胨、尿素)进行培养,条件同上。

3) 碳源对菌体生长及酶表达的影响 以上述氮源优化不加碳源的基础培养基为对照,加入与初始TB发酵培养基中碳含量相等的各类碳源(糊精、可溶性淀粉、乳糖、半乳糖、蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、甘油)进行培养,条件同上。

4) 无机盐对菌体生长及酶表达的影响 以上述碳氮源优化后的基础培养基设置对照组,再分别在上述优化培养基中加入终浓度为1 mmol/L的各种无机盐(CaCl₂、CuSO₄、FeSO₄、CoCl₂、MnSO₄、LiCl、ZnCl₂、MgSO₄、NiSO₄)进行培养,条件同上。

5) 培养基其余组分的影响 以只含优化后氮源的培养基作对照,分别加入酵母粉、NaCl和甘油,培养条件同上。

6) 发酵温度和时间对菌体生长及酶表达影响 以上述最终优化培养基作为发酵培养基,在1.2.2基础上,诱导表达温度设置16、20、26、30、37℃共5个梯度,分别诱导4、8、12、24、36 h后测定菌体量和蛋白质表达量。

7) 培养基pH对菌体生长及酶表达的影响 调节优化后培养基初始pH值为5、6、7、8、9,按照1.2.2所述以及上述优化发酵条件进行培养,测定菌体量和蛋白质表达量。

2 结果与分析

2.1 Endo S基因和pET28a载体的克隆

采用特异性引物endo S-F/R、28a-F/R引物,经PCR扩增,成功克隆出长度2 900 bp左右endo S基因和5 300 bp左右的线性载体,对目的条带进行胶回收并测定回收DNA浓度,回收后片段电泳见图1。

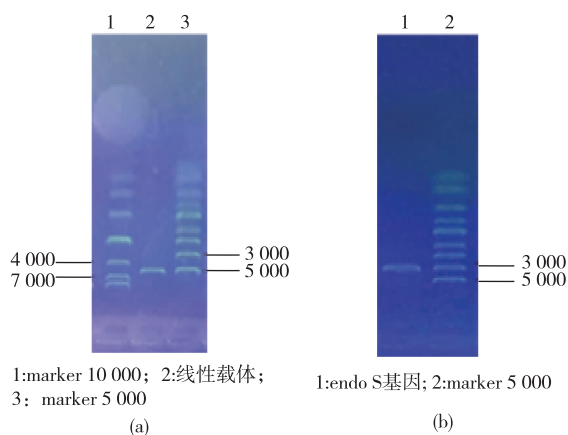


图1 PCR扩增产物胶回收电泳图

Fig. 1 PCR amplification of DNA

2.2 重组载体的构建

通过不依赖连接反应的克隆方法(LIC)实现endo S基因与线性载体重组,在没有dNTP存在情况下,利用了T4 DNA聚合酶3'-5'端的外切酶活性以及大肠杆菌的自我修复机制,具体见图2。基因和载

体等摩尔数混合,T₄ DNA聚合酶从3'-5'端开始对基因和线性载体上的同源片段进行消化,退火后载体与基因上的同源臂互补配对,形成含有缺口的质粒,转入大肠杆菌后在大肠杆菌中得到修复形成完整环状质粒。通过抗性平板筛选和菌落PCR,将扩增到与目的基因大小一致条带的阳性克隆送至公司测序分析,测序结果与endo S基因序列一致,说明endo S基因成功连接至pET28a载体。

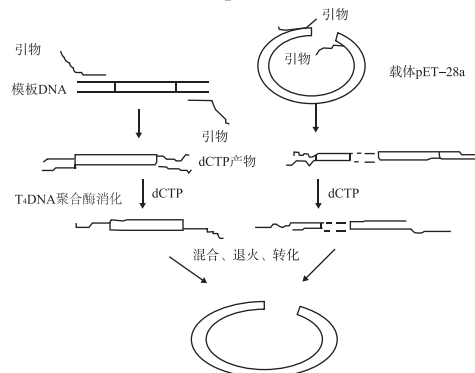
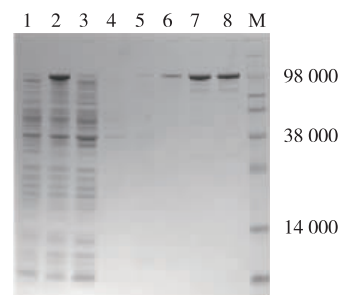


图2 质粒构建示意图

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid

2.3 Endo S表达及纯化

重组表达菌株构建完成后,对endo S进行初步诱导表达。设置不添加诱导剂IPTG的空白对照,见图3。SDS-PAGE分析可以发现,与endo S大小108 000相吻合的目的条带,初步表达蛋白质产量大约为50 mg/L发酵液。



1:空白对照;2:发酵上清液;3:纯化结合后上清液;4: 0 mmol/L咪唑洗脱;5: 20 mmol/L咪唑洗脱;6: 40 mmol/L咪唑洗脱;7: 80 mmol/L咪唑洗脱;8: 500 mmol/L咪唑洗脱。

图3 重组endo S表达SDS-PAGE分析图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of endo S expression

2.4 Endo S酶活验证

唾液酸糖肽SGP是一种来源于鸡蛋黄的N糖肽,是endo S天然小分子底物。以SGP为底物验证endo S的糖苷内切酶活性,反应示意图见图4。HPLC检测反应进程见图5。反应1 h后保留时间在15.5 min的底物

SGP峰1明显下降,同时在保留时间17.2 min出现一个新峰2,飞行质谱(MALDI-TOF MS)分析该新峰物质相对分子质量为863.286,与SGP糖链水解后的产

物2理论相对分子质量862.476 $[M+H]^+$ 相符,见图6,说明表达的endo S具有糖苷内切酶活性。

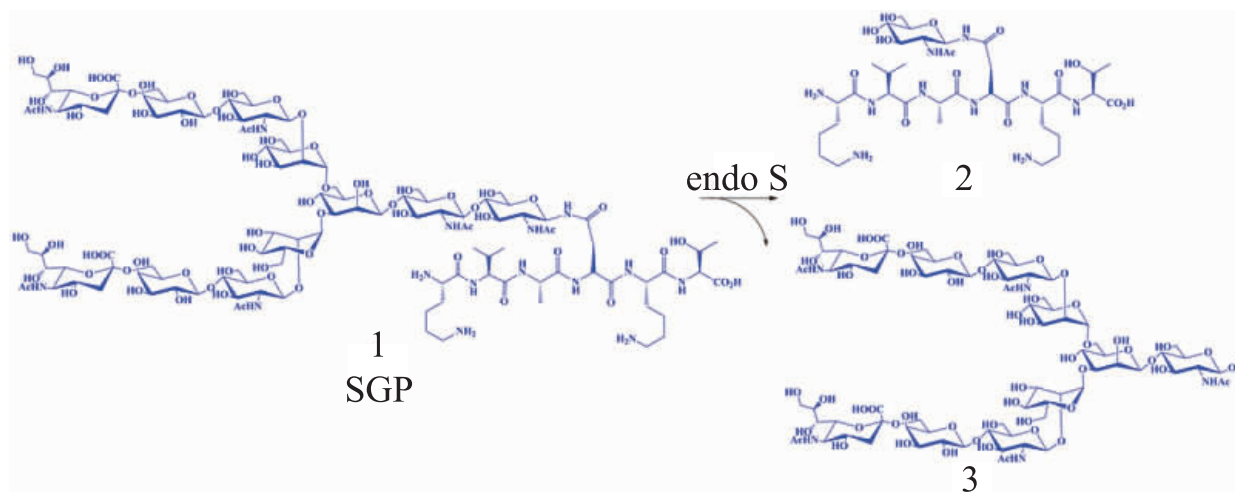
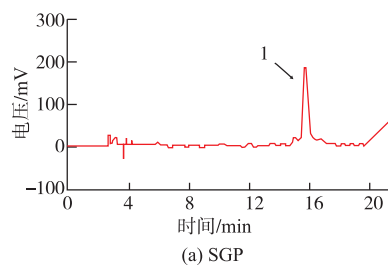
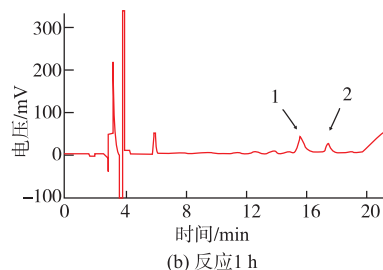


图 4 Endo S催化SGP水解示意图

Fig. 4 Reaction scheme of SGP hydrolysis



(a) SGP



(b) 反应1 h

图 5 SGP水解HPLC监测图

Fig. 5 HPLC diagrams of SGP hydrolysis

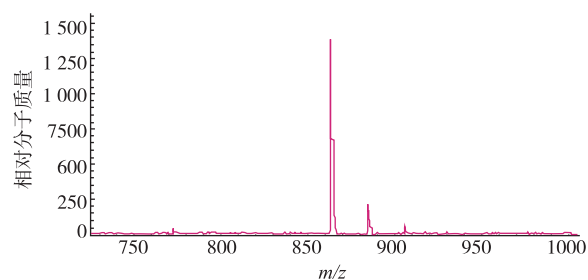


图 6 产物2 MALDI-TOF 质谱图

Fig. 6 MALDI-TOF MS of product 2

2.5 Endo S摇瓶水平表达优化

2.5.1 基础培养基筛选 首先选择5种基础发酵培养基,分别为LB、TB、SB、SOB和2×YT,对其进行筛选,考察对菌体生长和蛋白质表达的影响,结果见图7。不同培养基对菌体浓度及蛋白质表达有显著影响,TB培养基最利于菌体生长,2×YT培养基虽然菌体生长情况没有TB培养基好,蛋白质表达量却是5种培养基中最高的,考虑到本研究主要目的是对蛋白质表达量进行优化,因此最终选择2×YT作为基础培养基。

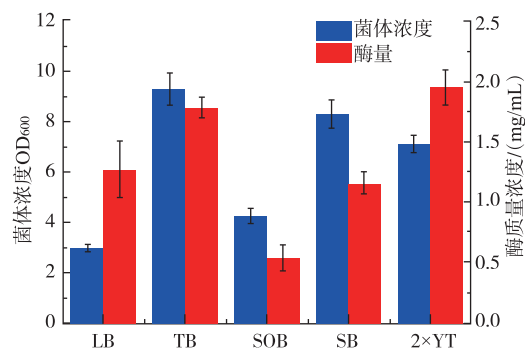


图 7 基础培养基筛选

Fig. 7 Screening of basal mediums

2.5.2 氮源种类优化 氮源是微生物主要营养物质之一,是构成生命物质核酸、蛋白质的主要元素。分别在基础培养基中加入氮含量相等的蛋白胨、工

业级牛肉浸膏、工业胰蛋白胨、酪蛋白、柠檬酸三铵、氯化铵、鱼粉蛋白胨、牛肉浸膏、大豆蛋白胨、尿素这十种氮源,菌体生长和蛋白质表达情况见图8。可以发现相比于菌体生长,氮源种类对蛋白质表达影响更大,有机氮源比无机氮源更有利于蛋白质表达,其中牛肉浸膏作为氮源时蛋白质表达量最高,因此最终选择牛肉浸膏作为氮源。

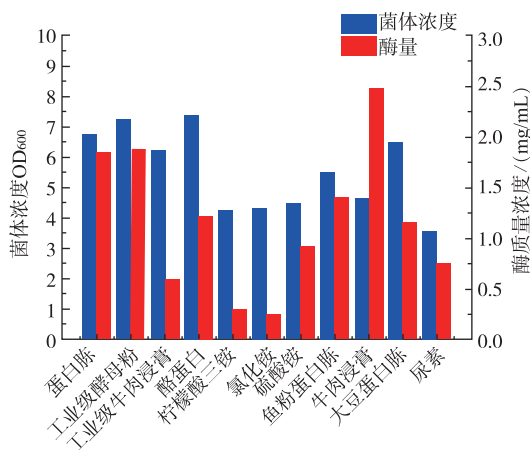


图 8 培养基氮源优化

Fig. 8 Optimization of nitrogen sources

2.5.3 碳源种类优化 碳源是发酵培养基必不可少的组成成分之一,为菌体生长和蛋白质表达提供碳骨架,微生物细胞碳含量约占其干重的50%。分别在培养基中添加与初始TB发酵培养基碳含量相等的糊精、可溶性淀粉、乳糖、半乳糖等一系列碳源,结果见图9。当以甘油为碳源时,无论是菌体生长情况还是蛋白质表达量,相比其他碳源都具有明显优势,可能是由于甘油相对于其他碳源更利于菌体吸收,因此选择添加甘油作为碳源。

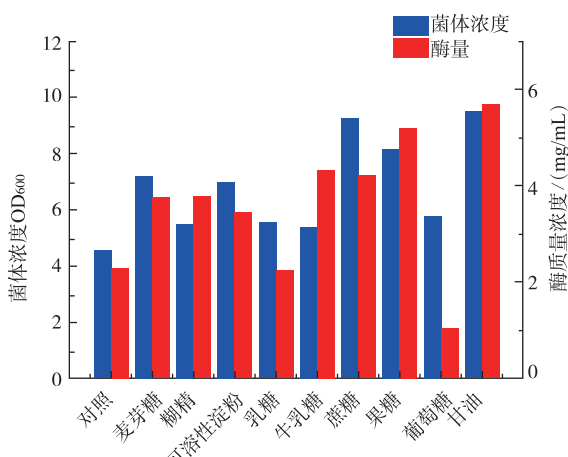


图 9 培养基碳源优化

Fig. 9 Optimization of carbon sources

2.5.4 无机盐的影响 无机盐在维持菌体生命活动中扮演着重要的角色,首先它是构成菌体的一般成分,其次它还是是一些酶的辅因子,起到调节酶活性的作用,另外无机盐还能维持细胞内外渗透压、调节pH值等。考虑到不同目的蛋白表达对无机盐的需求不一样,通过在培养基中添加终浓度1 mmol/L的CaCl₂、CuSO₄、FeSO₄、CoCl₂、MnSO₄、LiCl、ZnCl₂、MgSO₄、NiSO₄这9种无机盐考察其对菌体生长和蛋白质表达的影响,结果见图10。与对照组相比,这几种无机盐对菌体生长和蛋白质表达都没有促进作用,反而存在不同程度的抑制,因此不进行无机盐的添加。

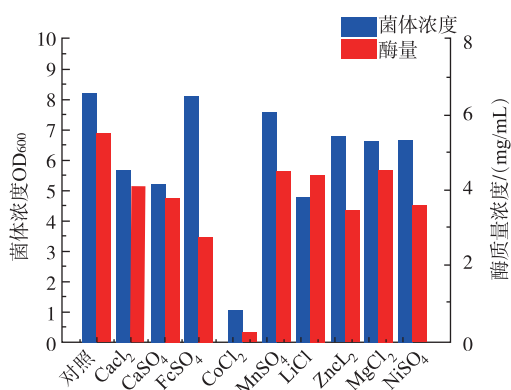


图 10 培养基无机盐优化

Fig. 10 Optimization of mineral salts

2.5.5 其他组分的影响 以只含优化后氮源的培养基作对照,分别加入其余3种组分酵母粉、甘油和NaCl进行发酵培养,结果见图11。可以发现酵母粉、NaCl和甘油都有利于蛋白质表达量的提高,对于菌体生长,除了NaCl没有明显的促进作用,酵母粉和甘油都能有效提高菌体浓度,因此选择保留上述优化培养基中的酵母粉和NaCl,也证明了前面优化结果的可靠性。

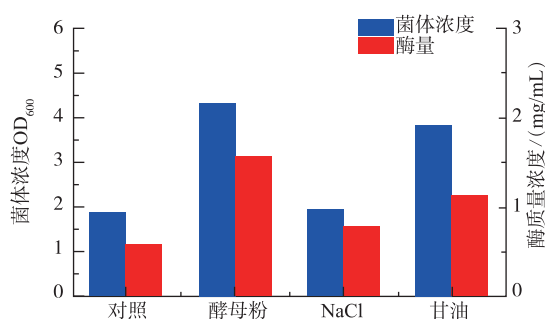


图 11 培养基其他组分的影响

Fig. 11 Effect of other components in the medium

2.5.6 发酵温度和发酵周期的影响 温度是影响微生物生长代谢的最重要因素之一。在一定范围内,温度升高有利于菌体生长繁殖,但是一般来说其最适生长温度不一定是其生理过程的最适温度,比如代谢产物的积累。在大肠杆菌蛋白质表达系统中,很多情况下提高诱导表达温度会导致蛋白质折叠不充分或错误折叠而以包涵体的形式出现,适当降低诱导温度、延长表达时间能够让蛋白质在翻译后有充分的时间进行正确折叠,减少包涵体的形成。进一步考察了诱导温度和发酵时间对重组菌生长以及 endo S 表达的影响,见图12。菌体生长发酵时间在12 h之内,随着发酵温度的升高,菌体浓度整体呈现增长的趋势。但是当发酵时间延长,相对高的发酵温度如30 ℃和37 ℃,反而不利于菌体积累;对于蛋白质表达,适当延长发酵时间有利于蛋白质的积累,发酵时间过长,表达的可溶性蛋白质反而减少,在20 ℃条件下诱导表达24 h酶表达量最高,因此选择该培养条件作为最终发酵条件。

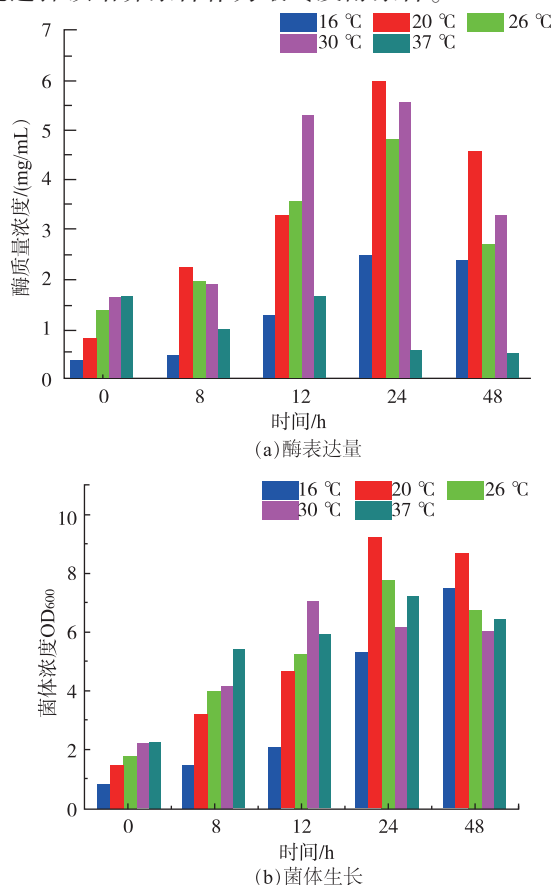


图 12 诱导温度和时间对酶表达量和菌体生长的影响

Fig. 12 Effect of temperature and time on protein expression and strain growth

2.5.7 发酵初始pH的影响 为考察培养基初始pH对菌体生长和蛋白质表达的影响,将上述优化培养基的pH调至5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,结果见图13。培养基pH值的改变对菌体生长影响不明显,但是对蛋白质表达影响较大,在pH 8.0时菌体蛋白质表达量最高,当pH值低于7.0或高于8.0,对蛋白质表达都有明显抑制,说明发酵培养基过酸过碱都不利于 endo S 的表达,因此选择调节发酵培养基初始pH值至8.0。

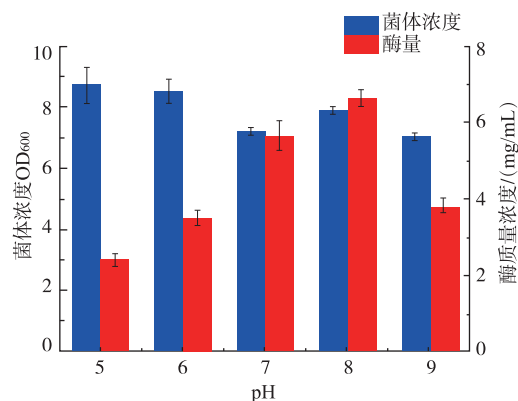


图 13 培养基初始pH的影响

Fig. 13 Effect of initial pH of cultural medium

2.5.8 摇瓶发酵优化结果验证 优化前发酵条件为:TB培养基,30 ℃诱导12 h,优化后的培养基组成如下(g/L):酵母粉10.0,甘油4.0,牛肉浸膏25.4,NaCl 5.0;pH 8.0,培养条件为20 ℃诱导表达24 h。分别以两种培养基和培养条件进行诱导表达,发酵结束后纯化测定蛋白质表达量,结果见图14。优化后蛋白质表达量为225 mg/L发酵液,相比优化前提高了3.5倍。

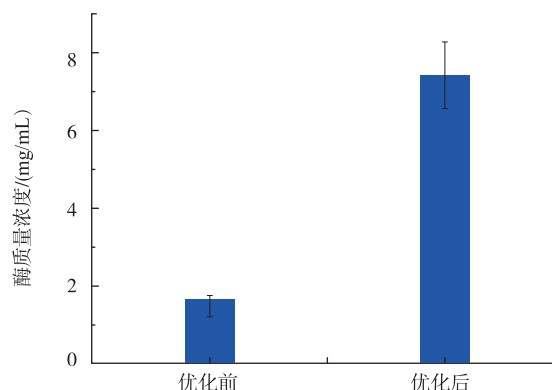


图 14 Endo S表达优化结果验证

Fig. 14 Optimization results of endo S expression

3 结 语

从2001年 endo S 被发现可以特异性水解IgG

上Fc片段N糖链,其逐渐被开发作为抗体糖基化功能改造工具酶和自身免疫疾病潜在药物。但近年关于endo S的研究多涉及基础理论和应用方面,关于表达发酵优化的研究很少,限制了其在抗体药物改造等方面的应用。因此,作者克隆了化脓链球菌来源的endo S基因,构建BL21(DE3)-pET28a-endo S

重组表达菌株,并验证表达蛋白糖苷内切酶活性,在摇瓶水平优化蛋白质表达,确定最优发酵培养基成分(g/L):酵母粉10.0,甘油4.0,牛肉浸膏25.4,NaCl 5.0;pH 8.0。最优培养条件:20℃诱导表达24 h,最终蛋白质表达量达225 mg/L发酵液,是优化前的4.5倍,同时也是目前报道最高产量的5.6倍。

参考文献:

- [1] COLLIN M, OLSEN A. EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG[J]. **EMBO Journal**, 2001, 20(12): 3046-3055.
- [2] MIMURA Y, CHURCH S, GHIRLANDO R, et al. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms[J]. **Molecular Immunology**, 2000, 37(12): 697-706.
- [3] KUBOTA T, NIWA R, SATOH M, et al. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions[J]. **Cancer Science**, 2009, 100(9): 1566-1572.
- [4] HOUDE D, PENG Y, BERKOWITZ S A, et al. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding[J]. **Mol Cell Proteomics**, 2010, 9(8): 1716-1728.
- [5] ALLHORN M, COLLIN M. Sugar-free antibodies-the bacterial solution to autoimmunity[J]. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2009, 1173(1): 664-669.
- [6] COLLIN M, SHANNON O, BJORCK L. IgG glycan hydrolysis by a bacterial enzyme as a therapy against autoimmune conditions [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2008, 105(11): 4265-4270.
- [7] COLLIN M, BJORCK L. Toward clinical use of the IgG specific enzymes ideS and endoS against antibody-mediated diseases[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2017, 1535: 339-351.
- [8] GIDDENS J P, WANG L X. Chemoenzymatic glyco-engineering of monoclonal antibodies[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2015, 1321: 375-387.
- [9] HUANG W, GIDDENS J, FAN S Q, et al. Chemoenzymatic glycoengineering of intact IgG antibodies for gain of functions[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2012, 134(29): 12308-12318.
- [10] KUROGOCHI M, MORI M, OSUMI K, et al. Glycoengineered monoclonal antibodies with homogeneous glycan (M3, G0, G2, and A2) using a chemoenzymatic approach have different affinities for fcγRIIIa and variable antibody-dependent cellular cytotoxicity activities[J]. **Plos One**, 2015, 10(7): e0132848.
- [11] COLLIN M, OLSEN A. Effect of speB and endoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins[J]. **Infection and Immunity**, 2001, 69(11): 7187-7189.
- [12] GOODFELLOW J J, BARUAH K, YAMAMOTO K, et al. An endoglycosidase with alternative glycan specificity allows broadened glycoprotein remodelling[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2012, 134(19): 8030-8033.
- [13] TRASTOY B, LOMINO J V, WANG L X, et al. Liquid-liquid diffusion crystallization improves the X-ray diffraction of EndoS, an endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptococcus pyogenes* with activity on human IgG[J]. **Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology Crystallization Communications**, 2013, 69(12): 1405-1410.