

论著·基础研究

ALG3 异常的先天性糖基化疾病相关突变蛋白活性的检测

罗冰洁, 李盛陶, 王 宁, 高晓冬

江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

[摘要] **目的**·研究 α -1,3-甘露糖转移酶 (α -1,3-mannosyltransferase, ALG3) 基因异常导致的先天性糖基化疾病 (ALG3-CDG) 相关突变蛋白的活性检测方法, 并检验其活性与疾病严重程度的关系。 **方法**·收集文献报道的 ALG3-CDG 患者 ALG3 蛋白 6 个突变位点 (I69T、W71R、G96R、M157K、R171Q 和 M209T), 同源比对人和酿酒酵母 ALG3 蛋白的氨基酸序列, 设计对应的酿酒酵母 ALG3 突变体 (I70T、Y72R、G98R、L157K、R171Q 和 M221T), 并在大肠埃希菌体系中表达。利用含有野生型 ALG3 或其突变蛋白的大肠埃希菌菌膜催化甘露糖基转移反应, 采用液相色谱-质谱联用技术, 以野生型蛋白催化活性为基准, 计算突变蛋白的相对活性。比较不同生存期患者对应突变蛋白的活性。 **结果**·ALG3-CDG 患者 6 个突变对应的酿酒酵母 ALG3 突变蛋白均在大肠埃希菌体系表达, 蛋白表达量与野生型基本一致。体外定量活性测试结果显示, 与野生型蛋白相比, I70T、Y72R、G98R、L157K、R171Q、M221T 突变蛋白的相对活性分别为 2.8%、4.9%、4.5%、17.2%、4.8%、22.3%。生存期大于 1 年患者对应的突变蛋白活性显著高于小于 1 年的患者 ($P=0.002$)。 **结论**·建立了 ALG3-CDG 相关酿酒酵母保守突变蛋白的体外定量活性检测方法, 为该病严重程度的预测提供了可能。

[关键词] 先天性糖基化疾病; 甘露糖转移酶; 液相色谱-质谱联用技术; 原核表达

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.11.004 **[中图分类号]** R596; Q789 **[文献标志码]** A

Detection of activity of mutant protein in ALG3-CDG

LUO Bing-jie, LI Sheng-tao, WANG Ning, GAO Xiao-dong

Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the activity detection method of α -1,3-mannosyltransferase (ALG3) mutant protein in congenital disorder of glycosylation (ALG3-CDG), and examine the relationship between the activity and the severity of disease. **Methods**·The mutation sites of the patients in the reports were I69T, W71R, G96R, M157K, R171Q and M209T, respectively. After homologous alignment of the amino acid sequences of *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ALG3, six yeast mutant proteins (I70T, Y72R, G98R, L157K, R171Q and M221T) related to ALG3-CDG were designed. These mutants were expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). Using *E. coli* membrane containing wild-type ALG3 or its mutant proteins as catalysts, the relative activities of mutant proteins were calculated by liquid chromatography tandem mass spectrometry based on the catalytic activity of wild type protein. The activities of corresponding mutations in the patients with different survival time were compared. **Results**·Six ALG3-CDG related *S. cerevisiae* conserved ALG3 mutant proteins were expressed in *E. coli* in the comparable protein expression levels with wild type ALG3. The *in vitro* quantitative activity assay of enzymes showed that compared with the wild type ALG3, the relative activities of the mutant proteins I70T, Y72R, G98R, L157K, R171Q and M221T were 2.8%, 4.9%, 4.5%, 17.2%, 4.8% and 22.3%, respectively. The corresponding mutation activity was significantly higher in the patients with survival longer than 1 year than that in the patients with survival less than 1 year ($P=0.002$). **Conclusion**·An *in vitro* quantitative method is established to measure the enzymatic activities of ALG3-CDG related *S. cerevisiae* ALG3 mutants, providing the possibility to predict the severity of ALG3-CDG.

[Key words] congenital disorder of glycosylation (CDG); mannosyltransferase; liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS); prokaryotic expression

先天性糖基化疾病 (congenital disorder of glycosylation, CDG) 是由糖链合成缺陷引起的先天性新陈代谢紊乱遗传病, 可能会导致严重的精神运动迟缓和多器官衰竭^[1-2], 大

多数 CDG 由糖基转移酶功能的异常引起。

α -1,3-甘露糖转移酶 (α -1,3-mannosyltransferase, ALG3) 基因编码的蛋白存在于内质网 (endoplasmic reticulum,

[基金项目] 国家自然科学基金 (21778023, 21807048); 江苏省自然科学基金 (BK20170174); 中央高校自主科研计划 (JUSRP11727); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目。

[作者简介] 罗冰洁 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: 513354158@qq.com。

[通信作者] 高晓冬, 电子信箱: xdgao@jiangnan.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (21778023, 21807048); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20170174); Fundamental Research Fund for the Central University (JUSRP11727); Top-notch Academic Program of Jiangsu Higher Education Institution.

[Corresponding Author] GAO Xiao-dong, E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn.



ER) 腔内, 具有多个跨膜域, 以多萜醇磷酸甘露糖 (dolichylphosphomannose, Dol-P-Man) 为供体、Dol-PP-GlcNAc2-Man5 (DP-Gn2-M5) 为受体^[3], 在 N-糖链 α -1,6 连接的甘露糖上添加 α -1,3 连接的甘露糖残基, 是蛋白 N-糖基化前体多萜醇寡糖 (dolichol-linked oligosaccharide, DLO) 合成途径中的重要蛋白。人体 ALG3 蛋白发生突变会使 DLO 合成受阻, 积累糖链中间体 GlcNAc2-Man5 (Gn2-M5) 而导致蛋白糖基化异常, 引起 ALG3-CDG。ALG3-CDG 患者的共同临床特征包括畸形特征 (小头畸形、面部畸形等)、精神运动迟缓、癫痫和体质量增加缓慢^[4-6]、肌张力异常和舞蹈病等^[6-7]。研究^[4-5, 8-9]发现, 不同 ALG3-CDG 患者表现出的疾病严重程度, 包括患者的寿命等均存在差异, 其根本原因是 ALG3 蛋白发生突变的位点不同而导致酶活性下降的程度不同。

DLO 合成途径在几乎所有真核生物内质网中具有保守性, 因此可以使用酵母作为模板研究人类 CDG 相关 ALG 突变蛋白的致病性。将酵母 *ALG* 基因突变或敲除后, 由于蛋白合成过程异常会导致酵母出现温度敏感的生长缺陷, 再将 CDG 相关的人 ALG 突变体转入生长缺陷的酵母中, 根据其能否回补酵母的生长缺陷来确定此突变位点是否具有致病性^[10-11]。然而研究者发现, *ALG3* 基因敲除的酵母菌没有明显生长缺陷, 需要同时敲除寡糖基转移酶 (oligosaccharyl transferase, OST) 的一个亚基, 才能使酵母出现一定的温度敏感生长缺陷, 再通过回补实验来衡量 ALG3 突变蛋白的活性与 ALG3-CDG 疾病严重程度的相关性^[12-15]。此方法操作复杂且灵敏度低, 导致许多 ALG3-CDG 相关突变的致病性尚未得到确认^[4-5, 16], 因此开发一种直观、简洁的检测方法具有非常重要的意义和应用前景。

本实验室前期研究^[17]利用大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 表达了酵母 ALG1 蛋白及其突变体, 开发了体外 ALG1 蛋白活性的液相色谱-质谱联用技术 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS) 定量检测方法, 并利用该方法对 ALG1-CDG 患者的疾病严重程度进行了分析。随后为了探究 ALG3-CDG 患者 ALG3 突变蛋白活性与疾病的关系, 首先在酿酒酵母来源的 ALG3 蛋白 N-端引入相对分子质量约 13 000 的 Mystic 标签, 促进其异源表达^[18], 然后在大肠埃希菌体系中表达了 Mystic-ALG3 重组蛋白, 并利用 LC-MS 的方法测定了该蛋白的活性^[19-20]。在此基础上, 本研究根据文献^[4-5, 8-9]报道的 ALG3-CDG 患者的蛋白突变情况对酿酒酵母 ALG3 中的对应保守性氨基酸进行了定点突变, 探究突变蛋白活性与 ALG3-CDG 疾病严重程度之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及菌株

PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、DNA Ligation Kit (Mighty Mix)、 $2 \times$ Taq Master Mix 购于宝日生物技术有限公司 (北京) 有限公司, PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、柱式质粒 DNA 小量提取试剂盒、卡那霉素、氯霉素、脱脂奶粉、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)、Immun-Star™ HRP 化学发光试剂盒、固相萃取空柱管 (6 mL) 购于上海碧云天生物技术有限公司, DNA 标志物 (1 kb plus DNA ladder)、蛋白标志物 (blue plus II protein marker)、一抗 (anti-His mouse monoclonal antibody)、辣根过氧化物酶偶联的二抗 [goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate] 购于北京全式金生物技术有限公司, 固相萃取填料 (supelclean ENVI-carb slurry) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司, GDP-甘露糖 (GDP-Man) 购于青岛糖科学生物技术有限公司, 其他常用试剂及培养基购于国药集团化学试剂有限公司。化学合成中使用到的蛋白质均由本实验室前期合成^[17, 20-21]。

大肠埃希菌生长培养基为 LB (Luria-Bertani) 培养基和 TB (Terrific-Broth) 培养基, 均由本实验室自行配置。抗性培养基是在上述灭菌培养基冷却至 55 ℃ 以下后, 额外添加 50 μ g/mL 卡那霉素和 / 或 34 μ g/mL 氯霉素获得。

本研究所用到的大肠埃希菌 XL-10 Gold 和 Rosetta (DE3) 均为本实验室保藏菌株。质粒 pET28a-Mistic-ALG3 由本实验室构建^[19]。

1.2 主要仪器

PCR 仪 (T100 Thermal Cycler)、SDS-PAGE 凝胶电泳仪 (Mini-PROTEAN Tetra System)、蛋白转膜仪 (Trans-Blot Turbo) 均购于美国 Bio-Rad 公司, 凝胶成像系统 (Tanon-5200Multi) 购于上海天能科技有限公司, 高速冷冻离心机 (CT15RE) 购于日本 HITACHI 公司, 超高效液相色谱酰胺柱 (UPLC BEH Amide Column) 购于美国 Waters 公司, 超高效液相色谱仪 (Dionex Ultimate 3000 UPLC)、三重四级杆液质联用仪 (TSQ Quantum Ultra EMR) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 突变位点的确定 收集文献^[4-5, 8-9]已报道的 ALG3-

CDG 患者 ALG3 蛋白 6 个突变位点 (I69T、W71R、G96R、M157K、R171Q 和 M209T), 用 Clustal X 软件对人源 ALG3 突变蛋白与酿酒酵母 ALG3 进行同源比对, 发现这 6 个突

变位点均在酿酒酵母 ALG3 中保守, 氨基酸序列比对结果见图 1。并以此为依据设计了对应的酿酒酵母 ALG3 突变体 (I70T、Y72R、G98R、L157K、R171Q 和 M221T)。

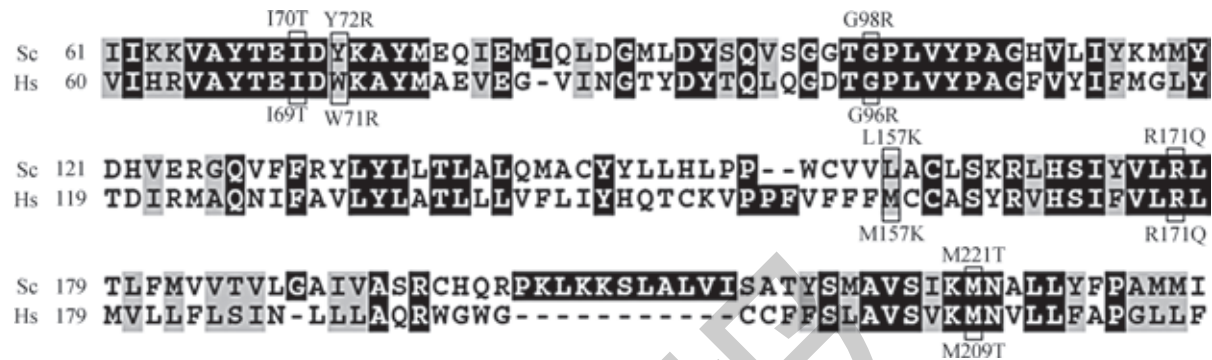


图 1 酿酒酵母和人源 ALG3 氨基酸序列同源比对
Fig 1 Alignment of ALG3 in *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Homo sapiens* (Hs)

1.3.2 融合 PCR 构建点突变质粒 本研究所有突变质粒的构建参照文献 [22] 所述的融合 PCR 方法。根据 QuikChange Primer Design 网站在线设计突变引物, 以质粒 pET28a-Mistic-ALG3 为模板进行第 1 次 PCR。将第 1 次 PCR 产物经纯化后作为引物, 进行第 2 次 PCR。所得 PCR 产物按照常规方法进行后续纯化、酶切、连接、转化、挑取单克隆提质粒测序验证。Mistic-ALG3 突变蛋白的引物见表 1。

表 1 Mistic-ALG3 点突变引物
Tab 1 Primers of mutations for Mistic-ALG3

Primer	Sequence (5' → 3')
ALG3-I70T-3	CGCCTTGTAATCGGTCTCTGTGTAAGCTACCTCTTAAT
ALG3-Y72R-3	CTGCTCCATGTACGCCTTGCGATCGATCTCTGTGTAAGCT
ALG3-G98R-3	CACCAGCGGGCGCGTTCCACCAC
ALG3-L157K-3	TTAGAGAGGCACGCCTTGACCACACACCAGG
ALG3-R171Q-3	GAAGCAATCATTGAATAACTGTAGCACGTAATAGAGTG
ALG3-M221T-3	TACAACAGCGCATTCTGCTTAATGCTCAGCCATACT

1.3.3 蛋白表达及大肠埃希菌菌膜成分的制备 将 pET28a-Mistic-ALG3 质粒及各突变质粒转化到感受态大肠埃希菌 Rosetta (DE3) 中, 37 °C 培养过夜后, 挑取单菌落接种至 5 mL 抗性 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床过夜培养 (约 12 h) 后, 按照体积的 1% 接种于抗性 TB 培养基, 37 °C、220 r/min 摇床培养至吸光度 [D (600 nm)] 为 0.6 ~ 1.0, 待培养基温度降至 16 °C 后添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 20 h, 收集菌体于离心管中, 用适量预冷的缓冲液 [25 mmol/L Tris/HCl (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl] 吹打混匀菌体; 将离

心管置于冰水混合物中超声破碎, 4 000 × g、4 °C 离心 15 min 后, 取上清液于 100 000 × g、4 °C 离心, 用提膜缓冲液 [50 mmol/L 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES, pH 6.5)、30% 甘油] 重悬沉淀, 使之成为均一溶液即得到含 Mistic-ALG3 及其突变蛋白的大肠埃希菌菌膜成分 [19]。

1.3.4 Western blotting 检测 取合适浓度的蛋白样品与蛋白上样缓冲液混合煮 5 min, 高速离心 5 ~ 10 min 后取上清液上样于 12% SDS-PAGE 凝胶, 200 V 恒压电泳 1 h。电泳结束后半干法转膜, 封闭 1 h 后加入一抗 (抗 His 标签) (1:2 000), 室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次后加入二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 最后用化学发光法显色。

1.3.5 Mistic-ALG3 突变蛋白活性的测定 ① 底物受体 Phytanyl-PP-GlcNAc2-Man5 (PP-Gn2-M5) 的制备 [21]: 以 Phytanyl-PP-GlcNAc2 (PP-Gn2) 为底物受体, GDP-Man 为糖基供体, 用纯化的 Alg1 Δ TM、含有 TRX-Alg2 的大肠埃希菌菌膜和纯化的 Alg11 Δ TM 进行催化。反应体系: PP-Gn2 (50 μmol/L)、GDP-Man (2 mmol/L)、Alg1 Δ TM (80 ng/mL)、含有 TRX-Alg2 的大肠埃希菌菌膜 (200 μg/mL)、反应缓冲液 40 μL, 30 °C 静止反应 12 h 后, 加入纯化的 Alg11 Δ TM (100 μg/mL), 继续在 30 °C 静止反应 12 h, 得到 ALG3 的反应底物 PP-Gn2-M5。② 糖基供体 Phytanyl-Phosphate-Mannose (Phy-P-Man) 的制备 [19]: 以 Phytanyl-Phosphate (Phy-P) 为底物受体, GDP-Man 为糖基供体, 用含有长核苷基磷酸-甘露糖转移酶多肽 1 (dohchylphosphate mannosyltransferase polypeptide 1, DPM1) 的大肠埃希菌菌膜进行催化。反应体系: 50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.5)、10 mmol/L MgCl₂、1% NP-40、

20 mmol/L Phy-P、50 mmol/L GDP-Man、含有 DPM1 的大肠埃希菌菌膜 (100 mg/mL), 30 °C 静止反应 12 h 后, 用薄层色谱 (TLC) 检测 Phy-P 是否完全转化为 Phy-P-Man。

③ Mystic-ALG3 及突变蛋白的酶活测试: 以 PP-Gn2-M5 为底物受体, Phy-P-Man 为糖基供体, 提取含有 Mystic-ALG3 或突变蛋白的大肠埃希菌菌膜进行催化反应。反应体系: 在生成 PP-Gn2-M5 的体系中加入 2 mmol/L Phy-P-Man、10 mmol/L MnCl_2 、含 Mystic-ALG3 或突变蛋白 (20 mg/mL) 的大肠埃希菌菌膜, 30 °C 静止反应 20 h。

1.3.6 糖链的纯化 参照文献^[19,21]的方法, 在酶活测试的反应体系中加入 40 mmol/L HCl 300 μL , 100 °C 1 h 终止反应。用 1 mL 固相萃取柱纯化糖链, 步骤如下: 分别用甲醇 4 mL、100% 乙腈 4 mL、50% 乙腈 4 mL、2% 乙腈 10 mL 平衡柱子; 取 2% 乙腈 0.7 mL 加入到反应体系中震荡混合均匀, 高速离心 1 min, 取上清液上样于固相萃取柱, 重复该步骤 1 次; 之后用 2% 乙腈 15 mL 分 3 次洗脱杂质; 最后用 1.4 mL 30% 乙腈洗脱得到目的糖链, 收集到的溶液经真空冷冻干燥后, 加入 40 μL 去离子水溶解。

1.3.7 LC-MS 检测条件 采用 LC-MS 的方法检测产物糖链^[20], 其中流动相 A 为乙腈、B 为超纯水, 使用超高效液相色谱酰胺柱分离, 柱温 40 °C。液相条件为: 0 ~ 2 min, 20% B; 2 ~ 15 min, 20% ~ 50% B; 15 ~ 18 min, 50% B。流速为 0.2 mL/min。质谱条件为阳离子模式, 质荷比 (m/z)

检测范围为 400 ~ 2 000。

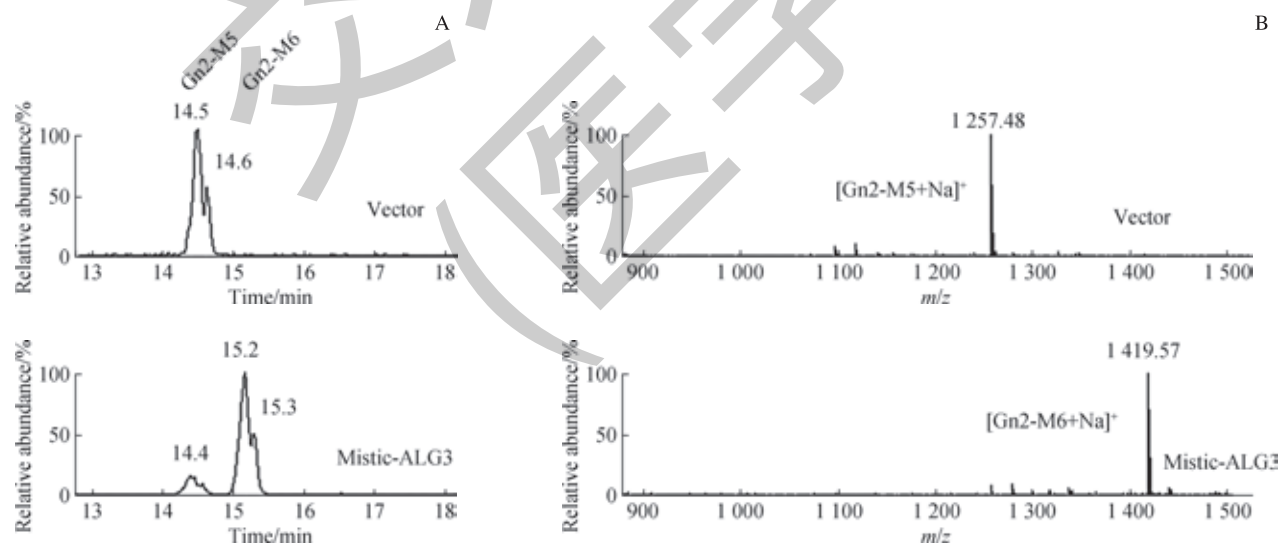
1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 将 7 位患者按照存活时间分为小于 1 年组和大于 1 年组, 比较 2 组突变蛋白酶活性, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠埃希菌表达的酿酒酵母来源重组 Mystic-ALG3 的活性定量检测

首先用化学-酶法合成 DP-Gn2-M5 类似物 PP-Gn2-M5 和 Dol-P-Man 类似物 Phy-P-Man, 再在大肠埃希菌表达酿酒酵母 Mystic-ALG3, 利用其在体外催化反应生成 Phytanyl-PP-GlcNAc2-Man6 (PP-Gn2-M6); 同时以仅转化了空质粒 pET28a 的菌株 (空载质粒) 作为对照。反应结束后, 采用 LC-MS 的方法检测产物, 定量分析酶活性。由图 2 可知, 加入表达 Mystic-ALG3 的大肠埃希菌菌膜的样品出峰时间为 15.2 min 和 15.3 min, 对应的质荷比为 1 419.57, 指示反应生成的产物为 Gn2-M6; 而加入空载质粒的样品出峰时间为 14.5 min 和 14.6 min, 对应的质荷比为 1 257.48, 指示仍为反应底物 Gn2-M5。



Note: A. The UPLC chromatograms of released glycans. B. The electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analysis of released glycans.

图 2 酿酒酵母重组 Mystic-ALG3 的活性分析

Fig 2 Activity analysis of recombinant yeast Mystic-ALG3

2.2 ALG3-CDG 患者对应重组酿酒酵母 ALG3 突变蛋白的原核表达

构建的 6 个 ALG3 突变的大肠埃希菌表达载体, 经

过测序验证后, 分别转化到 Rosetta (DE3) 菌株诱导表达, 超声破碎后提取大肠埃希菌菌膜成分, 通过 Western blotting 确认蛋白的表达。结果 (图 3) 显示, 上述 6 个突

变蛋白在大肠埃希菌体系中的表达量与野生型 (wild type, WT) ALG3 蛋白基本一致。

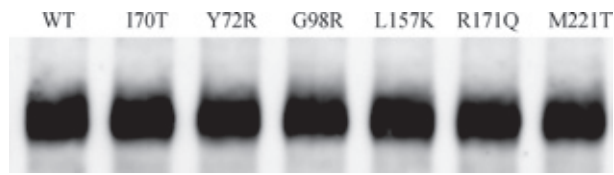


图 3 酵母 Mistic-ALG3 突变蛋白的原核表达
Fig 3 Prokaryotic expression of yeast Mistic-ALG3 mutants

2.3 定量分析 6 个突变蛋白的相对活性

通过 LC-MS 对 6 个突变体的活性进行测定, 并与野生型 ALG3 比较, 计算突变蛋白的相对活性。结果 (图 4) 显示, I70T 突变蛋白相对活性为 2.8%, Y72R 突变蛋白相对活性为 4.9%, G98R 突变蛋白相对活性为 4.5%, L157K 突变蛋白相对活性为 17.2%, R171Q 突变蛋白相对活性为 4.8%, M221T 突变蛋白相对活性为 22.3%。

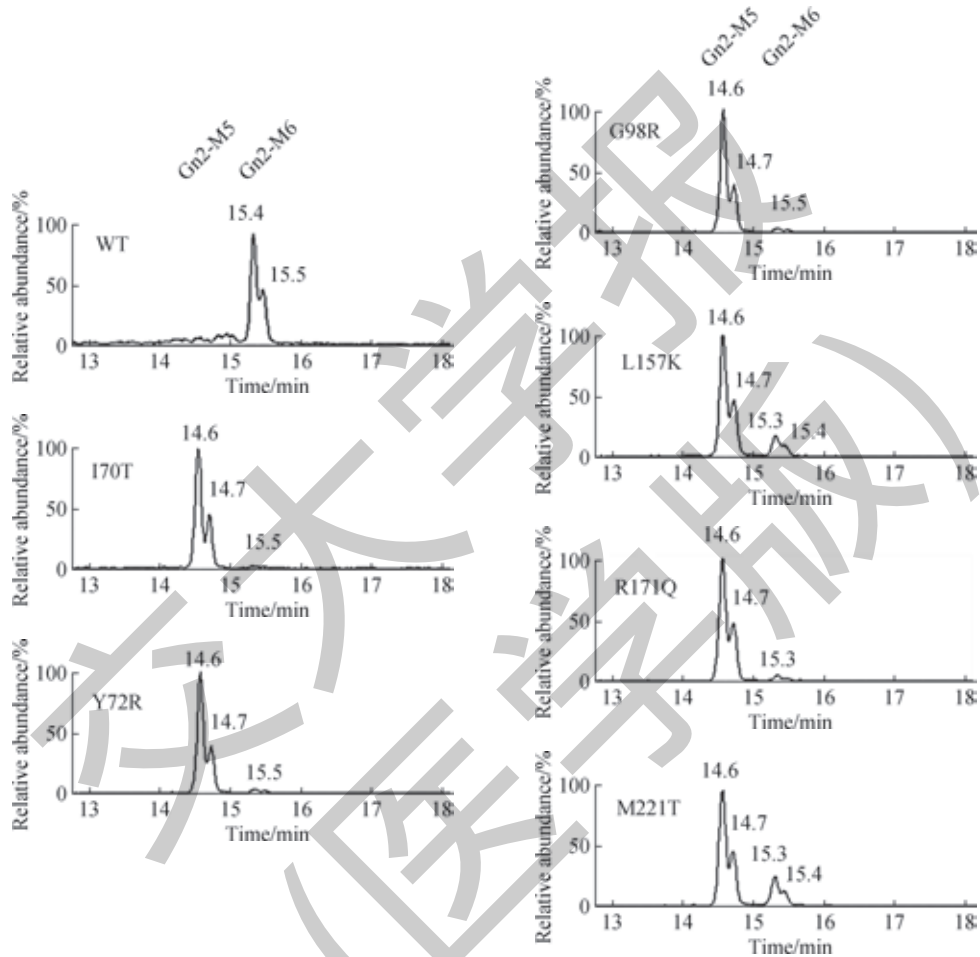


图 4 酵母 Mistic-ALG3 突变蛋白的活性分析
Fig 4 Activity analysis of yeast Mistic-ALG3 mutants

2.4 突变蛋白活性与患者临床特征分析

将突变蛋白的相对活性与 ALG3-CDG 患者的临床特征汇总后, 结果见表 2。生存时间较长的患者均为杂合突变, 且至少有 1 个突变蛋白保留了一定的酶活性。将 7 位

患者按照存活时间分为小于 1 年和大于 1 年 2 组, 杂合突变患者以较高的酶活性为准, 比较发现生存期大于 1 年患者对应的突变蛋白活性显著高于小于 1 年的患者 (图 5, $P=0.002$)。

表 2 ALG3-CDG 患者突变位点与酵母对应 Mistic-ALG3 突变蛋白的活性
Tab 2 Mutation sites of ALG3-CDG patients and relative activity of conserved yeast Mistic-ALG3 mutants

Case No.	Survival time	Mutation type	Mutation site	Yeast mutant	Relative activity/%
1 ^[4]	19 d	Homozygous	R171Q	R171Q	4.8
2 ^[5]	>7 years	Heterozygous	W71R	Y72R	4.9
			M157K	L157K	17.2

Continued Tab

Case No.	Survival time	Mutation type	Mutation site	Yeast mutant	Relative activity/%
3 ^[5]	>9 years	Heterozygous	W71R M157K	Y72R L157K	4.9 17.2
4 ^[8]	>15 years	Heterozygous	I69T M209T	I70T M221T	2.8 22.3
5 ^[8]	>21 years	Heterozygous	I69T M209T	I70T M221T	2.8 22.3
6 ^[9]	Termination of pregnancy performed after 25 weeks of gestation	Homozygous	G96R	G98R	4.5
7 ^[9]	12 d	Homozygous	G96R	G98R	4.5

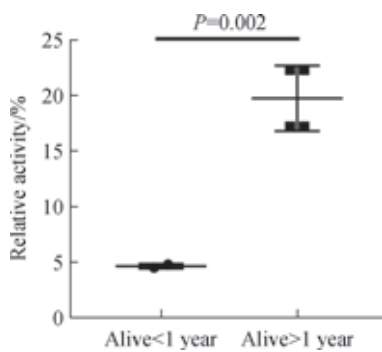


图 5 不同生存期患者对应突变蛋白活性的比较
Fig 5 Comparison of activities of corresponding mutations between the patients with different survival periods

3 讨论

真核生物 ALG3 的天然底物中含有多萜醇 (dolichol) 结构, 但多萜醇水溶性差且不易大量制备^[23], 因此本实验室前期研究中以化学 - 酶法制备了 ALG3 底物类似物 PP-Gn2-M5 和糖基供体类似物 Phy-P-Man, 并在大肠埃希菌体系表达了酿酒酵母重组 Mistic-ALG3 蛋白, 利用含有该蛋白的大肠埃希菌菌膜成分催化生成 PP-Gn2-M6^[19-21]。Mistic-ALG3 属于多次跨膜蛋白, 纯化极其困难; 而大肠埃希菌没有 DLO 合成途径, 也没有与 ALG3 功能相似的同源蛋白, 因此直接利用含有 Mistic-ALG3 重组蛋白的大肠埃希菌膜成分催化反应是可行的^[20]。在本研究中, 参照上述反应体系, 定量检测酿酒酵母重组 Mistic-ALG3 的活性, 结果确认了大肠埃希菌表达体系得到的酿酒酵母重组 Mistic-ALG3 具备较高的反应活性。

本研究进而对 ALG3-CDG 相关的酵母保守性 Mistic-ALG3 突变蛋白的活性进行了研究。首先确认了 6 个 ALG3-CDG 相关酵母重组 ALG3 突变蛋白在大肠埃希菌体系中蛋白表达量与野生型基本一致, 因此在测量它们的活性时, 反应中加入相同的总蛋白量即可对突变体和野生型蛋白进行相对活性的比较。

将本研究 LC-MS 定量检测的突变蛋白相对活性与文献报道的 ALG3-CDG 患者临床特征汇总后发现: 患者 1^[4]、患者 6 和患者 7^[9] 为纯合子突变, 即患者 ALG3 基因所在的 2 条染色体有相同的突变位点。患者 1 的突变为 R171Q, 测得其对应的酿酒酵母突变蛋白 R171Q 的相对活性仅为 4.8%; 患者 6 和 7 的突变为 G96R, 测得其对应的酿酒酵母突变蛋白 G98R 的相对活性仅为 4.5%, 均与 3 位患者较短的生存期相吻合^[9]。

患者 2、患者 3^[5]、患者 4 和患者 5^[8] 为复合杂合子突变, 即患者 ALG3 基因所在的 2 条染色体上具有不同突变, 疾病严重程度往往受活性高的突变体影响较大。患者 2 和患者 3 的突变位点相同, 为 W71R 和 M157K, 测得其对应的酿酒酵母突变蛋白 Y72R 的相对活性为 4.9%, 而 L157K 的相对活性为 17.2%; 同样地, 患者 4 和患者 5 的突变位点相同, 为 I69T 和 M209T, 测得其对应的酿酒酵母突变蛋白 I70T 的相对活性为 2.8%, 而 M221T 的相对活性为 22.3%。因 4 位患者均有一条染色体上的突变位点对应的 ALG3 蛋白保留了一定的活性, 在报道^[5, 8] 时均依然存活, 为 7 ~ 21 岁^[8]。

综上所述, 本研究为后续 ALG3-CDG 诊断及疾病严重程度的预测提供了理论依据。

参 · 考 · 文 · 献

[1] Ferens-Sieczkowska M. Congenital disorders of glycosylation[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2003, 57(4): 425-444.
[2] Wolfe LA, Krasnewich D. Congenital disorders of glycosylation and intellectual disability[J]. Dev Disabil Res Rev, 2013, 17(3): 211-225.
[3] Aebi M. ALG mannosyltransferases, ER lumen=alpha linkage (ALG3, 9, 12) [M]//Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, et al. Handbook of glycosyltransferases and related genes. Tokyo: Springer, 2014: 1249-1254.
[4] Sun LW, Eklund EA, Chung WK, et al. Congenital disorder of glycosylation id

- presenting with hyperinsulinemic hypoglycemia and islet cell hyperplasia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(7): 4371-4375.
- [5] Kranz C, Sun LW, Eklund EA, et al. CDG-Id in two siblings with partially different phenotypes[J]. Am J Med Genet, 2007, 143A(13): 1414-1420.
- [6] Rimella-Le-huu A, Henry H, Kern I, et al. Congenital disorder of glycosylation type Id (CDG Id): phenotypic, biochemical and molecular characterization of a new patient[J]. J Inher Metab Dis, 2008, 31(Suppl 2): S381-S386.
- [7] Stibler H, Stephani U, Kutsch U. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: a fourth subtype[J]. Neuropediatrics, 1995, 26(5): 235-237.
- [8] Riess S, Reddiough DS, Howell KB, et al. ALG3-CDG (CDG- Id): clinical, biochemical and molecular findings in two siblings[J]. Mol Genet Metab, 2013, 110(1/2): 170-175.
- [9] Lepais L, Cheillan D, Frachon SC, et al. ALG3-CDG: Report of two siblings with antenatal features carrying homozygous p.Gly96Arg mutation[J]. Am J Med Genet A, 2015, 167(11): 2748-2754.
- [10] Haeuptle MA, Hennet T. Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides[J]. Hum Mutat, 2009, 30(12): 1628-1641.
- [11] Ng BG, Shiryayev SA, Rymen D, et al. ALG1-CDG: clinical and molecular characterization of 39 unreported patients[J]. Hum Mutat, 2016, 37(7): 653-660.
- [12] Frank CG, Eyaid W, Berger EG, et al. Identification and functional analysis of a defect in the human *ALG9* gene: definition of congenital disorder of glycosylation type IL[J]. Am J Hum Genet, 2004, 75(1): 146-150.
- [13] Zufferey R, Knauer R, Burda P, et al. STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*[J]. EMBO J, 1995, 14(20): 4949-4960.
- [14] 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.
- [15] Korner C. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man: Man5GlcNAc₂-PP-dolichyl mannosyltransferase[J]. EMBO J, 1999, 18(23): 6816-6822.
- [16] Kranz C, Basinger AA, Güçsavaş-Çalıköglu M, et al. Expanding spectrum of congenital disorder of glycosylation Ig (CDG-Ig): sibs with a unique skeletal dysplasia, hypogammaglobulinemia, cardiomyopathy, genital malformations, and early lethality[J]. Am J Med Genet A, 2007, 143(12): 1371-1378.
- [17] Li ST, Wang N, Xu S, et al. Quantitative study of yeast Alg1 β -1,4 mannosyltransferase activity, a key enzyme involved in protein N-glycosylation[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017, 1861(1): 2934-2941.
- [18] Kefala G, Kwiatkowski W, Esquivies L, et al. Application of Mistic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*[J]. J Struct Funct Genomics, 2007, 8(4): 167-172.
- [19] 李盛陶. 体外重构 N-糖基化途径中多萜醇寡糖前体的合成 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [20] Li ST, Lu TT, Xu XX, et al. Reconstitution of the lipid-linked oligosaccharide pathway for assembly of high-mannose N-glycans[J]. Nat Commun, 2019, 10: 1813.
- [21] 李庆猛, 李盛陶, 王宁, 等. 酵母来源 α -1,2 甘露糖转移酶 Alg11 的异源表达、纯化和活性分析 [J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(6): 26-33.
- [22] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59.
- [23] Burgos J, Hemming FW, Pennock JF, et al. Dolichol: a naturally-occurring c100 isoprenoid alcohol[J]. Biochem J, 1963, 88(3): 470-482.

[收稿日期] 2019-08-30

[本文编辑] 瞿麟平

学术快讯

上海交通大学医学院举办第八届中国医院发展与管理学术大会

2020年10月16日,由上海交通大学医学院主办的第八届中国医院发展与管理学术大会于上海国际会议中心成功召开。来自全国各地600余名专家学者和医学院管理领导参加会议,6.5万名观众在线学习。

中国工程院院士巴德年、中国工程院院士樊代明、中国科学院院士杨雄里分别作题为“医学教育创新发展及改革”“疫后医学思考与文化重塑”“对感知机制新认识的思考”的主题报告。清华大学万科公共卫生与健康学院常务副院长梁万年、上海交通大学医学院党委书记范先群、海南省卫生健康委员会副主任李文秀、上海交通大学医学院附属瑞金医院副院长陈尔真分别就公立医院高质量发展相关问题的思考、医院管理与发展的思考、海南自由贸易港政策与海南卫生事业发展机遇、远程医疗助力专科医联体高速发展进行了分享。医学院附属仁济医院党委书记夏强、医学院附属第九人民医院副院长王艳、医学院附属新华医院总会计师刘雅娟、江苏省医疗管理服务指导中心主任王宁和上海交通大学护理学院副院长林炜栋围绕新形势下的医院高质量发展等方面进行了热烈的讨论。