

人源 β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶 I (*hGnT-I*) 的原核表达与活性鉴定

陆天天, 王宁, 高晓冬

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶 I (*hGnT-I*) 功能为在高尔基体中向糖蛋白上的 N-寡糖 M5GN2 结构添加一个 β -1,2 连接的 N-乙酰葡萄糖胺。为大量获得具有活性的 *hGnT-I* 蛋白, 构建了重组表达质粒 pET28a-MGAT1 Δ TM 并将其在大肠杆菌 Rosetta 菌株中表达。对诱导条件进行优化后, 将获得的可溶性重组蛋白 His-*hGnT-I* Δ TM 进行镍柱亲和纯化并通过高效液相色谱 (HPLC) 检测其体外活性和底物特异性。结果表明, 大肠杆菌 ROSETTA 体系可以成功表达可溶性重组 *hGnT-I* 蛋白; 该蛋白质相对分子质量约为 42 800, 在体外反应中具有相应的糖基转移酶活性; 除天然糖链底物 M5GN2 外, 该蛋白质可以识别非天然糖链底物 M3GN2; 产物经酶切反应验证, 证明该蛋白质催化添加一个 β 糖苷键连接的 N-乙酰葡萄糖胺的反应。本研究所开发的原核表达体系可以大量制备纯化的功能性重组 *hGnT-I* 蛋白, 以应用于该蛋白质的性质研究以及 N-糖链的体外合成。

关键词: β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶 I; 大肠杆菌; 重组表达; 活性检测

中图分类号: Q 819 文章编号: 1673-1689(2021)10-0056-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.10.008

Prokaryotic Expression and Activity Identification of Human Alpha-1,3-Mannosyl-Glycoprotein 2-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase (*hGnT-I*)

LU Tiantian, WANG Ning, GAO Xiaodong

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

Abstract: Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (*hGnT-I*) works in Golgi glycosylation pathway and adds a β -1,2 linked GlcNAc to Man5Gn2 structure on glycoproteins. The recombinant plasmid pET28a-MGAT1 Δ TM was constructed and expressed in the *Escherichia coli* Rosetta strain to obtain the active *hGnT-I* in large quantity. After optimizing the induction conditions, the soluble recombinant protein His-*hGnT-I* Δ TM was successfully obtained and then purified by Ni-NTA column. The *in vitro* activity assay and substrate specificity detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results suggested that the recombinant protein *hGnT-I* Δ TM with the molecular weight of 42 800 could be successfully expressed in the ROSETTA

收稿日期: 2019-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(21778023, 31971216); 江苏省自然科学基金项目(BK20170174); 江南大学自主科研计划青年基金(JUSRP11727)。

* 通信作者: 高晓冬(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事糖生物学与糖化学方面的研究。E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

system of *E. coli*, showing the corresponding glycosyltransferase activity *in vitro*. Except for its natural substrate M5GN2, hGnT-I Δ TM also showed comparable glycosyltransferase activity against the non-natural substrate M3GN2. The products were verified by enzymatic digestion with β -N-acetyl-glucosaminidase, indicating that the protein catalyzed the addition of a β glycoside bond linked to N-acetyl-glucosamine in the reaction. The prokaryotic expression system developed in this study could be used to produce a large number of purified functional recombinant hGnT-I Δ TM, which could be used to the further investigation of this protein and the *in vitro* chemo-enzymatic synthesis of N-glycans.

Keywords: GnT-I, *Escherichia coli*, recombinant expression, activity assay

哺乳动物细胞中,蛋白质的 N-糖基化修饰在内质网和高尔基体中完成,N-糖链结构依次经高甘露糖型、杂合型、最后生成成熟形态的复合型糖链,该过程对糖蛋白的结构稳定、半衰期和分子识别功能等具有关键作用^[1]。 β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶 I (GnT-I)是 N-糖链加工过程中的重要蛋白质,它是一个定位在高尔基体上的膜蛋白,功能为以 UDP-GlcNAc 为供体,向 M5GN2 寡糖的核心五糖结构中 α 1-3 连接的甘露糖上添加一个 β 1-2 连接的 GlcNAc^[2-3],该步骤是 N-糖链由高甘露糖型向杂合型或复合型转变的关键步骤^[4-5]。

人源 GnT-I(hGnT-I)由 445 个氨基酸组成,相对分子质量约为 50 900,1990 年成功筛选到其基因 MGAT1^[2]。GnT-I 蛋白已经成功在哺乳动物细胞^[2]以及大肠杆菌中完成可溶性表达^[6-7],目前市售 GnT-I 来自 Novus Biologicals 公司^[8],为哺乳动物细胞体系表达的可溶性 GnT-I 蛋白。但哺乳动物细胞蛋白质表达量低,体系构建昂贵,导致该商业蛋白质产品价格很高,一定程度上阻碍了 GnT-I 的进一步研究和技术开发。原核表达体系虽然蛋白质产量高,但由于 hGnT-I 是带有一个跨膜域的膜蛋白,采用原核系统表达可能产生蛋白质降解、形成包涵体、所表达蛋白质无活性等问题。现有报道中的原核表达案例,均在 GnT-I 上融合了一段较长的蛋白质标签,如 Seki 等人报道在该蛋白质 N 端融合麦芽糖结合蛋白(MBP)以辅助其功能性表达与纯化^[7],虽然得到了具有活性的蛋白质,但大部分蛋白质形成包涵体存在于沉淀里,大大降低了其应用性。

在本研究中,作者构建了用于表达截除 N 端跨膜域的重组 hGnT-I 的质粒,将其导入含有稀有密码子的大肠杆菌 Rosetta DE3 菌株中进行可溶性表

达,随后优化了诱导表达条件并对纯化的蛋白质进行了活性研究。作者完成了重组 hGnT-I 大量功能性表达体系的建立,为进一步研究该蛋白质的性质及其在糖链合成中的应用打下了基础^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌菌种 Rosetta DE3 和表达载体 pET28a 质粒:购于德国 Novagen 公司;人基因组文库:购于美国 Invitrogen 公司;引物合成及基因测序:由华大基因完成。

1.1.2 培养基 LB 培养基:酵母提取物 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂粉 20 g/L(固体培养基),121 °C 灭菌 20 min 后备用;

TB 培养基:酵母提取物 24 g/L,胰蛋白胨 12 g/L,磷酸氢二钾 9.4 g/L,磷酸二氢钾 2.2 g/L,甘油 4 mL/L,121 °C 灭菌 20 min 后备用。

1.1.3 主要试剂 高速高保真 PCR 酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、DNA Ligation Kit: 购于日本 TaKaRa 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG): 购于美国 Sigma 公司; 氯霉素、卡那霉素: 购于美国 Gibco 公司; 镍亲和小柱(HisTrap HP, 1 mL): 购于美国 GE Healthcare 公司; 免疫印迹检测所用抗体 Anti-His Mouse IgG 和 Goat Anti-Mouse HRP: 购于碧云天生物技术; 荧光标记的糖链 M3GN2-Asn-Fmoc 和 GN2M3GN2-Asn-Fmoc: 获赠于日本产业技术综合研究所(AIST); 核苷酸单糖 UDP-GlcNAc: 购于青岛曙格公司; β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 (β -N-acetylglucosaminidase S): 购于美国 NEB 公司; 其他常用试剂均购于中国国药集团。

1.1.4 主要仪器 高效液相色谱仪 (Waters 2695) 和荧光检测器 (Waters 2475): 美国沃特世公司; 色谱柱 (Amide, 150 mm×4.6 mm, 3 μm): 安捷伦科技有限公司; 蛋白质电泳以及免疫印迹转移槽: 美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 MGAT1 基因的克隆及重组质粒 pET28a-MGAT1ΔTM 的构建 根据 Genebank 数据库人源 MGAT1 基因编码序列, 结合 UniPort 数据库对蛋白质 GnT-I 跨膜区域的预测, 人源 MGAT1 基因编码序列长 1 335 bp, 前 87 bp 编码一段面向胞质的片段以及跨膜域, 故从第 88 bp 开始设计 PCR 引物, 并在 5' 端分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 引物序列见表 1。以人基因组文库中包含 MGAT1 基因的单克隆质粒为模板进行扩增, 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳鉴定并进行 PCR 产物纯化, 得到目的基因片段。将目的基因和 pET28a 空载质粒分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶回收后以 20 ng 目的基因、10 ng pET28a、5 μL Ligation Mix 体系在 25 °C 连接 15 min 后将连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 经 SOC 培养基在 37 °C 预培养 45 min 后, 涂布于 LB/Kan⁺/Cm⁺ (卡那霉素 50 μg/mL, 氯霉素 34 μg/mL) 平板上进行筛选。12 h 后从平板挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 将鉴定阳性的单克隆扩增并且提取质粒, 命名为 pET28a-MGAT1ΔTM。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称	序列(5'-3')
MGAT1-Fw	AAAAGGATCCACGCGCCAGCACC
MGAT1-Rv	AAAAAAGCTTCTAATTCCAGCTAGGATCATAGCCC

注: 划线部分为酶切位点

1.2.2 重组 *hGnT-I* 蛋白的诱导表达 将 pET28a-MGAT1ΔTM 重组质粒转化入大肠杆菌 Rosetta DE3 感受态细胞中, 涂布于 LB/Kan⁺/Cm⁺ 平板上, 于 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落接种于 5 mL LB/Kan⁺/Cm⁺ (卡那霉素 50 μg/mL, 氯霉素 34 μg/mL) 液体培养基中, 于 37 °C 培养 12 h; 后将培养基以 1:100 体积比接入 200 mL TB/Kan⁺/Cm⁺ (抗生素质量浓度同上) 液体培养基中, 于 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 时, 将培养基转移至 16 °C 摇床冷却 1 h, 加入终浓度为 100

μmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导表达 12 h。表达完成后于 4 °C、9 000 g 离心 3 min, 收集菌体, 弃尽培养液后于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 重组 *hGnT-I* 蛋白表达条件的优化 以 1.2.2 重组蛋白质的诱导表达为背景对蛋白质的表达条件进行优化。当重组菌扩大培养至 OD₆₀₀ 达到 0.8 时, 降温至 16 °C 后, 加入 100 μmol/L 的 IPTG, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、16 h 对菌液进行取样, 采用免疫印迹法对不同诱导时间的蛋白质表达水平进行检测; 采用相同的方法表达蛋白质, 加入不同浓度的 IPTG (10、50、100、200、500、1 000 μmol/L), 培养 10 h 后对菌液进行取样, 采用免疫印迹法对加入不同浓度诱导剂的样品进行蛋白质表达水平检测。

1.2.4 重组 *hGnT-I* 蛋白的纯化 将冷冻保存的菌体置于冰水中解冻 15 min, 加入 15 mL 的重悬缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH 8.0) 重悬菌体, 超声波破碎菌体 10 min, 于 4 °C、9 000 g 离心 45 min, 收集上清液蛋白质。将上清液用注射器上样至用重悬缓冲液平衡的镍亲和层析小柱, 并用含不同浓度咪唑 (20、60、250 mmol/L) 的重悬缓冲液洗脱, 收集洗脱液, 检测目的蛋白质。用 30 000 超滤离心管过滤含有重组 *hGnT-I* (His-*hGnT-I*ΔTM) 蛋白的洗脱液, 并加入 25 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.4) 洗涤 3 次, 得到浓缩蛋白质液, 置于 -80 °C 冰箱备用。

1.2.5 重组 *hGnT-I* 蛋白的活性检测 糖基化反应 (总体积 50 μL) 各组分如下: 1 μmol/L M5GN2-Asn -Fmoc, 0.1 mmol/L UDP -GlcNAc, 10 mmol/L MgCl₂, 0.1 mg/mL His-*hGnT-I*ΔTM 蛋白, 50 mmol/L MES-NaOH (pH 6.0)。反应体系在 37 °C 下孵育 1 h, 18 000 g 离心 5 min, 取上清液进行 HPLC 检测。流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 0.1 mol/L NH₄OAc。梯度: 0~5 min, 85% B; 5~35 min, 85%~50% B; 35~40 min, 50%~30% B; 40~45 min, 30%~85% B。荧光检测器激发波长 (ex): 295 nm; 发射波长 (em): 315 nm; 流量: 1.0 mL/min; 柱温 40 °C。

1.2.6 重组 *hGnT-I* 蛋白的底物特异性检测 底物特异性检测时, 除将底物更换为 M3GN2-Asn-Fmoc 外^[1], 使用的反应条件和检测方法与活性检测相同, 其中考虑到非天然底物的特异性问题, 可以适当延长反应孵育时间。

1.2.7 产物的酶切验证 对 1.2.5 和 1.2.6 中的反

应体系进行产物验证,方法如下:50 μ L 糖基化反应体系于 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,取 44 μ L 与 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶^[12](1 μ L)和 10 \times GlycoBuffer(5 μ L)混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h,18 000 g 离心 5 min,取上清液用 HPLC 检测产物。

2 结果与分析

2.1 hGnT-I 蛋白跨膜域结构分析

TMHMM 跨膜域预测图谱见图 1。可以看出, hGnT-I 在 N 端有一个跨膜域结构,结合 UniPort 蛋白质数据库的模拟预测可知,跨膜区域位于 7~29 位氨基酸,而 1~6 位氨基酸位于胞质侧。本研究设计截除前 87 bp 编码 1~29 位氨基酸的序列,只表达包含高尔基体腔内侧可溶性片段的 hGnT- Δ TM。

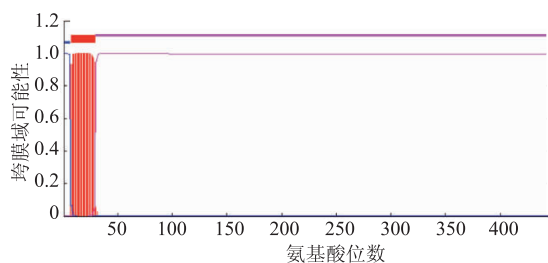


图 1 hGnT-I 蛋白的跨膜结构域预测

Fig. 1 Predicted transmembrane domain of hGnT-I

2.2 重组质粒 pET28a-MGAT1 Δ TM 的构建

表达质粒选用多克隆区域前后都有 6 \times His 标签的原核表达载体 pET28a,在蛋白质 N 端融合了一个 6 \times His 标签以进行后续纯化工作,重组质粒 pET28a-MGAT1 Δ TM 见图 2。

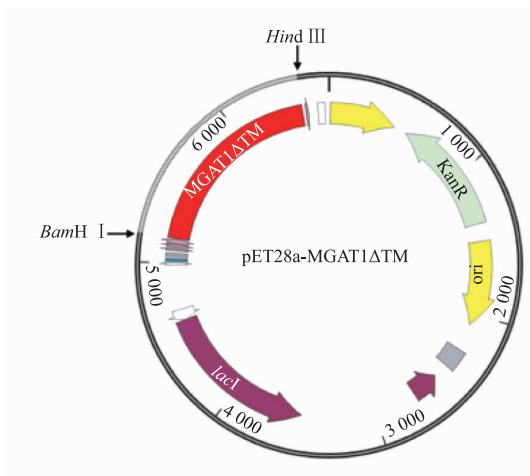
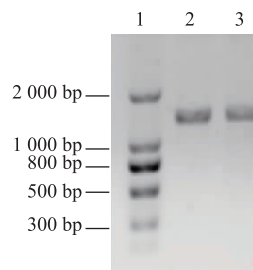


图 2 重组质粒 pET28a-MGAT1 Δ TM

Fig. 2 Recombinant expression plasmid pET28a-MGAT1 Δ TM

2.2.1 基因的扩增 PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析,13 00 bp 左右有明显条带,而截除前 87 bp 的目的基因 MGAT1 Δ TM 片段长度为 1 248 bp,与预期大小一致,见图 3。



1: DL2000; 2, 3: PCR 扩增的 MGAT1 Δ TM 基因。

图 3 MGAT1 Δ TM 目的基因 PCR 扩增结果电泳

Fig. 3 MGAT1 Δ TM gene PCR amplification

2.2.2 重组质粒 pET28a-MGAT1 Δ TM 菌落 PCR 验证及测序 经菌落 PCR 验证,所得质粒中至少 3 个单克隆扩增出 1 300 bp 左右的目的片段,见图 4。挑取该 3 个阳性菌落进行扩增与质粒提取和测序,测序结果与 Genbank 中去除前 87 bp 的 MGAT1 基因编码区域一致,表明重组质粒 pET28a-MGAT1 Δ TM 构建成功。

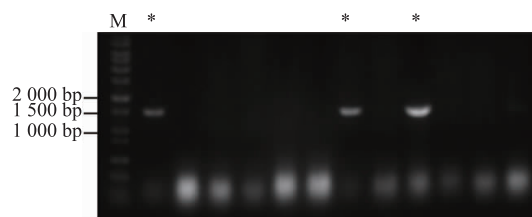
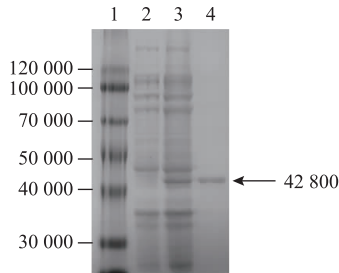


图 4 pET28a-MGAT1 Δ TM 重组质粒菌落 PCR 验证

Fig. 4 Colony PCR for pET28a-MGAT1 Δ TM plasmid construction

2.3 His-hGnT-I Δ TM 蛋白的表达与纯化

2.3.1 重组蛋白质的诱导表达和纯化 构建的重组质粒 pET28a-MGAT1 Δ TM 转化入大肠杆菌 Rosetta DE3 中诱导 12 h 后,收集菌体进行超声波破碎,离心得到上清液;将上清液用镍亲和层析柱纯化,收集含不同浓度咪唑(20、60、250 mmol/L)缓冲液的洗脱液。对不同蛋白质样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,结果见图 5。与未加入 IPTG 诱导的细胞裂解液相比,诱导后的样品在 42 800 左右位置出现诱导前样品未出现的条带,表明重组 hGnT-I 蛋白可溶性表达成功,相对分子质量约为 42 800,产率为 7.5 g/L,见图 5。



1: Blue Plus II; 2: 诱导前细胞裂解液; 3: 诱导后细胞裂解液; 4: 250 mmol/L咪唑洗脱液(蛋白质纯化)。

图5 重组蛋白 His-*hGnT-I*ΔTM 的表达与纯化

Fig. 5 Expression and purification of recombinant His-*hGnT-I*ΔTM protein

经过 SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色验证,目的蛋白质集中于含 250 mmol/L 咪唑的洗脱液中。将该部分洗脱液收集并用超速离心管过滤浓缩,通过反复用 HEPES-NaOH 缓冲液清洗后得到终质量浓度为 5.0 mg/mL 的重组 *hGnT-I* 蛋白。

2.3.2 重组蛋白质表达条件的优化 收集不同诱导条件下的菌体进行破碎裂解,直接将细胞裂解液作为样品进行免疫印迹法检测蛋白质表达程度,其中第一抗体为 Mouse Anti-His IgG, 第二抗体为 Goat Anti-mouse IgG,HRP。结果表明,在诱导开始 2 h 后,蛋白质开始逐渐表达,直到 10 h 后表达量基本趋于一致,12 h 后蛋白质表达量不再变化;采用优化过诱导时间 10 h 的进一步对加入的诱导剂浓度进行优化,结果表明,加入 100 μmol/L IPTG 比加入 50 μmol/L 可以使蛋白质表达量成倍增加,然而加入更高浓度的诱导剂并不能提高蛋白质的表达量,见图 6。

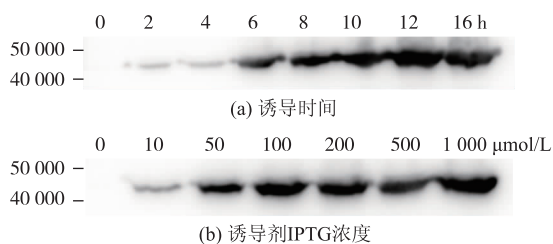


图6 重组 *hGnT-I* 蛋白表达条件的优化

Fig. 6 Optimization of the expression condition of *hGnT-I* protein

2.4 重组 *hGnT-I* 蛋白的性质鉴定

首先采用与天然底物类似的带荧光标签的 N-糖链 M5GN2-Asn-Fmoc 作为重组 *hGnT-I* 蛋白的底物,确认了其体外活性,见图 7。Stanly 等人也于

1990 年报道 *hGnT-I* 蛋白在体外可以识别 M3GN2, 因此也检测了重组蛋白对非天然底物 M3GN2-Asn-Fmoc 的特异性, 确认其可以作为重组 *hGnT-I* 的反应底物, 见图 8。反应产物经酶切验证为目标产物。

2.4.1 重组蛋白质活性检测 以 M5GN2-Asn-Fmoc 为底物, 体外糖基化反应体系离心取上清液后进行 HPLC 检测, 结果见图 7。反应体系中推测的糖链产物 GNM5GN2-Asn-Fmoc 较起始底物 M5GN2-Asn-Fmoc 有明显的偏移, 间隔时间约 1.2 min。说明重组 *hGnT-I* 蛋白成功以 UDP-GlcNAc 为糖基供体、M5GN2-Asn-Fmoc 为受体进行了糖基化反应, 生成了加上 1 个 GlcNAc 的产物糖链 GNM5GN2-Asn-Fmoc, 反应转化率为 100%。

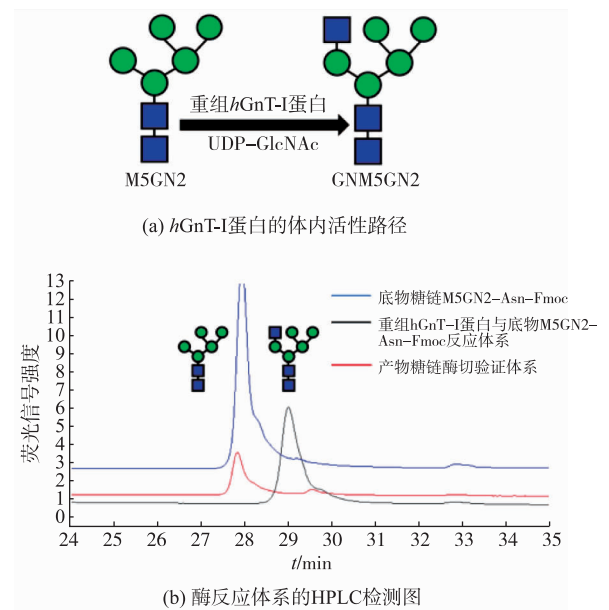


图7 重组 *hGnT-I* 蛋白对底物 M5GN2-Asn-Fmoc 的活性检测

Fig. 7 *hGnT-I* protein activity against M5GN2-Asn-Fmoc

2.4.2 重组蛋白底物特异性检测 以 M3GN2-Asn-Fmoc 为底物经过 1 h 或 2 h 反应, 从图 8 中可以看到, 1 h 反应体系中除了底物糖链 M3GN2-Asn-Fmoc 以外, 还出现了添加了 1 个 GlcNAc 的产物 GNM3GN2-Asn-Fmoc, 而在延长孵育时间至 2 h 的样品中则只能检测到产物 GNM3GN2-Asn-Fmoc。与标准糖链 GN2M3GN2-Asn-Fmoc 相比, 该产物在 HPLC 中的洗脱时间较短, 符合氨基柱以化

合物极性大小正向洗脱的顺序,说明重组 hGnT-I 蛋白可以识别非天然底物 M3GN2-Asn-Fmoc,但该酶促反应的效率低于天然底物。

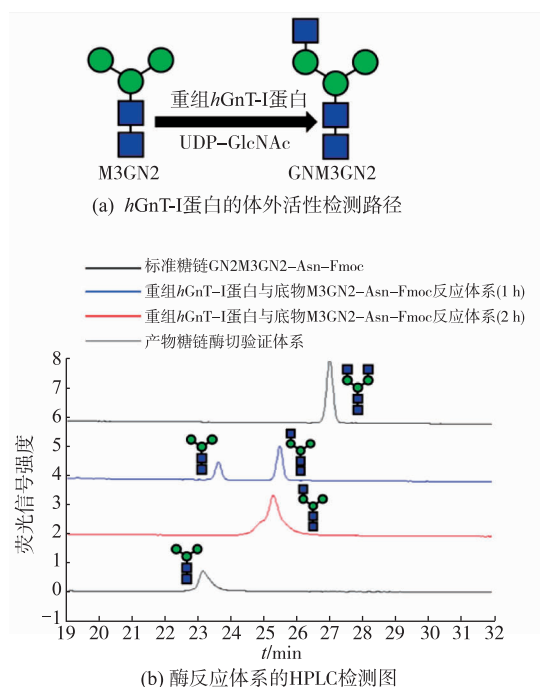


图 8 重组 hGnT-I 蛋白对底物 M3GN2-Asn-Fmoc 的活性检测

Fig. 8 hGnT-I protein activity against M3GN2-Asn-Fmoc

2.4.3 反应产物的酶切验证 将反应体系中蛋白质高温灭活后,加入 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶,经过 12 h 水解后对水解产物进行 HPLC 检测。结果显示,糖链产物 GNM5GN2-Asn-Fmoc 和 GNM3GN2-Asn-Fmoc 在糖苷酶的水解作用下,形成了未加上 GlcNAc 的底物 M5GN2-Asn-Fmoc 和 M3GN2-Asn-Fmoc。该结果证明重组 hGnT-I 蛋白催化的糖基化反应为向寡糖底物添加 β 糖苷键连接的 N-乙酰葡萄糖胺。

3 结语

作者成功构建了重组质粒 pET28a - MGAT1 Δ TM,利用大肠杆菌表达体系实现了截除跨膜域的 hGnT-I 的大量可溶性表达,并在镍柱纯化后对该蛋白质进行了体外活性测试。研究结果表明,该重组蛋白质对天然底物类似物 M5GN2-Asn-Fmoc 和非天然底物 M3GN2-Asn-Fmoc 均具有活性。通过对反应产物进行酶切验证,证明糖基化产物为一个由 β 糖苷键连接的 N-乙酰葡萄糖胺,说明该重组蛋白质的体外活性与体内活性一致。本研究克服了人源膜蛋白在原核体系表达易降解、易失活的难点,提供了大量获得活性重组 hGnT-I 蛋白的方法,为进一步研究其酶学性质以及糖链酶法合成相关技术提供了新的方法。

参考文献:

- [1] HELENIUS A, AEBI M. Intercellular functions of N-linked glycans[J]. **Science**, 2011, 291 : 2364-2369.
- [2] KUMAR R, YANG J, LARSEN R D, STANLEY P. Cloning and expression of N-acetylglucosaminyltransferase I, the medial Golgi transferase that initiates complex N-linked carbohydrate formation[J]. **PNAS**, 1990, 87(24) : 9948-9952.
- [3] HULL E, SARKAR M, SPRUIJT M P N, et al. Organization and localization to chromosome 5 of the human UDP-N-acetylglucosamine : alpha-3-D-mannoside beta-1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase I gene[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1991, 176(2) : 608-615.
- [4] LOFFE E, STANLY P. Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates[J]. **PNAS**, 1994, 91(2) : 728-732.
- [5] REN W W, JIN Z C, DONG W J, et al. Glycoengineering of HEK293 cells to produce high-mannose-type N-glycan structures[J]. **Journal of Biochemistry**, 2019, 166(3) : 245-258.
- [6] SARIBAS A S, JOHNSON K, LIU L, et al. Refolding of human β -1-2 GlcNAc transferase(GnTI) and the role of its unpaired Cys 121[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2007, 362 : 381-386.
- [7] FUJIYAMA K, IDO Y, MISAKI R, et al. Human N-acetylglucosaminyltransferase I. expression in *Escherichia coli* as a soluble enzyme, and application as an immobilized enzyme for the chemoenzymatic synthesis of N-linked oligosaccharides[J]. **Journal**

- of **Bioscience and Bioengineering**, 2001, 92(6):569-574.
- [8] WU Z L, ETHEN C M, PRATHER B, et al. Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay[J]. **Glycobiology**, 2011, 21(6):727-733.
- [9] WANG N, LI S T, LU T T, et al. Approaches towards the core pentasaccharide in N-linked glycans[J]. **Chinese Chemical Letters**, 2018, 29:35-39.
- [10] HAMILTON B S, WILSON J D, SHUMAKOVICH M A, et al. A library of chemically defined human N-glycans synthesized from microbial oligosaccharide presursors[J]. **Scientific Report**, 2017, 7(1):15907.
- [11] GELSLER C, JARVIS D L. Substrate specificities and intracellular distributions of three N-glycan processing enzymes functioning at a key branch point in the insect N-glycosylation pathway[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2012, 287(10):7084-7097.
- [12] WONG-MADDEN T S, LANDRY D. Purification and characterization of novel glycosidase from the bacterial genus xanthomonas[J]. **Glycobiology**, 1995, 5(1):19-28.

科 技 信 息

欧盟修订现有蓝莓和蔓越莓中丙噻肼的最大残留量

联邦公共服务 (FPS) 健康、食品链安全和环境代表比利时 (评估成员国, EMS) 提交了修改现有蓝莓和蔓越莓中的活性物质丙噻肼最大残留水平的请求 (MRL)。EMS 根据 (EC) No 396/2005 第 8 条起草了一份评估报告, 该报告已提交给欧盟委员会, 并于 2021 年 6 月 3 日转发给欧洲食品安全局 (EFSA)。EMS 提议将蓝莓和蔓越莓的现有 MRL 从 0.02 的定量限 (LOQ) 提高到 1.5 mg/kg。EFSA 根据 MRL 法规第 10 条的要求对申请和评估报告进行了评估。EFSA 得出结论, 在蓝莓和蔓越莓上提议修订丙噻肼的最大残留量不会导致消费者接触超过毒理学参考值, 因此不太可能对消费者的健康构成风险。

[信息来源] EFSA Journal. Modification of the existing maximum residue levels for proquinazid in blueberries and cranberries [EB/OL]. (2021-9-13). <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6835>