

# 柞蚕蛹表达人促红细胞生成素的糖基化修饰分析

刘晓黎<sup>1</sup>, 刘宇博<sup>1,2</sup>, 李学臣<sup>3</sup>, 陈秋实<sup>3,4</sup>, 范琦<sup>5</sup>, 张嘉宁<sup>1</sup>, 李文利<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学生命科学与药理学系, 盘锦 124221;

2. 大连理工大学生物智能制造教育部重点实验室, 大连 116023;

3. 香港大学化学系, 合成化学国家重点实验室, 香港特别行政区 999077;

4. 合成化学暨分子生物学有限公司, 香港科学园, 香港特别行政区 999077;

5. 辽宁省海洋水产科学研究院, 大连 116023)

**摘要** 利用 DNA 重组技术在柞蚕蛹中表达重组人促红细胞生成素(Recombinant human erythropoietin, rhEPO), 经过亲和层析纯化后, 用 SDS-PAGE 分离纯化各组分, 并通过电喷雾电离串联质谱技术(ESI-MS/MS) 检测其糖基化修饰. 结果显示, 在柞蚕蛹中表达的 rhEPO 比活性约为 1190 U/ $\mu$ g, 其糖基化修饰位点与人体表达的 EPO 一致, 有 3 个 N-糖基化位点和 1 个 O-糖基化位点. 凝集素杂交实验结合质谱结果表明, 柞蚕蛹表达的 rhEPO 的糖链中缺乏唾液酸修饰, 而缺少唾液酸修饰的 EPO 通过鼻腔给药后在多种神经系统疾病的治疗中发挥着重要的作用. 所得结果为进一步研究外源蛋白在柞蚕蛹-柞蚕核型多角体病毒(*Anthraea pernyi* nucleopolyhedrovirus, ApNPV) 宿主载体表达系统表达后的糖基化与生物活性提供了依据.

**关键词** 电喷雾质谱; 促红细胞生成素; 柞蚕蛹; 糖基化

中图分类号 Q51; O657.6

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240479

## Analysis of Glycosylation Modification of Human Erythropoietin Expressed in Pernyi Pupae

LIU Xiaoli<sup>1</sup>, LIU Yubo<sup>1,2</sup>, LI Xuechen<sup>3</sup>, CHEN Qiushi<sup>3,4</sup>, FAN Qi<sup>5</sup>, ZHANG Jianing<sup>1</sup>, LI Wenli<sup>\*</sup>

(1. School of Life and Pharmaceutical Sciences, Dalian University of Technology, Panjin 124221, China;

2. Key Laboratory of Bio-Intelligent Manufacturing, Ministry of Education, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China;

3. Department of Chemistry, State Key Laboratory of Synthetic Chemistry, the University of Hong Kong, Hong Kong SAR 999077, China;

4. Laboratory for Synthetic Chemistry and Chemical Biology Limited, Hong Kong Science Park, Hong Kong SAR 999077, China;

5. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China)

**Abstract** Recombinant human erythropoietin (rhEPO) was expressed in pernyi pupae using DNA recombination technology and gel purified. The purified components were separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), and the rhEPO gel strips were cut and its glycosylation modification was detected by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). The mass spectrometry results showed

收稿日期: 2024-10-23. 网络首发日期: 2024-12-31.

联系人简介: 李文利, 男, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学方面的研究. E-mail: biolwl@dlut.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 32171282)和中央高校基本科研业务费(批准号: DUT23YG114)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.32171282) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China(No.DUT23YG114).

that the glycosylation modification sites of rhEPO expressed in pernyi silkworm pupae were consistent with EPO expressed in humans, with three N-glycosylation sites and one O-glycosylation site. Although the specific sugar chains at the glycosylation sites cannot be determined based on ESI-MS/MS, its results combined with lectin experiments can help determine the specific sugar chains at the glycosylation modification sites. According to the results, the overall sugar chain lacks sialic acid modification. The results of cell experiments showed that rhEPO expressed by pernyi pupae had certain biological activity, with a specific activity of 1190 U/ $\mu\text{g}$ . Therefore, pernyi pupae can express rhEPO without sialic acid modification with certain biological activity, and low sialylated EPO can play an important role in the treatment of central nervous system diseases after nasal administration. The results provide a basis for further studying the glycosylation and biological activity of exogenous proteins after expression in the pernyi pupae-Anthraea pernyi nucleopolyhedrovirus (ApNPV) host vector expression system.

**Keywords** Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS/MS); Erythropoietin; Pernyi pupae; Glycosylation

促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO) 是一种由成人肾脏以及胎儿肝脏合成的高度糖基化的糖蛋白<sup>[1]</sup>, 其通过与 EPO 受体结合刺激红系祖细胞的分化和增殖, 从而促进红细胞的生成<sup>[2]</sup>. EPO 的糖基化通常包括 N-糖基化和 O-糖基化两种形式, 这种修饰对其生物活性有着重要影响. 复杂的糖基化修饰有助于延长 EPO 的半衰期, 增加其在体内的稳定性; 相反, 缺乏糖基化修饰, 尤其是缺少唾液酸化修饰的 EPO, 通常会表现出较低的生物活性, 并容易被迅速清除. 因此, EPO 的糖基化程度决定了其在体内的效果和临床应用中的表现<sup>[3]</sup>. 通过大肠杆菌等微生物生产重组 EPO (rhEPO) 成本较低, 但由于糖基化修饰较简单<sup>[4]</sup>, 其生物活性较低、半衰期较短, 需频繁给药. 而通过哺乳动物细胞系 (如中国仓鼠卵巢细胞) 产生的 rhEPO, 其糖基化修饰接近天然 EPO, 具有较高的生物活性和药效. 通过增加寡糖链等方法可以延长 EPO 的半衰期, 从而减少注射频率, 如 Epoetin alfa 和 Darbepoetin alfa 等药物是治疗贫血, 特别是治疗肾衰竭患者贫血的重要药物<sup>[5]</sup>. 近年来, 大量动物实验和初步的临床研究表明, 无唾液酸化的 EPO 在神经保护方面具有比普通 EPO 更强的作用<sup>[6-8]</sup>. 在神经系统中, 与组织保护和修复等非造血功能有关的 EPO 受体对无唾液酸 EPO 表现出更高的亲和力<sup>[9]</sup>, 这使得无唾液酸 EPO 在帕金森<sup>[10]</sup> 等神经性疾病的治疗中具有很大的潜力<sup>[11,12]</sup>. 此外, 通过鼻腔给药可以避免无唾液酸 EPO 因唾液酸含量低而被肝细胞降解<sup>[13]</sup>. 然而, 将 rhEPO 进行去唾液酸化处理过程中可能会使其药代动力学特性发生变化, 而且生产的成本较高.

昆虫杆状病毒载体表达系统作为一种真核表达系统<sup>[14]</sup>, 能够进行复杂的翻译后修饰, 如糖基化和磷酸化修饰等, 且具有产量高、适合大规模生产等优势, 因此被多家全球制药企业广泛用于表达各种重组蛋白<sup>[15]</sup>. 然而, 昆虫的糖基化途径与高等真核生物不同, 通常生成高甘露糖或寡甘露糖型糖蛋白<sup>[16]</sup>, 糖链末端极少带有半乳糖以及唾液酸残基<sup>[17]</sup>. 柞蚕核型多角体病毒 (Anthraea pernyi nucleopolyhedrovirus, ApNPV) 表达系统是一种以柞蚕蛹作为宿主的表达系统<sup>[18]</sup>, 具有其它几种昆虫表达系统不可比拟的优势. 但是目前, 对该系统表达的外源蛋白糖基化修饰的系统性研究还鲜有报道, 而糖基化修饰是细胞生物学中一个至关重要的过程, 涉及从蛋白质折叠到细胞间信号传导及免疫反应的多个方面. 不仅如此, 糖基化修饰还在疾病的发生、发展及治疗中也具有重要的临床意义, 因此, 对柞蚕蛹表达的外源蛋白进行糖基化修饰研究, 对于进一步优化 ApNPV 表达系统的应用至关重要.

本文利用柞蚕核型多角体病毒表达系统表达重组人红细胞生成素 (rhEPO), 并采用电喷雾电离串联质谱 (ESI-MS/MS) 技术联合凝集素杂交的方法<sup>[19]</sup>, 分析了柞蚕蛹中表达的 rhEPO 的糖基化位点及其糖基化修饰程度, 研究结果为进一步优化 ApNPV 表达系统及其在目标蛋白生产中的应用提供了实验依据和理论支持.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

柞蚕蛹由吉林省蚕业科学研究所提供; DNA Marker、BamH I/EcoR I 限制性内切酶和 PCR 体系, 宝

生物(大连)有限公司; 组氨酸标签单克隆抗体(Anti-His tag mAb), 日本MBL公司; 氯化钠(分析纯), 天津市东丽区天大化学试剂厂; 磷酸盐缓冲溶液(pH=6.7)和甘油(分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; Triton X-100(化学纯)和二硫苏糖醇(DTT, 生物技术级), 北京索莱宝公司; PEI-PLGA 试剂, 本实验室保存; EDTA 兼容型大容量镍离子亲和层析树脂(Pierce™ High-Capacity Ni-IMAC Resin, EDTA Compatible), 美国Thermo公司; 人促红细胞生成素酶联免疫吸附检测试剂盒(Human EPO ELISA Kit), 上海碧云天公司; 人红系白血病细胞TF-1, 由中国科学院上海细胞库提供; RPMI Medium 1640培养基, 美国Gibco公司; 胎牛血清(FBS), 上海生工生物公司; 青霉素-链霉素溶液, 上海碧云天公司; 长柔毛野豌豆外源凝集素(VVL)、小麦胚芽凝集素(WGA)和橙黄网胞盘菌凝集素(AAL), 美国Vector公司; 2-氨基-4-氯苯胺(ABC, 分析纯), 上海麦克林公司; 碘乙酰胺(IAA, 分析纯), 德国Merck公司; 胰蛋白酶和丝氨酸蛋白酶(Glu-C, 测序级), 美国Sigma-Aldrich公司; 乙腈(ACN)和甲醛(FA, 测序级), 美国Spectraum公司.

多功能微孔板检测仪, 美国BioTek仪器公司; Ultimate 3000-RSLCnano型液相色谱仪、Orbitrap Exploris 480型高分辨质谱仪(MS)和Nanospray-Flex离子源, 美国Thermo公司.

## 1.2 实验过程

**1.2.1 rhEPO在柞蚕蛹中的表达** 从HepG 2细胞中提取RNA, 经过反转录和扩增获得EPO基因, 经测序确认后, 将EPO基因与带有荧光标签和His标签的柞蚕核型多角体病毒转移载体R<sub>2</sub>TV<sub>4</sub>H连接, 提取重组质粒DNA后转化到ApDH10Bac感受态细胞中, 并通过蓝白斑筛选得到ApNPV-bacmid-EPO DNA, 将重组DNA与转染试剂PEI-PLGA按质量比为1:30混合后转染到柞蚕蛹中, 并在室温下培养15 d, 随后收集血淋巴进行荧光检测<sup>[20]</sup>, 并通过SDS-PAGE和Western-blot(使用His抗体为一抗)检测rhEPO蛋白的表达.

**1.2.2 rhEPO的分离纯化** 取重组病毒感染的柞蚕蛹血淋巴15 mL, 加入等体积的2×结合缓冲液(100 mmol/L磷酸盐缓冲液, 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L咪唑, 20%甘油, 2%Triton X-100, pH=6.7), 以12000 r/min的转速离心20 min, 再加入60 mL 1×结合缓冲液(50 mmol/L磷酸盐缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L咪唑, 10%甘油, 1%Triton X-100, pH=6.7), 将混合液上样至Ni-IMAC Resin分离柱中, 约1 h后完成上样, 使用洗杂缓冲液(50 mmol/L磷酸盐缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L咪唑, pH=6.7)洗10个柱体积, 最后用15 mL洗脱液(50 mmol/L磷酸盐缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L咪唑, pH=6.7)进行洗脱. 通过Western-blot, SDS-PAGE及EPO ELISA检测纯化效果.

**1.2.3 rhEPO的活性检测** 红系白血病细胞TF-1在培养基中必须添加EPO等细胞因子才能正常生长<sup>[21]</sup>. rhEPO的体外活性是通过其对TF-1细胞的作用后, 检测细胞生长增殖情况进行评估. 将TF-1细胞以10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔板中, 加入初始浓度为10 ng/mL的rhEPO后, 进行2倍梯度稀释, 每个梯度重复3次, 培养54 h后, 加入CCK8孵育5 h, 检测450 nm处的吸光度值, 以评估细胞增殖情况.

**1.2.4 凝集素杂交实验** 为了验证柞蚕蛹表达的rhEPO是否经过糖基化修饰, 首先将纯化后的rhEPO蛋白与刀豆凝集素A(ConA)杂交, 结果显示其具有一定的甘露糖修饰. 随后, 分别使用长柔毛野豌豆外源凝集素(VVL)、小麦胚芽凝集素(WGA)以及橙黄网胞盘菌凝集素(AAL)作为一抗在4 °C孵育11 h, 再用链霉亲和素作为二抗与一抗结合, 使用ECL发光液进行显影, 检测rhEPO的半乳糖(GalNAc)、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)以及岩藻糖的修饰情况.

**1.2.5 蛋白质胶内酶解实验** 将图3(A)中6和7泳道(编号为3和4)箭头所指位置的SDS-PAGE凝胶带切割成约为1 mm<sup>3</sup>的小块, 转移到1.5 mL的试管中, 室温下, 用50 mmol/L ABC缓冲液和体积分数为50%的乙醇溶液洗涤2次, 每次15 min, 然后用无水乙醇振荡脱水, 直至完全干燥. 干燥后的凝胶片在56 °C下用10 mmol/L DTT溶液还原30 min, 接着用55 mmol/L IAA溶液进行烷基化, 室温下避光孵育20 min, 随后用50 mmol/L ABC缓冲液与体积分数为50%的乙醇溶液洗涤5 min, 重复3次, 最后用无水乙醇脱水直至完全干燥. 将脱水后的凝胶块置于50 mmol/L碳酸氢铵缓冲液中, 以酶与底物的比例为1:100添加胞内蛋白酶Glu-C, 25 °C孵育过夜; 胰蛋白酶在37 °C孵育过夜.

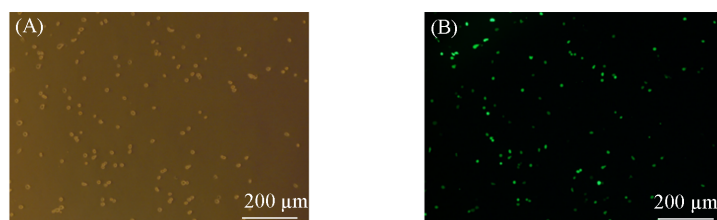
**1.2.6 质谱鉴定** 取5  $\mu\text{L}$ 样品(含1  $\mu\text{g}$ 多肽),上样至自制分析柱(75  $\mu\text{m}\times 20\text{ mm}$ , 1.9  $\mu\text{m}$ 粒径, C18颗粒, 12 nm孔径). 以0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速在2%ACN和0.1%FA的混合液中平衡15 min. 流动相A为0.1%甲酸,流动相B为含0.1%甲酸的ACN. 采用300 nL/min的流速洗脱肽段,流动相B的比例在前50 min内从6%提升到22%,接着在8 min内提升为36%,最后2 min提升至80%. 使用Thermo Xcalibur软件获得MS数据. 电喷雾采用静态Nanospray-Flex肽应用模式,喷雾电压为2.1 kV,一级质谱扫描范围为400~1800  $m/z$ ,离子计数目标为 $3\times 10^6$ 个,最大注入时间为120 ms,在 $m/z$  200处,分辨率为6000. 在数据依赖性采集模式下,选择每循环中丰度最高的10个母离子进行分析,每个母离子排除30 s. 母离子经四极杆分离(窗口宽度为1.6  $m/z$ ),并通过高能碰撞诱导解离(HCD)进行碎裂,归一化碰撞能量分别为20%, 39%和40%. 二级质谱扫描在轨道阱中进行,离子计数目标为 $1\times 10^5$ 个,最大注入时间为150 ms,采集模式为质心模式.

**1.2.7 数据的检索和分析** 采用Byonic(V5.4.10, Protein Metrics公司)搜库软件对质谱原始数据进行检索,采用来源于UniProt数据库(P01588\_2024年)的促红细胞生成素蛋白序列进行肽段注释,检索条件:胰酶酶切或者Glu-C酶切,酶切位点分别为精氨酸和赖氨酸C端或者谷氨酸C端;允许不大于1个漏切位点;母离子和碎片离子的分辨率设置为 $2\times 10^{-5}$ ;固定修饰为半胱氨酸的羧甲基化;可变修饰为甲硫氨酸的氧化和谷氨酰胺或天冬酰胺的脱酰胺;Byonic自带的38种昆虫N糖和9种常见O糖分别作为动态修饰添加到原始数据的糖基化修饰检索中. 对搜库产生的结果文件中的二级谱图列表进行鉴定结果筛选,对所有图谱的信息分条目进行提取,去除反库结果;存在糖基化修饰;Off-By-X值设定为空白. 对提取到的条目进行数据整理和人工比对,包括肽段序列、糖型组成和糖、肽的碎片离子.

## 2 结果与讨论

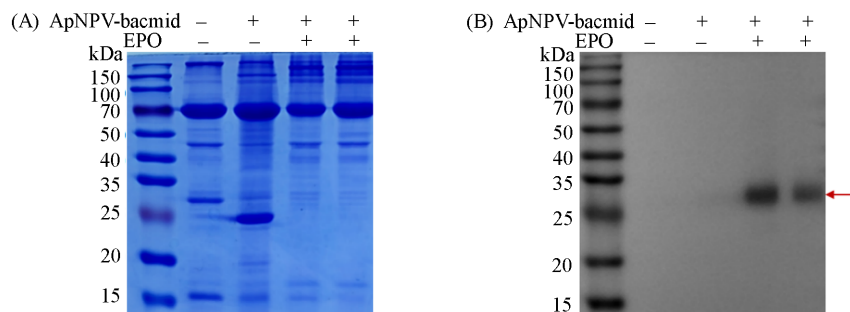
### 2.1 rhEPO在柞蚕蛹中的表达

将ApNPV-bacmid-EPO重组载体转入柞蚕蛹,培养15 d后取血淋巴细胞,通过荧光显微镜观察到荧光(图1). 随后采用12% SDS-PAGE凝胶电泳和Western-blot(His抗体作为一抗)鉴定柞蚕蛹中rhEPO的表达情况(图2). 图2(B)中,在25~35 kDa处出现目的条带(理论rhEPO蛋白分子质量为25.11 kDa),而正常组及感染空载体组未出现此条带,表明rhEPO已成功在柞蚕蛹中表达.



**Fig. 1** Transfection of ApNPV-bacmid-EPO observed under a microscope

(A) White light microscope; (B) fluorescence microscope. Cells were derived from hemolymph of pernyi pupa 15 d after infection with ApNPV-bacmid-EPO.



**Fig. 2** Expression of rhEPO protein in pernyi pupae analyzed by SDS-PAGE and Western blot

(A) Coomassie Brilliant Blue (CBB) stained gel (12%); (B) Western-blot (His antibody). Lane 1: protein marker; lane 2: healthy pernyi pupal protein; lane 3: pernyi pupal protein of the infected vector; lanes 4 and 5: pernyi pupal protein infected with EPO recombinant vector. Two rhEPO bands were detected between 25 and 35 kDa in lanes 4 and 5 (arrow head).

## 2.2 rhEPO的分离纯化与活性检测

使用Ni-IMAC亲和凝胶对蛋白进行纯化, SDS-PAGE和Western-blot分析结果显示纯化后的样品中目的蛋白条带单一[图3(A)和(B)]. 利用Human EPO ELISA试剂盒重复3次绘制标准曲线[图4(A)], 将储存在50%甘油中的纯化rhEPO稀释59倍后, 测得在A450 nm处的吸光值为0.270, 代入标准曲线, 计算可得稀释前rhEPO蛋白的浓度为1.6 mg/mL. 随后, 利用透析袋对纯化样品进行脱盐处理. 如图4(B)所示, 随着rhEPO浓度的增加, TF-1细胞的增值速度明显加快, 当浓度为10 ng/mL时, 细胞增值速度趋于平缓. 实验结果表明, 脱盐后rhEPO的ED50为838.7 pg/mL, 根据ED50进一步评估细胞因子rhEPO的活性约为1190 U/ $\mu$ g.

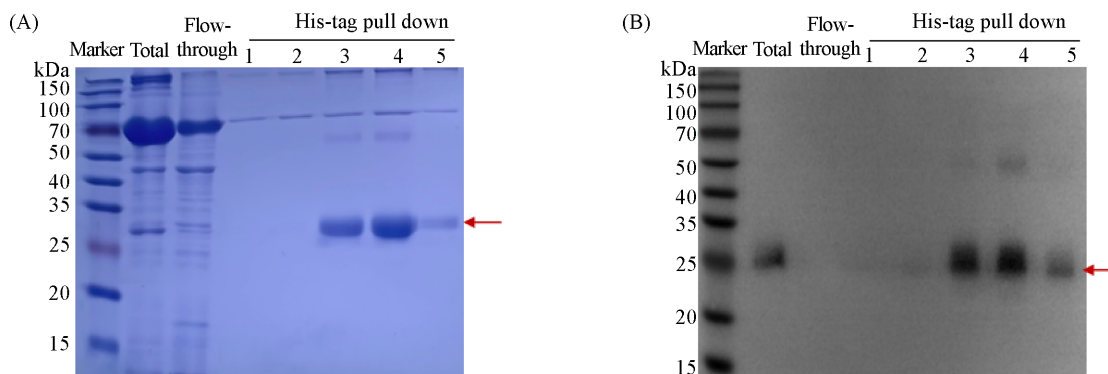


Fig. 3 Analysis of purified rhEPO by SDS-PAGE and Western blotting

(A) Coomassie Brilliant Blue (CBB)-stained gel (12%); (B) Western-blot (His antibody). Lane 1: protein marker; lane 2: no purified fraction (all proteins of hemolymph of pernyi pupa); lane 3: flow-through fraction; lanes 4–8 (number 1–5): purified rhEPO. Two bands were clearly observed between 25 and 35 kDa in lanes 6 and 7 (number 3 and 4), indicating rhEPO.

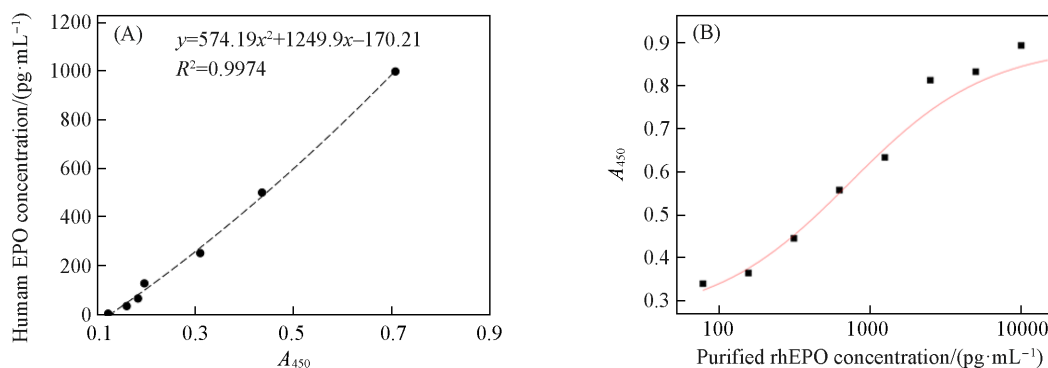


Fig. 4 Quantification and activity of purified rhEPO

(A) Human EPO ELISA standard curve. Each concentration of the standard substance was tested in triplicate to generate the standard curve. The absorbance of purified rhEPO (stored in 50% glycerol) at 450 nm ( $A_{450}$ ) was measured after a  $5^{\circ}$ -fold dilution, yielding a value of 0.270. By interpolating this absorbance into the standard curve, the concentration of rhEPO protein prior to dilution was calculated to be 1.6 mg/mL. (B) Proliferation curve of TF-1 cells stimulated by rhEPO. As the concentration of rhEPO increased, the proliferation rate of TF-1 cells rose sharply. However, when the rhEPO concentration reached 10 ng/mL, the proliferation rate plateaued. These results demonstrated that rhEPO possessed biological activity *in vitro*. The bioactivity of rhEPO was further estimated based on the relationship between cytokines and  $ED_{50}$ , though precise bioactivity values require additional experiments for confirmation.

## 2.3 凝集素杂交与质谱分析

2.3.1 凝集素杂交 凝集素杂交是一种基于凝集素特异性结合糖类特性的技术, 用于研究生物样本中糖分子构型<sup>[22]</sup>. ConA可以特异性结合糖蛋白在C3, C4和C6位置上的甘露糖基和葡萄糖残基, WGA会优先结合GlcNAc的二聚体和三聚体<sup>[23]</sup>, VVL可结合GalNAc<sup>[24]</sup>, AAL则特异性结合N聚糖上的核心岩藻糖<sup>[25,26]</sup>. 由于柞蚕蛹中的糖基化尚不明确, 所以首先使用ConA对纯化的样品进行杂交, 结果显示目的蛋白处有条带[图5(A)]. 然后分别使用VVL, AAL以及WGA与纯化样品进行杂交, 结果在目的蛋

白处均有条带[图 5(B)~(D)]. 这些结果表明, 柞蚕蛹表达的 rhEPO 的糖链中可能含有以下糖基化结构: Man ( $\alpha$ 1-6) [Man ( $\alpha$ 1-3)] Man, GlcNAc ( $\beta$ 1-4) $n$ , GalNAc, Fuc ( $\alpha$ 1-3) [Gal ( $\beta$ 1-4)] GlcNAc 或 Fuc ( $\alpha$ 1-6) GlcNAc.

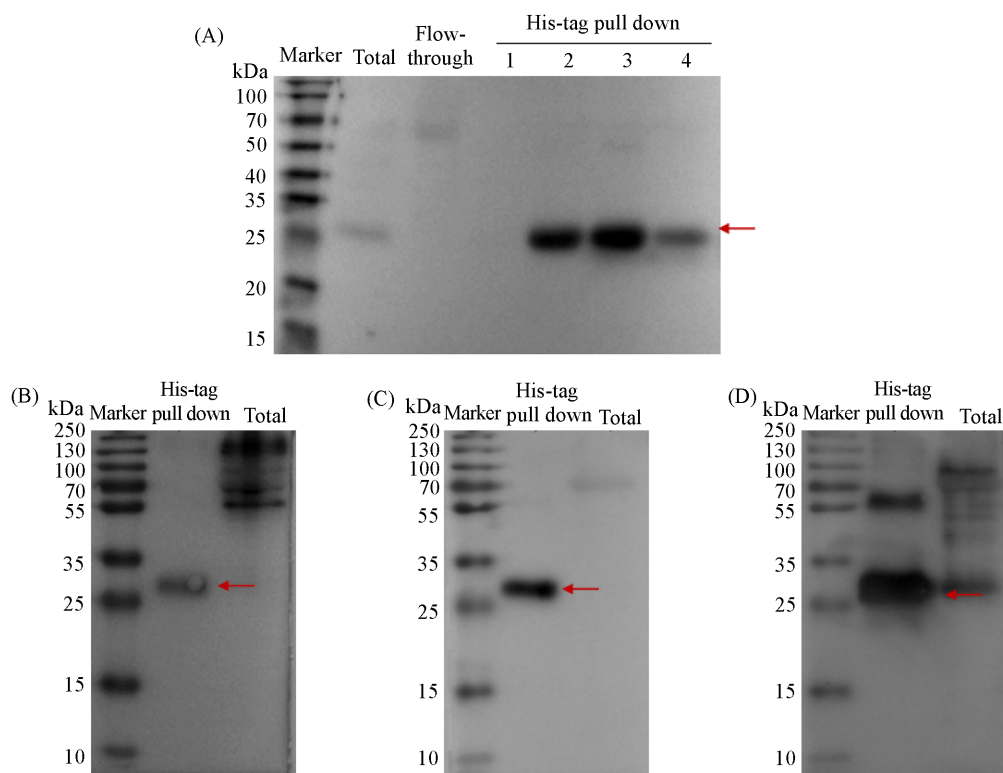


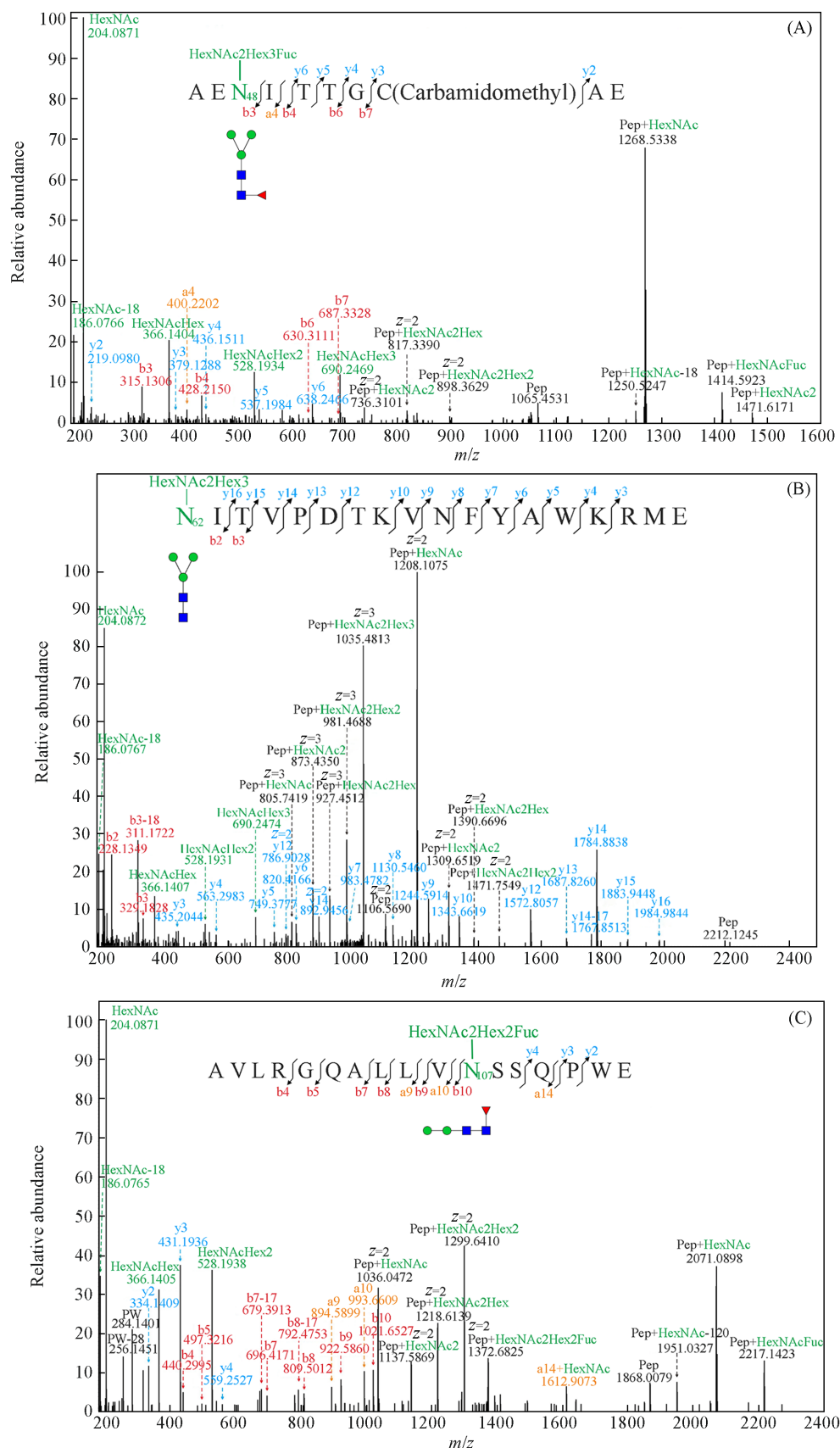
Fig. 5 Lectin-blot of rhEPO

(A) ConA Lectin-blot; lane 1: protein marker; lane 2: no purified fraction (all proteins of hemolymph of pernyi pupa); lane 3: flow-through fraction; lanes 4—7 (number 1—4): purified rhEPO. (B) VVL Lectin-blot. (C) WGA Lectin-blot. (D) AAL Lectin-blot; lane 1: protein marker; lane 2: purified rhEPO; lane 3: no purified fraction (all proteins of hemolymph of pernyi pupae).

2.3.2 ESI-MS/MS 质谱分析 糖基化位点的存在可以显著影响蛋白质的结构特性, 包括折叠方式、稳定性和溶解度. 糖基化位点的位置和数量会进一步影响蛋白质的空间构型, 从而调节其生物活性和药理特性, 因此, 柞蚕蛹能否在正确的位点进行糖基化修饰具有重要意义.

在蛋白酶解过程中, 通常使用质谱级或者测序级的胰蛋白酶. 但是在本项目中 rhEPO 经胰蛋白酶处理后会产生肽段 EAENITGCAEHCSLNENITVPDTK, 该肽段包含 2 个潜在的 N-糖基化位点, 导致 N-糖基化位点及其对应的糖型难以测定. 由于该肽段中存在 Glu-C 酶切位点, 为了将这 2 个糖基化位点分开, 在研究使用 Glu-C 对 rhEPO 进行处理.

经过电喷雾电离后, 通过 Thermo Xcalibur 和 Byonic 软件进行数据采集与定性分析. 结果表明柞蚕蛹中表达的 rhEPO 的 N 糖基化修饰位点与人源 EPO 一致, 均包含 3 个 N-糖基化位点<sup>[27]</sup>. 每个糖位点的其中一个糖链二级质谱结果如图 6 所示. 以图 6(A) 为例进行详细解读. 如图 6(A) 所示, 肽段 AENITGCAE 包含一个 N-糖基化位点保守序列 NIT, 碎片离子 a<sub>3</sub>, b<sub>3</sub>, b<sub>4</sub>, b<sub>6</sub>, b<sub>7</sub>, y<sub>2</sub>, y<sub>3</sub>, y<sub>4</sub>, y<sub>5</sub> 和 y<sub>6</sub> 的检测结果验证了该肽段的序列信息; 碎片离子  $m/z$  1065. 4531, 1268. 5338, 1414. 5923 和 1471. 6171 分别对应肽段、肽段+N-乙酰己糖胺、肽段+N-乙酰己糖胺+岩藻糖、肽段+2 个 N-乙酰己糖胺的碎片, 说明该肽上发生了糖基化修饰; 碎片离子  $m/z$  186. 0766, 204. 0871, 366. 1404, 528. 1934 和 690. 2469 分别对应 N-乙酰己糖胺脱水、N-乙酰己糖胺、N-乙酰己糖胺+己糖、N-乙酰己糖胺+2 个己糖和 N-乙酰己糖胺+3 个己糖的碎片, 说明糖肽上的糖发生了碎裂. 综上所述, 糖基化修饰发生在肽段 AENITGCAE 的 N 上, 其糖型为 HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>3</sub>Fuc. 同理, 在图 6(B) 和 (C) 中, 肽段碎片离子的检测结果分别验证了



**Fig. 6** N-glycosylation modification of rhEPO in pernyi pupae

- (A) Secondary mass spectrum of HexNAc2Hex3Fuc at Asn48; (B) secondary mass spectrum of HexNAc2Hex3 at Asn62; (C) secondary mass spectrum of HexNAc2Hex2Fuc at Asn107.

该肽段的序列信息. 在图6(B)中, 碎片离子  $m/z$  1106. 5690, 1309. 6519, 1390. 6696 和 1471. 7549 分别对应肽段、肽段+2个N-乙酰己糖胺、肽段+2个N-乙酰己糖胺+己糖、肽段+2个N-乙酰己糖胺+2个己糖, 说明该肽上发生了糖基化修饰; 碎片离子  $m/z$  186. 0767, 204. 0872, 366. 1407, 528. 1931 和 690. 2474 说明糖肽上的糖发生了碎裂. 综上所述, 糖基化修饰发生在肽段 NITVPDTKVNIFYAWKRME 的 N 上, 其糖型为 HexNAc2Hex3. 在图6(C)中碎片离子  $m/z$  1868. 0079, 1951. 0327, 2071. 0898 和 2217. 1423 分别对应肽段、肽段+乙酰己糖胺脱谷氨酸、肽段+乙酰己糖胺和肽段+N-乙酰己糖胺+岩藻糖, 说明该肽上发生了糖基化修饰; 碎片离子  $m/z$  186. 0765, 204. 0871, 366. 1405, 528. 1934 分别对应 N-乙酰己糖胺脱水、N-乙酰己糖胺、N-乙酰己糖胺+己糖、N-乙酰己糖胺+2个己糖的碎片, 说明糖肽上的糖发生了碎裂. 综上所述, 糖基化修饰发生在肽段 AVLRGQALLVNSSQPWE 的 N 上, 其糖型为 HexNAc2Hex2Fuc.

该蛋白除了有 N-糖基化位点外, 还发现了一个 O-糖基化位点, 其二级质谱结果如图7所示. 其中,  $m/z$  204. 0871, 188. 0766 和 366. 1403 对应 N-乙酰己糖胺脱水、N-乙酰己糖胺、N-乙酰己糖胺+己糖的糖碎片离子, 证明这条肽段发生了 O-糖基化修饰. 糖肽的高能碎片(HCD)产生的 b, y 离子是不带糖的, 但是  $m/z$  634. 8292, 715. 8556, 959. 5175, 1121. 5709, 1171. 5980, 1288. 6511, 1333. 6519 和 1430. 7036 均为带糖离子, 说明该糖基化修饰发生在 y8, y10 和 y11 上面, 而 y8, y10 和 y11 中能发生 O-糖基化修饰的只有 S153, 所以 O-糖基化修饰发生在该位点上, 该位点与人体内表达的 EPO 糖基化位点一致<sup>[28, 29]</sup>.

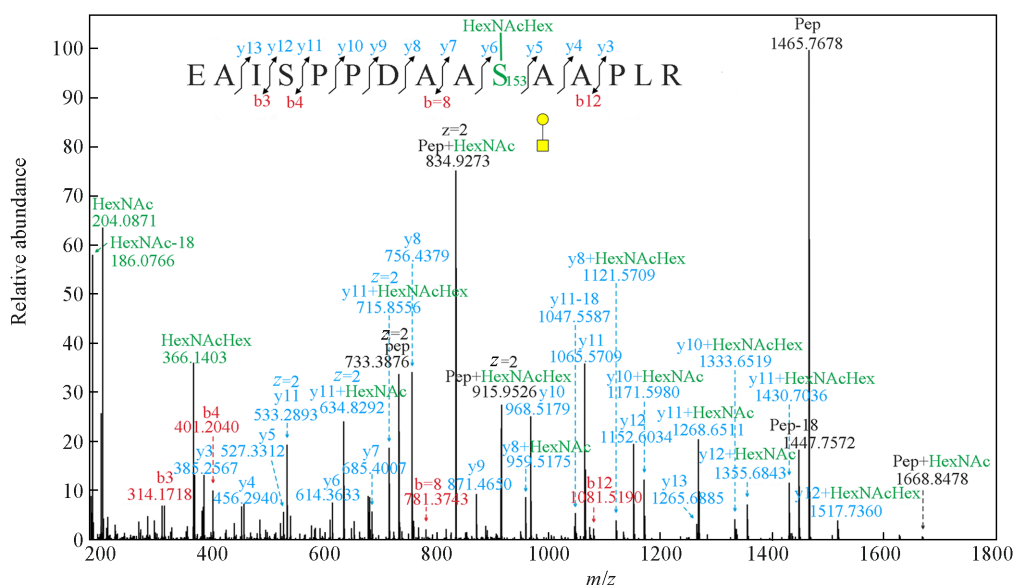


Fig. 7 O-glycosylation modification of rhEPO in pernyi pupae

为了探究 rhEPO 的糖基化程度, 根据分子离子峰的质核比初步判断糖链的分子量和分子式, 通过二级质谱相关信息进行结构鉴定, 使用数据库进行对比, 由碎片离子进一步验证, 结果发现在 Asn48 位点处可以推测出 4 种糖链, 在 Asn62 位点处有 7 种糖链, Asn107 位点处有 24 种糖链. 各个糖链组分如表1所示.

综合以上结果发现, 在柞蚕蛹中表达的 rhEPO 具有 3 个 N-糖基化位点和 1 个 O-糖基化位点, 其糖基化修饰的氨基酸位点与人源 EPO 完全一致. 结合凝集素杂交和 ESI-MS/MS 质谱分析结果可以推测, 柞蚕蛹表达的 rhEPO 在各糖基化位点上的糖链组分可能性如下: N48 位点上的糖链组分最可能为 HexNAc2Hex3; 在 N62 位点上的糖链组分最可能为 HexNAc2Hex3Fuc; N107 位上的糖链组分最可能为 HexNAc2Hex2Fuc 或 HexNAc2Hex3Fuc, 其次可能为 HexNAc2Hex3 或 HexNAc2Hex4; S153 位点的糖链组分最可能为 HexNAcHex (见本文支持信息表1和表2). 与人源 EPO 相比, 柞蚕蛹表达的 rhEPO 糖链末端缺少唾液酸, 而无唾液酸的 rhEPO 在神经系统疾病等治疗中具有重要意义.

Table 1 Glycan components by ESI-MS/MS

N-glycosylation sites	N-glycan component			
Asn48	HexNAc2Hex2	HexNAc2Hex2Fuc	HexNAc2Hex3	HexNAc2Hex3Fuc
Asn62	HexNAcFuc	HexNAc2HexFuc	HexNAc2Hex2Fuc	HexNAc2Hex3Fuc
	HexNAc2Hex	HexNAc2Hex2	HexNAc2Hex3	
Asn107	HexNAcFuc	HexNAc2Hex2Fuc2	HexNAc2Hex5Fuc	HexNAc3Hex4
	HexNAc2Hex	HexNAc2Hex3	HexNAc2Hex6	HexNAc3Hex4Fuc
	HexNAc2HexFuc	HexNAc2Hex3Fuc	HexNAc2Hex7	HexNAc3Hex5Fuc2
	HexNAc2HexFuc2	HexNAc2Hex3Fuc2	HexNAc3Hex3	HexNAc4Hex3Fuc
	HexNAc2Hex2	HexNAc2Fuc	HexNAc3Hex3Fuc	HexNAc2Hex2Fuc
	HexNAc2Hex4Fuc	HexNAc3Hex3Fuc2	HexNAc2Hex4	HexNAc2Hex5

### 3 结 论

通过细胞实验表明,柞蚕蛹表达的rhEPO在体外具有一定的生物活性,其比活性约为1190 U/ $\mu\text{g}$ 。利用ESI-MS/MS和凝集素杂交技术对其糖基化修饰进行分析,结果显示柞蚕蛹表达的rhEPO能够在正确的位点实现N-糖基化和O-糖基化修饰,但缺少唾液酸化修饰。缺乏唾液酸修饰的rhEPO可能更容易被肝脏的甘露糖受体识别并被清除。但动物实验结果显示,其在神经保护作用方面优于常规EPO,且可通过鼻腔给药等方式避免被降解。本研究通过质谱分析了柞蚕蛹表达的rhEPO,一方面证明了柞蚕蛹能够对外源蛋白进行复杂的糖基化修饰,但是缺乏唾液酸化修饰,这为无需唾液酸修饰蛋白的表达提供了新途径;另一方面阐明了柞蚕核型多角体病毒表达系统在外源蛋白糖基化修饰方面的能力,可为今后利用柞蚕蛹作为宿主表达目的蛋白提供支持。

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240479>。

### 参 考 文 献

- [1] Wenger R. H., Kurtz A., *Compr. Physiol.*, **2011**, 1(4), 1759—1794
- [2] Sasaki R., Masuda S., Nagao M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, 64(9), 1775—1793
- [3] Banks D. D., *J. Mol. Biol.*, **2011**, 412(3), 536—550
- [4] Schütz A., Bernhard F., Berrow N., Buyel J. F., Ferreira-da-Silva F., Haustraete J., van den Heuvel J., Hoffmann J. E., de Marco A., Peleg Y., Suppmann S., Unger T., Vanhoucke M., Witt S., Remans K., *STAR Protoc.*, **2023**, 4(4), 102572
- [5] Zhang C. L., Zhu X., Li J. L., *Chinese J. Biol.*, **2004**, 17(2), 123—125 (张春莉, 朱迅, 李景利. 中国生物制品学杂志, **2004**, 17(2), 123—125)
- [6] Zhang S. J., Luo Y. M., Wang R. L., *J. Integr. Neurosci.*, **2020**, 19(3), 561—570
- [7] Castillo C., Zaror S., Gonzalez M., Hidalgo A., Burgos C. F., Cabezas O. I., Hugues F., Jiménez S. P., González-Horta E., González-Chavarría I., Gavilán J., Montesino R., Sánchez O., Lopez M. G., Fuentealba J., Toledo J. R., *Redox Biol.*, **2018**, 14, 285—294
- [8] Rama R., Garzón F., Rodríguez-Cruz Y., Maurice T., García-Rodríguez J. C., *Neural Regen. Res.*, **2019**, 14(9), 1519—1521
- [9] García-Artalejo J. A., Mancera-Arteu M., Sanz-Nebot V., Rodríguez T., Giménez E., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2022**, 213, 114686
- [10] Pedrosa I., Garcia M., Casabona E., Morales L., Bringas M. L., Pérez L., Rodríguez T., Sosa I., Ricardo Y., Padrón A., Amaro D., *Behav. Sci. (Basel)*, **2018**, 8(5), 150—158
- [11] Ehrenreich H., Hinze-Selch D., Stawicki S., Aust C., Knolle-Veentjer S., Wilms S., Heinz G., Erdag S., Jahn H., Degner D., Ritzén M., Mohr A., Wagner M., Schneider U., Bohn M., Huber M., Czernik A., Pollmächer T., Maier W., Sirén A. L., Klosterkötter J., Falkai P., Rütter E., Aldenhoff J. B., Krampe H., *Mol. Psychiatry*, **2007**, 12(2), 206—220
- [12] Barbieri M., Chiadini P., Di Gennaro P., Hafez G., Liabeuf S., Malyszko J., Mani L. Y., Mattace-Raso F., Pepin M., Perico N., Simeoni M., Zoccali C., Tortorella G., Capuano A., Remuzzi G., Capasso G., Paolisso G., *Pharmacol. Res.*, **2024**, 203, 107146
- [13] Macias-Velez R. D., Rivera-Cervantes M. C., Marín-López A. G., Murguía-Castillo J., *Neurosci. Lett.*, **2023**, 812, 137366
- [14] Nagai R., Ebihara T., Kakino K., Masuda A., Xu J., Minamihata K., Kamiya N., Kongkrongtong T., Kawahara M., Mon H., Fujii T., Kusakabe T., Lee J. M., *J. Asia-Pac. Entomol.*, **2021**, 24(3), 544—549
- [15] Zhang Y. C., *Chinese J. Biol.*, **2020**, 33(12), 14544—1459 (张逸驰. 中国生物制品学杂志, **2020**, 33(12), 14544—1459)
- [16] Chen J., Fang H. Q., Zhou C. L., Chen H. P., *China Biotechnol.*, **2004**, 24(3), 1—6 (陈璟, 方宏清, 周长林, 陈惠鹏. 中国生物工程杂志, **2004**, 24(3), 1—6)
- [17] Ghosh S., *Sialic Acid and Biology of Life: An Introduction. Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and*

- Disease.*, Academic Press., Switzerland, 2020, 1—61
- [18] Wang X. Y., Shi S. L., Li Q., *J. Shenyang Agr. U.*, 2007, 38(3), 259—264(王学英, 石生林, 李群. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(3), 259—264)
- [19] Demir R., Şahar U., Deveci R., *BBA-Proteins Proteom.*, 2021, 1869(2), 140559
- [20] Gu S. Y., *Synthesis of Polyethylenimine Derivatives and Function in Gene Delivery*, Dalian University of Technology, Panjin, 2020(古苏云. 聚乙烯亚胺衍生物的合成及在基因递送中的作用研究, 盘锦: 大连理工大学, 2020)
- [21] Karki U., Wright T., Xu J. F., *J. Biotechnol.*, 2022, 355, 10—20
- [22] Demir R., Şahar U., Deveci R., *Biol. Bull.*, 2022, 242(2), 118—126
- [23] Sparbier K., Wenzel T., Kostrzewa M., *J. Chromatogr. B*, 2006, 840(1), 29—36
- [24] Bojar D., Meche L., Meng G. M., Eng W., Smith D. F., Cummings R. D., Mahal L. K., *ACS Chem. Biol.*, 2022, 17(11), 2993—3012
- [25] Fard M. G., Khabir Z., Reineck P., Cordina N. M., Abe H., Ohshima T., Dalal S., Gibson B. C., Packer N. H., Parker L. M., *Nanoscale Adv.*, 2022, 4(6), 1551—1564
- [26] Chen Q. S., Liu H., Li X. C., *Explor. Drug Sci.*, 2023, 1, 31—54
- [27] Liao F. L., Yang Z. F., Liu Y., Wu Y. Z., *Chinese J. New Drugs*, 2016, 25(1), 64—70(廖飞龙, 杨仲璠, 刘煜, 吴彦卓. 中国新药杂志, 2016, 25(1), 64—70)
- [28] Takegawa Y., Ito H., Keira T., Deguchi K., Nakagawa H., Nishimura S. I., *J. Sep. Sci.*, 2008, 31(9), 1585—1593
- [29] Gong B., Burnina I., Stadheim T. A., Li H. J., *J. Mass Spectrom.*, 2013, 48(12), 1308—1317

(Ed.: L, V, K, M)