

洪晨铖, 胡子璇, Josef VOGLMEIR, 等. 普通楼燕(*Apus apus*)源 N-乙酰氨基半乳糖转移酶的酵母表达及酶学特性 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(24): 211–220. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010173

HONG Chencheng, HU Zixuan, Josef VOGLMEIR, et al. Yeast Expression and Enzymatic Characterization of a Novel N-Acetylgalactosamine Transferase from *Apus apus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(24): 211–220. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010173

· 生物工程 ·

普通楼燕 (*Apus apus*) 源 N-乙酰氨基半乳糖转移酶的酵母表达及酶学特性

洪晨铖, 胡子璇, Josef VOGLMEIR*, 刘 丽*
(南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095)

摘 要: 本文通过开发新型 N-乙酰氨基半乳糖基转移酶用于黏蛋白体外 O-糖基化修饰。通过构建源自普通楼燕 (*Apus apus*) 的 ppGalNAcT 基因重组表达载体, 命名为 *AappGalNAcT11*, 并将其导入毕赤酵母细胞 GS115 中进行异源表达。通过酶促反应体系测定其催化活性, 并分析最适反应温度及其温度稳定性、最适反应 pH 及其 pH 稳定性、金属离子依赖性及 4 °C 储藏稳定性等生化特性。结果表明, 该目的蛋白的分子量大小约为 42.1 kDa, *AappGalNAcT11* 能够特异性地将 UDP-GalNAc 中的 GalNAc 连接到多肽 EA2 上, 并且还能够实现向受体蛋白 SUMO-MUC5AC 上添加 1~3 个 GalNAc, 形成三种不同的 Tn 抗原结构。该酶的最适反应温度为 37 °C, 在 20~40 °C 孵育 75 min 后, 均能保持 95% 以上活力, 最适反应 pH 为 9.0, pH 在 7~9 时, 孵育 5 d 后, 残余酶活力均保留在 80% 以上。其催化活性显著依赖于锰离子的存在; 此外, 该酶具有良好的 4 °C 稳定性, 储藏 21 d 后, 仍能保持 80% 的相对活性, 对 EA2 的 K_m 、 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 的值分别为 $1.152 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 21.145 min^{-1} 、 $18.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 表明 *AappGalNAcT11* 具有较高的催化效率。本研究为黏蛋白体外 O-糖基化修饰提供了新的工具酶 *AappGalNAcT11*, 同时也为该酶在生物合成及食品领域的应用奠定了理论基础。

关键词: 多肽; N-乙酰氨基半乳糖转移酶; 酵母表达; 糖基化修饰; 酶学特性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)24-0211-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010173

本文网刊:



Yeast Expression and Enzymatic Characterization of a Novel N-Acetylgalactosamine Transferase from *Apus apus*

HONG Chencheng, HU Zixuan, Josef VOGLMEIR*, LIU Li*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, a novel N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAcT) was developed for *in vitro* modification of mucins by O-glycosylation. A recombinant expression vector containing the ppGalNAcT gene derived from the common swift (*Apus apus*), *AappGalNAcT11* was constructed, with heterologous expression in *Pichia pastoris* GS115 cells. The catalytic activity was determined using an enzymatic reaction system and its biochemical properties, including optimum reaction temperature and temperature stability, optimum reaction pH and pH stability, metal ion dependence, and storage stability, were analyzed. The molecular weight of the target protein was approximately 42.1 kDa. *AappGalNAcT11* specifically transferred GalNAc from UDP-GalNAc to the peptide, EA2, and also added 1~3 GalNAc residues to the receptor protein, SUMO-MUC5AC, forming three distinct Tn antigen structures. The enzyme had optimal activity at 37 °C and retained >95% of its activity after incubation at 20 °C to 40 °C for 75 minutes. The optimal reaction pH was 9.0, and the enzyme retained >80% of its residual activity after incubation at pH7 to 9 for five days. The catalytic activity was

收稿日期: 2025-01-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31871793, 31871754)。

作者简介: 洪晨铖 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖组学与糖生物学, E-mail: 2022108040@stu.njau.edu.cn。

* 通信作者: Josef VOGLMEIR (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 糖组学与糖生物工程, E-mail: Josef.voglmeir@njau.edu.cn。

刘丽 (1972-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 糖组学与糖生物工程, E-mail: lichen.liu@njau.edu.cn。

significantly dependent on the presence of manganese ions. In addition, the enzyme had excellent stability at 4 °C, maintaining 80% of its relative activity after 21 days of storage. The K_m values of *AappGalNAcT11* for EA2 was 1.152 mmol·L⁻¹, and the K_{cat} and K_{cat}/K_m value for EA2 were 21.145 min⁻¹ and 18.6 μmol·L⁻¹·min⁻¹, indicating the *AappGalNAcT11* has high catalytic efficiency for EA2. This study provides a new enzyme, *AappGalNAcT11*, for *in vitro* modification of mucins by O-glycosylation and provides a theoretical foundation for its application in biosynthesis and the food industry.

Key words: polypeptide:N-acetylgalactosamine transferase; yeast expression; glycosylation modification; enzymatic characteristics

蛋白质的糖基化修饰是一种重要的翻译后修饰过程,糖链(如单糖、寡糖或多糖)通过共价键与蛋白质分子的特定氨基酸残基相连,从而改变蛋白质的性质和功能^[1]。O-连接的 α -N-乙酰半乳糖胺(O-linked α -N-acetylgalactosamine, O-GalNAc)糖基化因其在黏蛋白中的高丰度^[2],也被称为黏蛋白型 O-糖基化,是 O-糖基化修饰中最常见的类型之一。黏蛋白是一种高度 O-糖基化的糖蛋白,主要存在于膜蛋白和分泌蛋白上^[3]。黏蛋白结构中含有丰富的丝氨酸和苏氨酸残基,这些残基是 O-糖基化修饰的主要作用位点^[4]。在生物体内,黏蛋白 O-糖基化修饰的启动依赖于 N-乙酰氨基半乳糖转移酶(N-acetylgalactosamine transferase, ppGalNAcT)^[5]。ppGalNAcT 能够将糖基供体尿苷二磷酸-N-乙酰氨基半乳糖(uridine diphosphate N-acetylgalactosamine, UDP-GalNAc)中的 N-乙酰氨基半乳糖(N-acetylgalactosamine, GalNAc)转移至受体蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基上,形成 Tn 抗原结构(GalNAc- α -O-Ser/Thr),从而启动黏蛋白型 O-聚糖的生物合成^[6]。如图 1 所示,在其他糖基转移酶的作用下,Tn 抗原结构会进一步延伸,形成 core 1、core 2、core 3 和 core 4 等结构。此外,这些核心结构还可以被进一步修饰,从而形成多种不同结构的黏蛋白型 O-糖链,如唾液酸 Tn 抗原、唾液酸 Lewis X、唾液酸 T 抗原、硫酸化 sLeX 等^[7]。由于尚未发现 ppGalNAcT 的同工酶,ppGalNAcT 的生产对于大量制备黏蛋白型 O-聚糖具有重要意义。

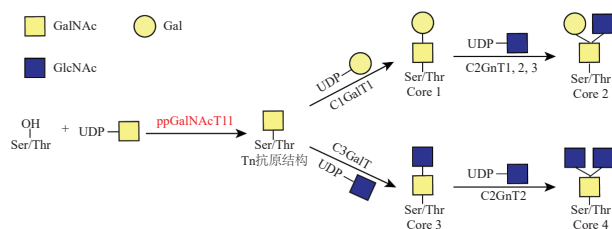


图 1 黏蛋白核心部位合成过程^[7]

Fig.1 Mucin core region synthesis process^[7]

目前,利用基因工程菌对 ppGalNAcT 进行异源表达已成为研究热点。例如,Cheng 等^[8]通过大肠杆菌表达人源(*homo sapiens*)和金丝燕(*Aerodramus fuciphagus*)来源的 ppGalNAcT,实现了燕窝黏蛋白的体外 O-糖基化修饰,为可食用燕窝的鉴定和重组燕窝黏蛋白的生产奠定了基础。李海洋等^[9]通过大

肠杆菌表达人源 ppGalNAc-T 合成了 O-糖蛋白药物白介素-2。然而,由于 ppGalNAcT 多存在于动物细胞中,属于真核蛋白质。因此,在大肠杆菌表达系统中容易形成包涵体^[10],难以进一步纯化,酵母作为真核生物,具有众多优点,如更有利于真核蛋白质的加工折叠^[11]、二硫键形成,且不存在内毒素^[12],安全性高,同时,由于酵母表达系统的遗传背景清晰,相比于大肠杆菌表达系统更适合用于生产真核蛋白^[13],因此表达的蛋白质在食品和医药方面更具有应用前景。然而目前的 ppGalNAcT 的最适反应 pH 主要集中在 7.0~7.5,不利于在碱性环境中的使用^[14]。因此本研究从 NCBI 数据库获取了普通楼燕(*Apus apus*)来源的多肽:N-乙酰氨基半乳糖转移酶基因(*AappGalNAcT11*),使用毕赤酵母细胞 GS115 表达系统中^[15]实现了异源表达,并对其进行了酶活性测定和生化性质分析,以期黏蛋白体外 O-糖基化修饰提供 pH 适用范围和温度适用性更广的工具酶,用于后续改善食物的功能特性,提高乳制品的蛋白热稳定性和抗酶解能力,增加蛋白的生物利用度、吸收特性和蛋白质抗氧化性等。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

AappGalNAcT11 基因重组表达载体 江苏金斯瑞生物科技有限公司; *E. coli* BMach T1 菌株、*E. coli* BL21(DE3)菌株 北京天根公司;实验室自行敲除 β -半乳糖苷酶基因并保藏的 *E. coli* BL21(DE3)菌株、毕赤酵母 GS115 菌株、SOMO-MUC5AC-*E. coli* BL21 菌株 南京农业大学糖组学与糖生物学实验室;金门克隆质粒、信号肽、启动子试剂盒(Kit #1000000166) Addgene 试剂采购平台;DNA 回收试剂盒 Lembio 生物;Bsa I 限制性内切酶 北京百奥莱博科技有限公司;DL2000 plus DNA Marker 全式金生物技术有限公司;蛋白质 Marker 赛默飞世尔科技有限公司;T4 DNA 连接酶、2×Rapid Taq Master Mix Takara 公司;pGEM-T 载体 普洛麦格(北京)生物技术有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉、葡萄糖、山梨醇 南京汶达生物技术有限公司;氯化钠 广东兴华科技股份有限公司;琼脂糖 北京海淀笃一生物科技有限公司;GoldView 核酸染料 翌圣生物科技有限公司;*AappGalNAcT11* PCR 扩增引物 南京金斯瑞生物科技有限公司;三

氟乙酸、潮霉素 B 色谱级,西格玛奥德里奇贸易有限公司;乙腈 色谱级,美国默克公司;2,5-二羟基苯甲酸(2,5-Dihydroxybenzoic acid, DHB)粉末 德国布鲁克公司。

Hema9600 型聚合酶链反应基因扩增仪 珠海黑马医学仪器有限公司;ZQZY-CT 型振荡培养箱 上海知楚仪器;KB-2B 型摇床 其林贝尔仪器制造有限公司;JRA-E 型超声波细胞破碎仪 杰瑞远仪器有限公司;DYY-7C 型电泳仪 北京市六一仪器厂;MX-E 型涡旋振荡仪 北京大龙仪器发展有限公司;LC-20A 型超高压液相色谱仪(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 日本岛津公司;Autoflex Max™ 型基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-ToF-MS) 德国布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *AappGalNAcT11* 重组表达载体的构建 将 NCBI 数据库中来源于普通楼燕(*Apus apus*)的 N-乙酰氨基半乳糖转移酶基因 *AappGalNAcT11* (Sequence ID: XP_051468391.1)序列委托擎科公司合成至 pET-30a(+)载体,得到重组质粒 pET30a(+)-*AappGalNAcT11*。配制 25 μL 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)反应混合液,其中含有 12.5 μL 2×Rapid Taq Master Mix、0.5 μL 模板 (重组质粒 pET30a(+)-*AappGalNAcT11*)、11 μL ddH₂O,以及各加入 0.5 μL 前/后引物, *AappGalNAcT11* 的前后引物序列如表 1 所示。PCR 扩增条件如下: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 0.5 min, 55 ℃ 退火 0.5 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 此步骤设置 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 4 ℃ 保温 10 min。采用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物,琼脂糖凝胶制作过程如下: 0.5 g 琼脂糖加至 50 mL 1×N-[2-羟基-1,2-乙二胺基]-三乙酸(Tris-Acetate-EDTA, TAE)缓冲液(1×TAE 缓冲液: 4.84 g Tris、0.37 g EDTA 使用 800 mL ddH₂O 溶解,冰醋酸调节 pH 至 8.0,定容至 1 L),轻微溶解后,使用微波炉加热至琼脂糖粉末完全溶解,冷却溶液至不烫手,加入 24.6 μL 核酸染料 GoldView 混匀,溶液倒入插入 25 μL 梳子的制胶器中,冷却 25 min 至其溶液完全凝固,拔去梳子,将制胶器的托盘及琼脂糖凝胶放在电泳槽中,电泳槽内倒入 1×TAE 缓冲溶液,使缓冲液没过凝胶。使用 DNA 回收试剂盒回收目的基因片段 *AappGalNAcT11*。将目的基因片段连接至中间载体 pGEM-T,送阳性克隆子至擎科生物公司测序。将序列正确的重组质粒 pGEM-T-*AappGalNAcT11*保藏于大肠杆菌 Mach1 T1 细胞中。使用 Bsa I 酶和 T4 连接酶,通过金门克隆方法^[16],将重组质粒 pGEM-T-*AappGalNAcT11*、载体 pPAP001、启动子和信号肽

表 1 PCR 扩增引物序列
Table 1 Primers for PCR amplification

基因名称	引物名称	引物序列
<i>AappGalNAcT11</i>	<i>AappGalNAcT11</i> -Fw	5'-TTGTggtctcAAGCAGAAA TGGGTATGATCTTCAA-3'
	<i>AappGalNAcT11</i> -Rv	5'-TTGTggtctcGCGAACCACC AGAGATCTGCATTTCCGG-3'

注:小写字母加下划线的序列为限制性内切酶识别序列。

进行一锅酶切连接,以构建重组表达载体 pPAP001-*AappGalNAcT11*。酶切连接产物直接转入大肠杆菌 Mach1 T1 超级感受态^[17]细胞中,并挑选阳性克隆子测序。将序列正确的菌落冻藏于-80 ℃ 冰箱。

1.2.2 *AappGalNAcT11* 的表达 利用高纯质粒提取试剂盒提取上述 1.2.1 构建的重组质粒 pPAP001-*AappGalNAcT11*。向该质粒中加入 2.6 倍体积的浓缩试剂(含有 3 mol/L 醋酸钠溶液(pH5.2):乙醇=1:9(v/v)),冰上静置 30 min 后离心(12000 r/min、30 min),弃上清。用 100 μL 70% 乙醇洗涤沉淀后再次离心(12000 r/min、30 min),弃上清。将沉淀风干后,加入 10 μL ddH₂O 复溶,得到浓缩重组质粒。采用电转化法^[18]将浓缩质粒转入新鲜制备的酵母感受态细胞 GS115 中,电转化条件为 1.5 kV、5.5 ms 脉冲间隔。电转化产物接种至 YPDA 固体培养基(含 250 μg/mL 潮霉素 B),30 ℃ 培养 72 h 至单菌落长出。将单菌落接种至 5 mL YPD 培养基中(含 250 μg/mL 潮霉素 B),30 ℃、240 r/min 培养 12 h 后,离心(8000 r/min、10 min)收集菌体沉淀。将菌体沉淀转移至 10 mL YPD 培养基中(含 250 μg/mL 潮霉素),并调整菌液 OD_{600 nm} 值为 1 左右。16 ℃、240 r/min 培养 120 h,离心(8000 r/min、15 min)收集菌体沉淀。向菌体沉淀中加入 200 mg 不锈钢钢珠(直径 0.06 mm)和 600 μL Lysis buffer(含 100 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl 和 1% Triton, pH8.0),涡旋 5 min(每涡旋 1 min 冰浴 30 s),离心(12000 r/min、10 min)收集上清液,即为粗酶液。

1.2.3 *AappGalNAcT11* 的纯化 采用 Ni²⁺-NTA 亲和层析法^[19]纯化。使用缓冲液 A(含 50 mmol/L Tris-HCl 和 50 mmol/L NaCl, pH8.0)平衡柱子后,粗酶液以 0.5 mL/min 的流速上样。然后使用缓冲液 A 洗涤多余的杂蛋白,缓冲液 B(含 50 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl 和 500 mmol/L 咪唑, pH8.0)洗脱目的蛋白。取纯化后的目的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western-Blot^[20]分析。

1.2.4 *AappGalNAcT11* 的活性测定 配制 10 μL 反应混合液,其中包含 1 mmol/L 上皮抗原 2 多肽(Epithelial Antigen 2 Peptide, EA2),1 mmol/L Mn²⁺, 50 mmol/L 2-吗啉乙磺酸(2-Morpholinoethanesulphonic acid, MES)(pH7.0), 0.74 μg *AappGalNAcT11* 酶。以同等体积的水代替酶溶液加到反应混合液作为阴性对照。反应混合液 37 ℃ 反应 12 h 后,

95 ℃ 加热 10 min 灭活后离心(12000 r/min、15 min), 取上清液加 ddH₂O 稀释 3 倍制备成待测样品。使用 UPLC 进行检测, 液相检测系统配备 LC-30AD 泵和 SIL-30AC 自动进样器。液相色谱检测参数设置如下: 流动相 A: ddH₂O (含 0.1% 三氟乙酸); 流动相 B: 色谱乙腈(含 0.1% 三氟乙酸); 色谱柱: Cosmosil 5 C18 MS-II 4.6×250 mm 反向色谱柱; 检测器: 紫外检测器; 激发波长(Ex)285 nm, 发射波长(Em)365 nm; 总流速: 1 mL/min; 洗脱方式: 梯度洗脱, 洗脱程序见表 2。根据 UPLC 检测的产物与底物的荧光信号的峰面积计算底物转化率, 进而比较酶活力, 按照下式计算转化率:

$$\text{转化率(\%)} = \frac{\text{产物峰面积}}{\text{产物峰面积} + \text{剩余底物峰面积}} \times 100$$

表 2 超高效液相色谱梯度洗脱条件
Table 2 Procedure of gradient elution of UPLC

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0.01~5.00	99	1
5.01~25.00	95	5
25.01~27.00	85	15
27.01~30.00	10	90
30.01~32.00	10	90
32.01~38.00	95	5

1.2.5 UPLC 监测 *AappGalNAcT11* 的反应进程 按照 1.2.4 小节配制反应混合液, 在 37 ℃ 下分别孵育 0、0.5、1、2、4、6 和 8 h。孵育结束后, 95 ℃ 加热 10 min 灭活后离心(12000 r/min、15 min), 取上清液加 ddH₂O 稀释 3 倍用于 UPLC 检测, 具体参数设置见 1.2.4。

1.2.6 *AappGalNAcT11* 酶学性质测定

1.2.6.1 最适反应 pH 的测定 使用缓冲液 MES pH 3.0、4.0、5.0、7.0、9.0、11.0。按照 1.2.4 活性测定的方法检测酶活力, 以最高酶活力设为 100%, 按照下式计算相对酶活力:

$$\text{相对酶活力(\%)} = \frac{\text{酶活力}}{\text{最大酶活力}} \times 100$$

1.2.6.2 最适反应温度的测定 反应温度分别设置为 4、15、31、37、45、55 ℃。按照 1.2.4 活性测定的方法检测酶活力, 相对酶活力测定计算方法见 1.2.6.1。

1.2.6.3 金属离子对酶活性影响的测定 金属离子分别为 Al³⁺、K⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Fe³⁺(10 mmol/L)。乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA)(10 mmol/L)用于螯合反应溶液中的痕量金属离子。按照 1.2.4 活性测定的方法检测酶活力, 相对酶活力测定计算方法见 1.2.6.1。

1.2.6.4 4 ℃ 贮藏稳定性的测定 将纯化后的酶液在 4 ℃ 下储藏, 以第 0 d 时的酶液作为对照, 之后每隔 7 d 取相同量酶液, 按照 1.2.4 活性测定的方法检

测酶活力, 相对酶活力定义为各贮存时间下的酶活力与酶活力最大值的比值。

1.2.6.5 温度稳定性的测定 将酶分别置于 20、30、40、50、60、75 ℃ 条件下预先孵育 15、30、45、60、75 min。按照 1.2.4 活性测定的方法检测酶活力, 相对酶活力测定计算方法见 1.2.6.1。

1.2.6.6 pH 稳定性的测定 将酶置于 pH 为 3、5、7、9、11 的缓冲液下预先孵育 1、2、3、4、5 d。按照 1.2.4 活性测定的方法检测酶活力, 相对酶活力测定计算方法见 1.2.6.1。

1.2.6.7 动力学参数测定 配制终浓度为 1、2、3、5、10、15、20 mmol/L 的 EA2 作为底物, 最适反应条件下反应 90 min, 按照 1.2.4 活性测定的方法检测酶活力, 使用 Graphpad prism 处理数据, 获得 K_m、V_{max} 值, 按照下式计算 K_{cat} 值, [E] 为 *AappGalNAcT11* 浓度。

$$K_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]}$$

1.2.7 *AappGalNAcT11* 底物特异性的检测 使用 UDP-D-GalNAc、尿苷二磷酸-D-半乳糖(Uridine diphosphate-α-D-galactose, UDP-D-Gal)、尿苷二磷酸-D-葡萄糖(Uridine diphosphate-α-D-glucose, UDP-D-Glc)、尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(Uridine diphosphate-N-acetyl-α-D-glucosamine, UDP-D-GlcNAc) 分别作为糖基供体, 并按照 1.2.4 活性测定的方法检测酶活力。

1.2.8 *AappGalNAcT11* 体外催化合成 Tn 结构 SOMO-MUC5AC-E.coli BL21 表达蛋白、纯化蛋白方法见 1.2.2 与 1.2.3。配制 10 μL 反应混合液, 其中包含 1 mmol/L Mn²⁺, 50 mmol/L MES-buffer(pH9.0), 1.5 mmol/L UDP-D-GalNAc, 0.74 μg *AappGalNAcT11* 酶, 1.5 μg SOMO-MUC5AC 蛋白。设置一组以 ddH₂O 代替酶液的反应作为对照组, 反应置于 37 ℃ 孵育 9 h, 95 ℃ 灭活 15 min, 12500 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 ddH₂O 稀释 50 倍, 使用 20% DHB 作为基质, MALDI-TOF-MS 仪器检测产物 Tn 抗原的合成, 设置检测范围为 700~3500 Da。

1.2.9 *AappGalNAcT11* 二级结构的分析 将纯化后的酶溶液进行脱盐处理并冻干成蛋白粉末。称取适量的溴化钾, 在马弗炉(300 ℃, 5 h)中烘干。将蛋白粉末与干燥的溴化钾按照质量比 1:90 进行均匀混合、研磨, 并使用压片机(20 MPa, 40 s)持续压制, 形成透明片状样品。以溴化钾作为对照, 使用傅里叶变换红外光谱仪对样品进行分析。波长范围设为 400~4000 cm⁻¹, 样品和背景的扫描时间均为 64 次扫描, 分辨率为 4 cm⁻¹。利用 PeakFit 和 OriginPro 软件对所得数据进行了分析和处理。

1.2.10 *AappGalNAcT11* 与 UDP-D-GalNAc 的分子对接 使用 NCBI 获得基因对应氨基酸序列(Gene

ID: 127381744), 使用 SWISS-MODEL 预测蛋白质的三级结构^[21]。从 PubChem 数据库得到小分子配体 UDP-D-GalNAc 的三级结构 (Compound CID: 22833553)。采用 AutoDock 进行分子对接, 并使用 PyMOL 软件进行蛋白及配体复合物可视化分析^[22]。

1.3 数据处理

本研究每个反应均设置三个重复, 使用 PeakFit 和 OriginPro 进行数据处理, 使用 AI 作图, 使用 SPSS 26 软件进行显著性分析, 分析方法为方差分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *AappGalNAcT11* 基因重组表达载体的构建和表达

以重组质粒 pET30a(+)-*AappGalNAcT11* 为模板进行 PCR 扩增后, 采用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行鉴定和分离。PCR 扩增结果如图 2(a) 所示, 得到与目的基因片段长度(1117 bp)基本相符的条带。将目标 PCR 产物纯化后, 进行后续重组表达载体的构建。将构建成功的重组质粒导入毕赤酵母 GS115 细胞中进行异源表达, 采用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析法对纯化目的蛋白, 使用一抗: 小鼠抗 his-tag 单克隆抗体, 二抗: 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 偶联的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 抗体对纯化的蛋白进行 Western-Blot 鉴定。3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)在辣根过氧化物酶作用下可以氧化产生蓝紫色稳定产物^[23], 使用 TMB 沉淀型显色液进行染色后的 Western-Blot 结果如图 2(b) 所示, 出现一条能够被抗体识别的蛋白条带, 且该条带的分子量与目的蛋白的理论分子量(42.1 kDa)基本相符。表明 *AappGalNAcT11* 基因在毕赤酵母 GS115 细胞中成功实现了异源表达。

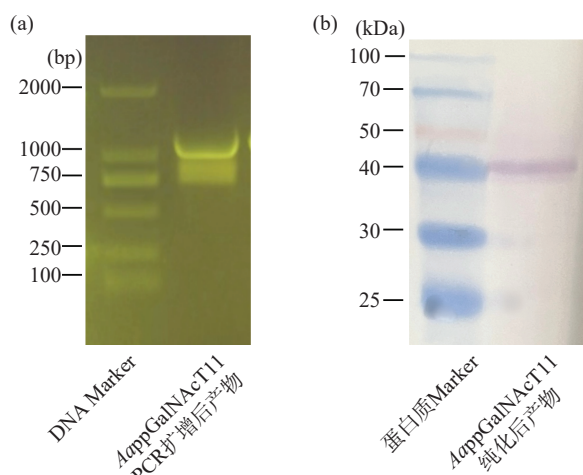


图 2 *AappGalNAcT11* 的 PCR 扩增结果(a) 和 Western-Blot 分析(b)

Fig.2 PCR amplification results (a) and Western-Blot analysis (b) of *AappGalNAcT11*

2.2 *AappGalNAcT11* 的活性测定

以 EA2 作为受体多肽, UDP-D-GalNAc 为糖基供体, 测定纯化后 *AappGalNAcT11* 的催化活性。目标产物 EA2-GalNAc 会在底物 EA2 保留时间前 2.75 min 处出现产物峰^[8], 结果如图 3 所示, 对照组只在保留时间为 19.75 min 时出现底物峰, 未出现产物峰。含 *AappGalNAcT11* 的反应混合液中没有检测到底物峰, 只在保留时间约 17.0 min 处出现一个产物峰, 底物被完全消耗, 这表明 *AappGalNAcT11* 具有催化 UDP-D-GalNAc 上的 GalNAc 连接到受体多肽 EA2 上的良好活性。

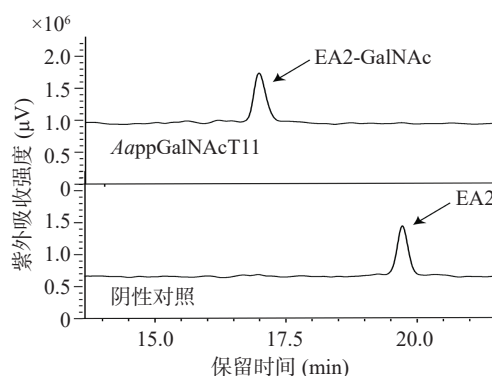


图 3 *AappGalNAcT11* 酶活性测定

Fig.3 Activity test of *AappGalNAcT11*

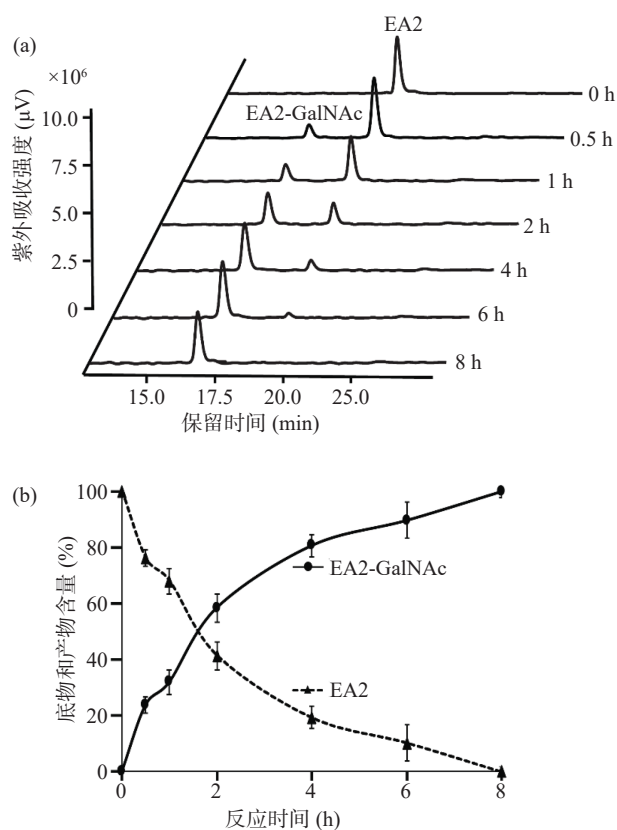
2.3 UPLC 监测 *AappGalNAcT11* 的反应进程

图 4(a) 呈现了反应进程中底物 EA2 与产物 EA2-GalNAc 色谱峰的变化。EA2 基团从基态跃迁到激发态, 并从激发态返回基态时释放能量, 产生的荧光信号值可定量检测物质。反应进程中产物与底物含量定量分析的结果如图 4(b) 所示, 由于反应产物的消耗和底物积累与抑制作用^[24], 在 0~8 h 的反应时间范围内, 该酶的转化率呈现出稳步上升的趋势。反应在 0~2 h 时, 反应速率较快, 底物消耗超过 50%, 2~8 h 范围内, 反应速率逐渐减小。

2.4 *AappGalNAcT11* 的酶学性质

2.4.1 最适反应 pH 如图 5(A) 所示, *AappGalNAcT11* 最适 pH 为 9.0, 并且具有较宽的 pH 适应范围。在 pH3.0~9.0 范围内, 酶活力能够保持在 60% 以上。而在 pH9.0~11.0 范围内, 酶活力均也能保持在 60% 以上。其他来源的 ppGalNAcT 最适 pH 大多为 7.0~7.5^[14], *Homo sapiens* 源、*Aerodramus fuciphagus* 源最适 pH 为 7.0^[8], *Pseudomonas aeruginos* 的最适 pH 为 7.5^[25], 因此在碱性的反应体系中 *AappGalNAcT11* 更具优势。

2.4.2 最适反应温度 如图 5(B) 所示, *AappGalNAcT11* 最适反应温度为 37 °C。当反应温度超过 37 °C 时, 酶活性迅速下降。55 °C 时, 酶的活性下降至 50%。*AappGalNAcT11* 比 *Homo sapiens* 源和 *Aerodramus fuciphagus* 源 ppGalNAcT11 的最适反

图4 UPLC 监测 *AappGalNAcT11* 的反应进程Fig.4 UPLC results for monitoring of the reaction process of *AappGalNAcT11*

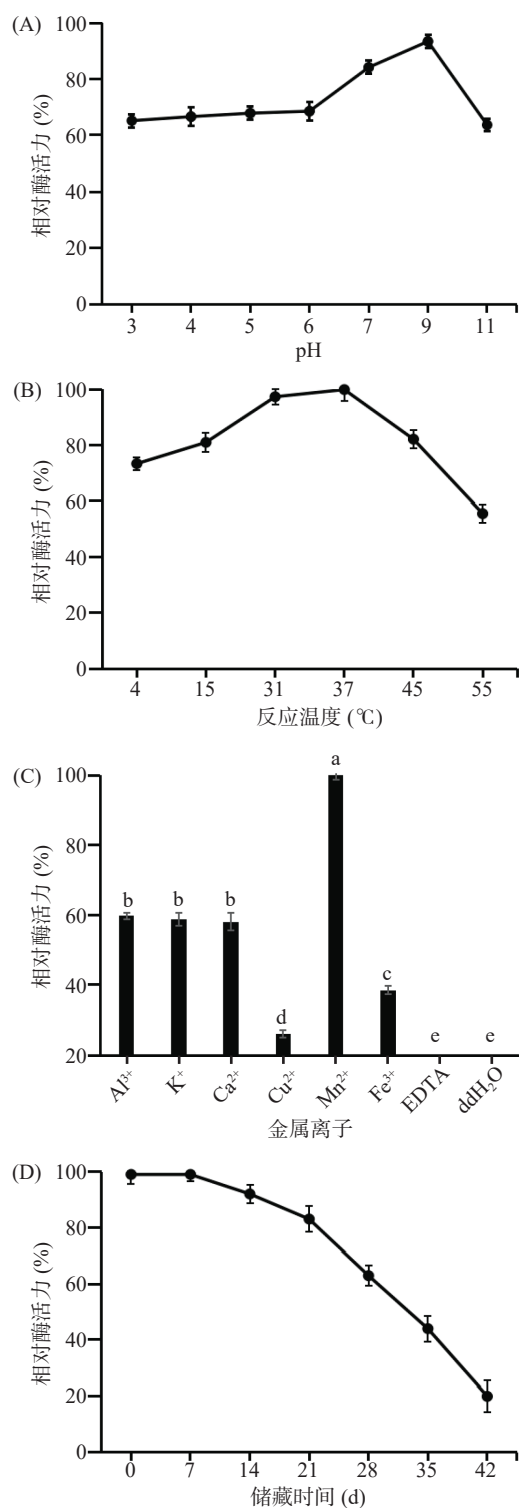
注: (a): 底物和产物的信号峰检测结果; (b): 底物和产物含量的定量分析。

应温度高, *AappGalNAcT11* 与其相比有更宽的温度适应性, *Homo sapiens* 源和 *Aerodramus fuciphagus* 源 *ppGalNAcT* 在 55 °C 时, 其相对酶活力降至 20% 以下^[8], 而 *Apus apus* 源酶活能保持 50% 左右。

2.4.3 金属离子对酶活性的影响 如图 5(C) 所示, 经 EDTA 处理后, 酶的催化作用完全丧失。在引入的不同金属离子中, Mn^{2+} 对酶活性的促进作用最为显著 ($P < 0.05$)。加入 Al^{3+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 后, 酶活力提升至约 60%, 加入 Fe^{3+} 后, 酶活力提升至约 40%, 加入 Cu^{2+} 后, 酶活力提升至约 25%。这表明 *AappGalNAcT11* 具有金属离子依赖性, 且 Mn^{2+} 对其催化活性具有显著的促进作用。以往的研究表明, 大多数糖基转移酶都是金属离子依赖性酶, 需要 Mn^{2+} 作为辅助因子来发挥其正常功能^[26]。同样, 其他研究者挖掘的 *ppGalNAcT* 也需要 Mn^{2+} 促进其催化活性^[27]。

2.4.4 4 °C 条件储藏稳定性 如图 5(D) 所示, *AappGalNAcT11* 在 4 °C 条件下储藏的前 7 d 内活性无明显降低, 且在前 21 d 内仍能保持超 80% 的相对活性。至第 42 d 时, 酶活性已降至 22%。

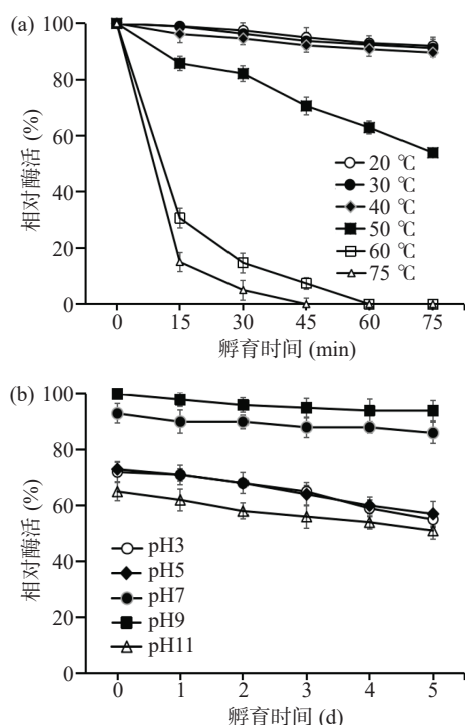
2.4.5 温度稳定性 如图 6(a) 所示, *AappGalNAcT11* 在 20~40 °C 处理 75 min, 均能保持 95% 以上活力, 说明该酶在 20~40 °C 短时间孵育仍能具有较强的活性, 孵育温度在 60 °C 及以上时, 孵育 15 min 时, 酶

图5 *AappGalNAcT11* 的酶学特性Fig.5 Determination of enzymatic characterization of *AappGalNAcT11*

注: (A): 最适 pH; (B): 最适温度; (C): 最适金属离子; (D): 4 °C 储藏稳定性; 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

活降低至 40% 以下, 75 °C 孵育 45 min, 酶完全失活, *Biomphalaria glabrata* 来源的 *ppGalNAcT* 于 37 °C 处理 72 h 后, 活性仅剩余 10%^[28], 说明 *ppGalNAcT* 不具有较强的温度稳定性。

2.4.6 pH 稳定性 如图 6(b) 所示, pH 在 7~9 时, 孵育 5 d 残余酶活力均保留在 80% 以上, pH 在 3、9、

图 6 *AappGalNAcT11* 的酶学特性Fig.6 Determination of enzymatic characterization of *AappGalNAcT11*

注: (a): 温度稳定性; (b): pH 稳定性。

11 条件下, 孵育 5 d 残余酶活力均保留在 50% 以上, 说明该酶在弱酸性和弱碱性条件下均有较好的稳定性。

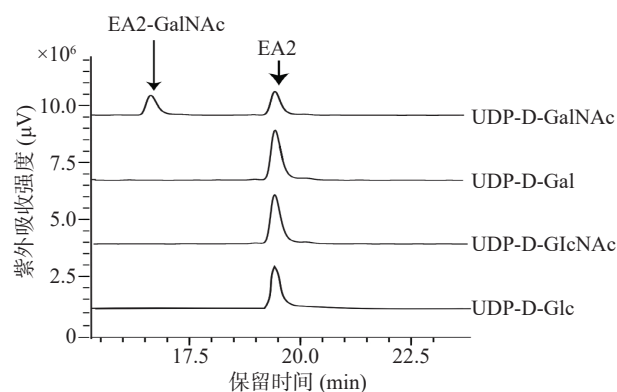
2.4.7 动力学参数 在 *AappGalNAcT11* 最适条件下测定其动力学参数, *AappGalNAcT11* 的 K_m 为 1.152 mmol/L, V_{max} 为 0.02574 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, K_{cat} 为 21.145 min^{-1} . K_{cat}/K_m 为 18.6 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。与 *Aerodramus fuciphagus*, *Nomia melanderi*, *Homo sapiens* 来源的 ppGalNAcT2 相比^[8], V_{max} 是其 2.01 倍、1.56 倍、1.75 倍。 K_{cat}/K_m 表示酶的催化效率常数, 综合反映了酶对底物的亲和力和催化效率^[29]。 K_{cat}/K_m 的值分别为其 1.72 倍、1.98 倍、1.68 倍。综上所述表明 *AappGalNAcT11* 具有较强的亲和力及催化效率。

2.5 *AappGalNAcT11* 的底物特异性

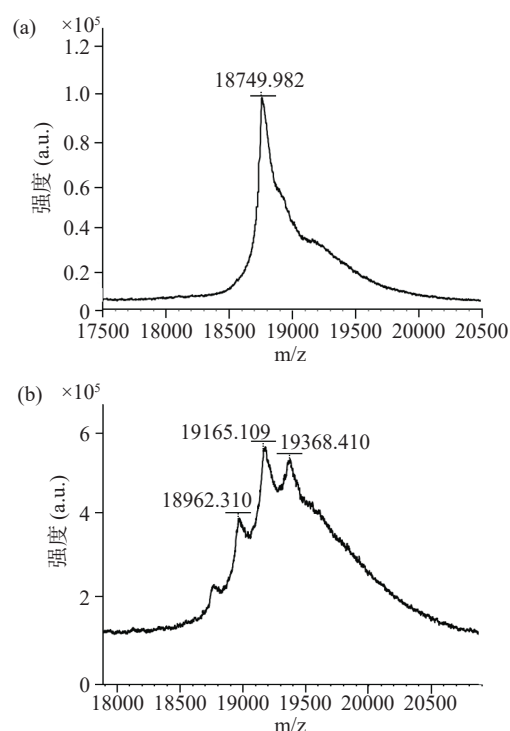
以 EA2 作为受体多肽, 将不同的糖基供体与 *AappGalNAcT11* 反应测定底物特异性。结果如图 7 所示, 只有 UDP-D-GalNAc 作为糖基供体时, 有产物 EA2-GalNAc 产生。表明 *AappGalNAcT11* 特异性的将 UDP-D-GalNAc 转移至受体多肽。符合先前研究表明 ppGalNAcT 酶具有 UDP-D-GalNAc 底物特异性的结论^[30-31]。

2.6 *AappGalNAcT11* 体外催化合成 Tn 结构

Tn 抗原结构(GalNAc- α -O-Ser/Thr)是启动黏蛋白型 O-聚糖生物合成的核心结构。以包含 8 个氨基酸的串联重复序列 SOMO-MUC5AC 蛋白质质

图 7 UPLC 检测 *AappGalNAcT11* 底物特异性Fig.7 UPLC detection of substrate specificity of *AappGalNAcT11*

作为受体, 以 UDP-D-GalNAc 作为糖基供体, 在 *AappGalNAcT11* 的催化下尝试体外合成 Tn 抗原结构^[32]。通过分析所得的 MALDI-ToF-MS 图谱(图 8), 根据质谱峰的质荷比(m/z)可计算出底物蛋白 SUMO-MUC5AC 上所连接的 GalNAc 的数量。 m/z 为 18962.310 的峰表明底物蛋白上连接了一个 GalNAc; m/z 为 19165.109 的峰连接了两个 GalNAc; m/z 为 19368.410 的峰代表着连接了三个 GalNAc。结果表明, *AappGalNAcT11* 可催化在 SUMO-MUC5AC 的 O-糖基化位点上连接 1~3 个 GalNAc 分子, 形成三种不同的 Tn 抗原结构。*Homo sapiens* 源的 ppGalNAcT 则可转移 7~11 个 GalNAc 至 SUMO-MUC5AC 上^[33], *Aerodramus fuci-*

图 8 MALDI TOF MS 检测 *AappGalNAcT11* 的反应Fig.8 MALDI TOF MS detects *AappGalNAcT11* reaction

注: (a): 阴性对照: SOMO-MUC5AC; (b): *AappGalNAcT11* 与 SOMO-MUC5AC 反应。

phagus 源的 ppGalNAcT11 可转移 1~4 个 GalNAc 至 SOMO-MUC5AC 上^[8]。相比之下 *AappGalNAcT11* 的最适催化 pH 更偏碱性, 因此 *Apus apus* 来源的 ppGalNAcT11 的发掘丰富了体外合成短链 Tn 抗原的工具酶, 为癌症疫苗开发和免疫调节研究提供试验基础。

2.7 *AappGalNAcT11* 二级结构的分析

由于蛋白质的二级结构与蛋白质的性质有密切关系, 为后续了解蛋白质的折叠机制、预测与理解蛋白质功能^[34], 对蛋白质的二级结构进行分析。经过 PeakFit 和 OriginPro 软件的精确计算, 获得了图 9 所示去卷积图。 β -折叠、无规则卷曲、 α -螺旋和 β -转角所对应的波长范围, 分别为 1600~1640 cm^{-1} 、1640~1650 cm^{-1} 、1650~1660 cm^{-1} 和 1660~1700 cm^{-1} 。进一步地, 根据各个波长范围内的峰面积, 计算出了蛋白 *AappGalNAcT11* 二级结构中各组分所占的比例(图 9)。结果显示, β -折叠占 13.89%, 无规则卷曲

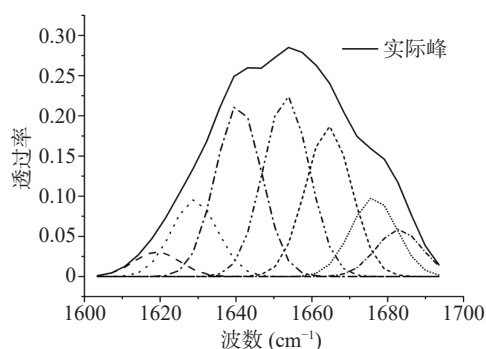


图 9 *AappGalNAcT11* 傅里叶光谱去卷积图

Fig.9 FTIR spectrum characterization deconvolution image of *AappGalNAcT11*

占 23.58%, α -螺旋占 24.74%, 而 β -转角则占据了 37.79%。 α -螺旋的占比较高的蛋白具有较好的结构稳定性^[35], β -折叠具有较强的机械强度, 能为蛋白质提供较好支撑^[36]。这些分析结果为后续的蛋白质工程、功能研究和应用开发提供了重要的理论支持。

2.8 *AappGalNAcT11* 与 UDP-GalNAc 的分子对接

对蛋白质的三级结构进行预测, 并将预测的蛋白质三级结构与 UDP-D-GalNAc 配体的三维结构模型进行对接。三维结构预测如图 10 所示, *AappGalNAcT11* 为单体酶, 包含 17 个 α -螺旋、12 个 β -折叠及无规则卷曲。配体的结合稳定性与结合能大小有关^[37], 选择亲和力最强的结合位点进行分析, 最小结合能为 -8.5 kcal/mol, *Aerodramus fuciphagus* 源 ppGalNAcT2 的最小结合能为 -6.9 kcal/mol, *Nomia melanderi* 源 ppGalNAcT2 为 -6.7 kcal/mol, *Homo sapiens* 源 ppGalNAcT2 为 -6.5 kcal/mol^[8], 说明 *AappGalNAcT11* 与底物结合能力更强, 反应更易发生。在 *AappGalNAcT11* 活性口袋位点中心的氨基酸残基为 Cys63、Asp150、His283、Arg286、Arg289、Ala403。配体与转移酶的 Cys63、Arg289、Ala403、Arg286、His283、Trp255 之间形成了氢键, 氢键可以增强稳定性、促进选择性识别、提升反应速率以及诱导契合作用等^[38]。配体与转移酶的 Tyr291、Asp96、Tyr65、Phe64、Ser151、His152、Ile405、Pro290、Phe285、Leu234、Leu130、Arg127、Ile179、Ala231 之间形成范德华力, 促进酶和底物结合、稳定复合物结构、优化催化微环境以及调节酶的选择性等^[39]。通过了解对接时的关键氨基酸, 可后续通过对关键氨基酸残基进行突变, 进一步优化酶的性能。

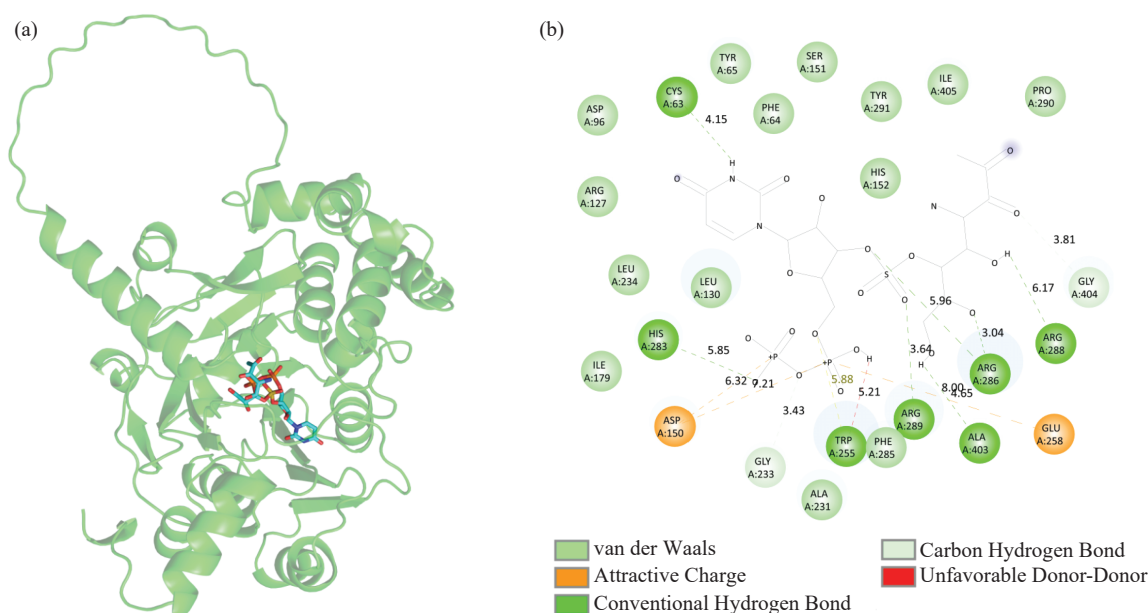


图 10 *AappGalNAcT11* 分子对接结果

Fig.10 Molecular docking result of *AappGalNAcT11*

注: (a): 分子对接 3D 图; (b): 分子对接 2D 图。

3 结论

本研究挖掘出来自普通楼燕的 *AappGalNAcT11* 基因, 构建基因重组表达载体后在毕赤酵母(GS115)中成功实现异源表达。酶学特性研究结果显示: *AappGalNAcT11* 的最适反应温度为 37 °C; 最适 pH 为 9.0, 相较于先前所挖掘的 *ppGalNAcT* 具有宽泛的 pH 适应范围, 在 pH3.0~11.0 均具有良好的活性; 对金属离子 Mn^{2+} 具有高依赖性。在 4 °C 条件下储藏的前 7 d 内活性无明显降低, 且在前 21 d 内仍能保持超 80% 的相对活性。该酶在 pH3、9、11 条件下, 孵育 5 d 残余酶活力均保留在 50% 以上, 在弱酸性和弱碱性条件下均有较好的稳定性, 不具有较好的温度稳定性, 孵育温度在 60 °C 及以上时, 孵育 15 min, 酶活降低至 40% 以下。此外, *AappGalNAcT11* 对糖基供体 UDP-D-GalNAc 表现出高度的底物特异性, 不能转移 UDP-D-Gal、UDP-D-GlcNAc、UDP-D-Glc 到受体多肽。MALDI-ToF-MS 的结果揭示了 *AappGalNAcT11* 能够将 1~3 个 GalNAc 分子转移至 SUMO-MUC5AC 的苏氨酸或丝氨酸残基上, 从而实现不同程度的 O-糖基化修饰, 丰富了体外合成短链 Tn 抗原的工具酶。傅立叶变换红外光谱对 *AappGalNAcT11* 的二级结构进行解析可知, β -转角占比最高, 为 37.79%, 其次是 α -螺旋, 占 24.74%, 无规则卷曲占 23.58%, β -折叠占 13.89%。通过分子对接可视化结果可知, *AappGalNAcT11* 在与底物 UDP-GalNAc 进行结合时, 亲和力最强的结合能为 -8.5 kcal/mol, 作用力以氢键和范德华力为主, 在 *AappGalNAcT11* 活性口袋位点中心的氨基酸残基为 Cys63、Asp150、His283、Arg286、Arg289、Ala403, 配体与转移酶的 Cys63、Arg289、Ala403、Arg286、His283、Trp255 之间形成了氢键, 配体与转移酶的 Tyr291、Asp96、Tyr65、Phe64、Ser151、His152、Ile405、Pro290、Phe285、Leu234、Leu130、Arg127、Ile179、Ala231 之间形成范德华力, 通过了解结合氨基酸, 为后续优化酶活奠定基础。通过探讨转移酶 *AappGalNAcT11* 的理化性质和催化特性, 并对酶进行结构解析, 这一发现为进一步理解该酶在 O-糖基化过程中的作用机制提供了重要线索。通过糖基化修饰, 可以增加食物中蛋白质的稳定度、溶解性及乳化性, 可以提高蛋白质的抗氧化能力, 因此该酶的挖掘为食品的品质优化提供了新的工具酶, 并为癌症疫苗开发和免疫调节提供研究基础。本文通过分子对接了解到酶促反应中关键氨基酸位点, 后续可对关键氨基酸进行突变, 提高目标蛋白的纯度和产量, 并可通过分子对接进一步研究 Mn^{2+} 对促进酶促反应的机理。

参考文献

- [1] ZHANG Qing, LI Lin, LAN Qiuyu, et al. Protein glycosylation: A promising way to modify the functional properties and extend the application in food system[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(15): 2506–2533.
- [2] POOLE J, DAY C J, von ITZSTEIN M, et al. Glycointeractions in bacterial pathogenesis[J]. *Nature Reviews. Microbiology*, 2018, 16(7): 440–452.
- [3] XU R, HANSON S R, ZHANG Z W, et al. Site-specific incorporation of the mucin-type N-acetylgalactosamine- α -O-threonine into protein in *Escherichia coli*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(48): 15654–15655.
- [4] KASHYAP B, KULLAA A M. Regulation of mucin 1 expression and its relationship with oral diseases[J]. *Archives of Oral Biology*, 2020, 117: 104791.
- [5] MAGALHÃES A, DUARTE H O, REIS C A. The role of O-glycosylation in human disease[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2021, 79: 100964.
- [6] LI Jiajia, GUO Bo, ZHANG Wenqi, et al. Recent advances in demystifying O-glycosylation in health and disease[J]. *Proteomics*, 2022, 22(23-24): e2200156.
- [7] RILEY N M, BERTOZZI C R, PITTERI S J. A pragmatic guide to enrichment strategies for mass spectrometry-based glycoproteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100029.
- [8] CHENG Ge, LYU Yunsheng, RAN Ran, et al. Expression and *in vitro* glycosylation of recombinant edible bird nest (EBN) mucin[J]. *Food Materials Research*, 2024, 4(1): e002.
- [9] 李海洋, 张森, 陆峰, 等. 真核翻译起始因子 4γ2 调控 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 1 mRNA 对胃癌细胞恶性表型的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2023, 27(2): 40–49. [LI Haiyang, ZHANG Miao, LU Feng, et al. Effect of eukaryotic translation initiation factor 4γ2 on the malignant phenotype of gastric cancer cells regulated by N-acetylgalactosaminotransferase 1 mRNA[J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2023, 27(2): 40–49.]
- [10] BHATWA A, WANG W J, HASSAN Y I, et al. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 630551.
- [11] MOHANTY S, BABBAL, KHASA Y P. Heterologous protein expression in yeast and molds[M]. *Progress in Mycology*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2021: 621–670.
- [12] FUX A C, CASONATO MELO C, SCHLAHSA L, et al. Generation of endotoxin-specific monoclonal antibodies by phage and yeast display for capturing endotoxin[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(4): 2297.
- [13] THAKUR R, SHANKAR J. Strategies for gene expression in prokaryotic and eukaryotic system[M]. *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds*. Singapore: Springer Singapore, 2017: 223–247.
- [14] TAUS C, LUCINI C, SATO T, et al. Expression and characterization of the first snail-derived UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine; Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2013, 30(9): 825–833.
- [15] YANG Fan, SHANG Shang, QI Mengfei, et al. Yeast glucan particles: An express train for oral targeted drug delivery systems[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253 (Pt 5): 127131.

- [16] PÜLLMANN P, KNORRSCHEIDT A, MÜNCH J, et al. A modular two yeast species secretion system for the production and preparative application of unspecific peroxxygenases[J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 562.
- [17] ALVES M N, NAI Y H, POWELL S M, et al. Isotachophoresis for rapid transformation of *Escherichia coli*[J]. *Electrophoresis*, 2022, 43(4): 543–547.
- [18] KARBALAEI M, REZAEI S A, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(9): 5867–5881.
- [19] FEAST S, TITTERINGTON J, HOANG V A, et al. Purification of his-tagged proteins using printed monolith adsorption columns[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2024, 1733: 465216.
- [20] KURIEN B T, SCOFIELD R H. Western blotting[J]. *Methods*, 2006, 38(4): 283–293.
- [21] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583–589.
- [22] RAUF M A, ZUBAIR S, AZHAR A. Ligand docking and binding site analysis with pymol and autodock/vina[J]. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2015, 4(2): 168–177.
- [23] LI Meng, HE Yifan, MENG Hong, et al. Multiple effects of sodium dodecyl sulfate on chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase[J]. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2021, 42(4): 526–536.
- [24] DA SILVA A S, ESPINHEIRA R P, TEIXEIRA R S S, et al. Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: A critical review[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 58.
- [25] SHARMA S, CREUZENET C, JARRELL K F, et al. Glycosyltransferase-coupled assays for 4-epimerase WbpP from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1954: 255–268.
- [26] DURIN Z, HOUDOU M, LEGRAND D, et al. Metalloglycobiology: The power of metals in regulating glycosylation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*, 2023, 1867(9): 130412.
- [27] DENG Xiaofang, LIAO Jianxun, ZHAO Zhuqing, et al. Distribution and speciation of selenium in soybean proteins and its effect on protein structure and functionality[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 130982.
- [28] TAUS C, WINDWARDER M, ALTMANN F, et al. UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase from the snail *Biomphalaria glabrata* - substrate specificity and preference of glycosylation sites[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2014, 31(9): 661–670.
- [29] FAIAD NAIEF M, MISHAAL MOHAMMED A, KHALAF Y H. Kinetic and thermodynamic study of ALP enzyme in the presence and absence MWCNTs and Pt-NPs nanocomposites[J]. *Results in Chemistry*, 2023, 5: 100844.
- [30] DE LAS RIVAS M, PAUL DANIEL E J, COELHO H, et al. Structural and mechanistic insights into the catalytic-domain-mediated short-range glycosylation preferences of GalNAc-T4[J]. *ACS Central Science*, 2018, 4(9): 1274–1290.
- [31] BAINS R K, NASSERI S A, WARDMAN J F, et al. Advances in the understanding and exploitation of carbohydrate-active enzymes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2024, 80: 102457.
- [32] SANZ-MARTINEZ I, PEREIRA S, MERINO P, et al. Molecular recognition of GalNAc in mucin-type O-glycosylation[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2023, 56(5): 548–560.
- [33] 冉冉. 金丝燕(*Aerodramus mearnsi* 源)燕窝黏蛋白的表达及 O-GalNAc 糖基化修饰[D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- [RAN Ran. Expression and O-GalNAc glycosylation modification of edible bird's nest mucin in swiftlet derived from *Aerodramus mearnsi*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.]
- [34] BAI Yulong, ZHANG Shengnan, DONG Hui, et al. Advanced techniques for detecting protein misfolding and aggregation in cellular environments[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(21): 12254–12311.
- [35] MIOTTO M, OLIMPIERI P P, DI RIENZO L, et al. Insights on protein thermal stability: A graph representation of molecular interactions[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(15): 2569–2577.
- [36] SU Dihan, YAO Meng, LIU Jie, et al. Enhancing mechanical properties of silk fibroin hydrogel through restricting the growth of β -sheet domains[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(20): 17489–17498.
- [37] OWOLOYE A J, LIGALI F C, ENEJOH O A, et al. Molecular docking, simulation and binding free energy analysis of small molecules as PfHT1 inhibitors[J]. *PLoS One*, 2022, 17(8): e0268269.
- [38] CHEN Lifang, ZHANG Boying, CHEN Liling, et al. Hydrogen-bonded organic frameworks: Design, applications, and prospects[J]. *Materials Advances*, 2022, 3(9): 3680–3708.
- [39] LI W Q, BILAL M, SINGH A K, et al. Broadening the scope of biocatalysis engineering by tailoring enzyme microenvironment: A review[J]. *Catalysis Letters*, 2023, 153(5): 1227–1239.