

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-026

肽-N-糖苷酶介导的胞内糖蛋白编辑技术在酿酒酵母中的构建及应用研究

杨雨晗^{1,2}, 逯浩睿^{1,2}, 田朝光^{1,2}

(¹ 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津 300308; ² 合成生物国家技术创新中心, 天津 300308)

摘要: N-糖基化是真核生物中广泛存在的一类翻译后修饰, 在蛋白质折叠、分泌转运、环境响应等过程中发挥重要作用。肽-N-糖苷酶 (PNGase, 简称糖肽酶) 催化糖蛋白完整 N-糖链的去除, 并伴随该位点天冬酰胺残基到天冬氨酸残基的序列编辑。本研究首先通过构建糖肽酶的表达菌株, 结合定量糖蛋白组学分析, 比较了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Png1 H1 结构域缺失突变体 (Png1 Δ H1) 以及伊丽莎白金氏菌 (*Elizabethkingia miricola*) PNGF 在酿酒酵母中的去糖基化活性与去糖基化蛋白组, 进一步比较研究了不同来源糖肽酶对选定靶标蛋白的去糖基化编辑效果, 研究发现, 不同糖肽酶存在显著差异。随后, 本研究利用 Coh-Doc 蛋白间相互作用系统构建了针对糖蛋白 Cdc50 和 Ecm38 靶向去糖基化编辑器, 结果显示, 编辑器可显著增强糖肽酶对靶标蛋白的去糖基化编辑效率。总之, 本研究探索利用糖肽酶的蛋白质去糖基化功能, 以酿酒酵母为模式体系, 开发了细胞内目标糖蛋白去糖基化编辑技术, 实现了对目标糖蛋白去糖基化编辑, 为未来进一步开发可用于生命科学研究和疾病治疗的糖蛋白编辑技术奠定了基础。

关键词: 蛋白质编辑; 去糖基化; 肽-N-糖苷酶; 靶向调控

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

Construction and Preliminary Application of PNGase-Mediated Intracellular Glycoprotein Editing Technology in *Saccharomyces cerevisiae*

YANG Yuhan^{1,2}, LU Haorui^{1,2}, TIAN Chaoguang^{1,2}

(¹ Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin, China; ² National Technology Innovation Center for Synthetic Biology, Tianjin, China)

Abstract: N-linked glycosylation is a widespread post-translational modification in eukaryotes and plays essential

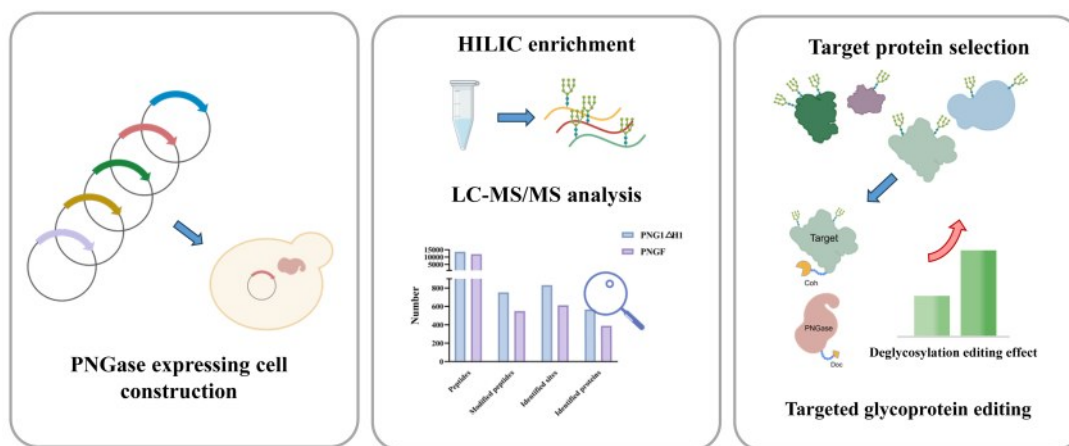
收稿日期: 2026-04-17 修回日期: 2026-06-10

基金项目: 低碳合成工程生物学全国重点实验室开放课题 (E5J4QZKF04)

引用本文: 杨雨晗, 逯浩睿, 田朝光. 肽-N-糖苷酶介导的胞内糖蛋白编辑技术在酿酒酵母中的构建及应用研究[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-026

Citation: YANG Yuhan, LU Haorui, TIAN Chaoguang. Construction and Preliminary Application of PNGase-Mediated Intracellular Glycoprotein Editing Technology in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-026

roles in protein folding, secretory trafficking, and environmental responses. Peptide:N-glycanase (PNGase) catalyzes the removal of entire N-linked glycans from glycoproteins, notably converting the glycosylated asparagine residue to aspartic acid and thus achieving an amino acid substitution without altering the genome. This study utilized the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*, taking advantage of its sophisticated genetic toolbox and numerous conserved eukaryotic characteristics, to investigate glycoproteomics and deglycosylation editors. In this study, we first knocked out the endogenous PNG1 and, on this basis, constructed PNGase-expressing *S. cerevisiae* strains. Using quantitative glycoproteomics, we compared the deglycosylation activities and deglycosylated proteomes of the endogenous Png1 H1-domain deletion mutant (Png1 Δ H1) and *Elizabethkingia miricola* PNGase F (PNGF) expressed in *S. cerevisiae*. The results showed that PNGF and PNG1 shared some common substrates in *S. cerevisiae*, whereas PNGF exhibited more distinct peptide- and site-level differences, suggesting that the exogenous PNGase possesses a substrate spectrum and application potential that are not fully consistent with those of the endogenous PNG1. Further comparative analyses revealed significant differences in the deglycosylation editing efficiencies of PNGases from different sources toward selected target proteins. To further improve deglycosylation efficiency and explore the potential of PNGases as protein-editing tools, using the cohesin-dockerin (Coh-Doc) protein interaction system, this study constructed targeted deglycosylation editors for the glycoproteins Cdc50 and Ecm38. The results showed that this system enhanced the interaction between PNGase and target proteins, and the editors markedly enhanced the deglycosylation efficiency of PNGase toward the target proteins. Moreover, this editor can, to some extent, compensate for the limited spatial accessibility of heterologous PNGases in host cells, demonstrating promising cross-species adaptability. Finally, by genomically inserting a Coh2 tag in situ at the Cdc50 locus, we achieved efficient deglycosylation editing under physiological conditions, reaching a deglycosylation efficiency of 44.8%. This study explores the protein deglycosylation function of PNGase and, using *S. cerevisiae* as a model system, establishes an intracellular deglycosylation editing technology for target glycoproteins, laying a foundation for future development of glycoprotein editing tools for life science research and disease therapy.



Keywords: Protein editing; N-deglycosylation; PNGase; Targeted regulation

作为蛋白质功能调控的重要机制之一，翻译后修饰（Post-translational modifications, PTMs）发生在蛋白质翻译完成之后，通过在特定氨基酸残基上引入特异性化学修饰，进而改变蛋白质构

象，影响蛋白的亚细胞定位与分子间互作。N-糖基化（N-linked glycosylation）是真核生物最普遍的翻译后修饰之一，特指寡糖链通过N-糖苷键的形式连接到蛋白质天冬酰胺残基上，主要发生在

N-X-S/T (X≠P) 基序。与常见的“翻译后加工”不同, N-糖基化修饰在新生肽链进入内质网(Endoplasmic reticulum, ER)腔的早期就开始发生, 因此糖链早在折叠起始阶段就参与蛋白成熟与质量控制过程^[1]。这类修饰可以改变靶蛋白的构象以及分子间相互作用, 进而影响蛋白质功能和命运。N-糖链会影响折叠质控、分泌通路与细胞壁装配, 并影响生长和应激耐受, 异常糖基化也与多种疾病的发生密切相关^[2]。在酵母等真核微生物中, 糖链修饰状态往往与分泌负荷、错误折叠蛋白清除以及内质网应激响应之间存在紧密联系, 说明N-糖基化不仅影响单个糖蛋白的成熟与命运, 也可能进一步关联细胞层面的分泌能力和环境适应性^[3]。然而, 仅从糖链的形成与加工角度认识N-糖基化功能仍不充分, 反之, 糖链的去除同样可能影响蛋白质构象、稳定性及其命运, 因此如果可以构建蛋白质层面糖基化编辑技术, 既可以人工操控蛋白质糖基化水平, 又不改变基因序列, 将为理解糖蛋白功能和开发基于蛋白层面编辑修饰的疾病治疗方法提供新思路。

肽-N-糖苷酶(Peptide: N-glycanase, PNGase, 简称糖肽酶)催化N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)与糖蛋白上天冬酰胺残基之间的酰胺键水解, 是一类能够从糖蛋白/糖肽上切除完整N-糖链的去糖基化酶。它能切断位于糖链最内层N-乙酰氨基葡萄糖与蛋白质天冬酰胺之间的连接, 在释放完整糖链的同时, 将该天冬酰胺位点脱酰胺编辑为天冬氨酸, 实现了糖蛋白编辑。有研究清晰表明, 部分糖蛋白的去糖基化编辑可显著影响其定位与功能。例如, 线虫中的转录因子SKN-1及其哺乳动物同源蛋白NFE2L1/Nrf1, 均依赖糖肽酶介导的去糖基化编辑实现活化, 并随后入核参与转录调控^[4, 5]。糖肽酶目前主要分为三个类型: 细菌PNGF样糖肽酶、酸性糖肽酶和细胞质糖肽酶^[6]。其中细胞质糖肽酶在真菌、植物、动物中广泛存在^[6]。已在多种模式生物如线虫^[7]、果蝇^[8]、小鼠^[9]以及人类^[10]中被深入研究, 参与器官发育、个体生长等多种生理过程。不同来源的糖肽酶在结构特征、酶学性质及底物偏好上存在差异, 因而其在不同宿主中的功能作用可能并不相同。在部分真菌, 如粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)

中, 其细胞质糖肽酶催化位点存在天然突变(C208A, H235Y), 去糖基化酶活性丧失, 但蛋白本身仍对维持细胞极性必需^[11, 12], 提示真菌细胞质糖肽酶可能具有去糖基化酶活性之外的其他功能。因此, 要开发糖蛋白去糖编辑器, 需要广泛筛选和改造糖肽酶, 找到适合靶标糖蛋白的特定编辑酶元件, 并结合靶向元件, 最终构建出可用的高效靶向编辑器。

蛋白质编辑技术是一项新兴的前沿技术, 与目前广为人知的核酸层面的基因编辑技术不同, 其旨在翻译后阶段对蛋白质直接进行精准编辑(包括氨基酸残基修改、修饰或删除等), 从而在不改变基因序列的前提下, 实现目标蛋白性质及功能的改变。目前该技术仍处于发展初期, 已在两个主要方向取得进展: 一是针对蛋白质内肽段的编辑, 开发了基于分裂内含肽的“蛋白质转座”方法, 可实现蛋白质特定区域的多肽序列的删除或替换^[13, 14]; 二是针对氨基酸残基的精细编辑, 主要依赖生物正交点击化学^[15, 16]与天然翻译后修饰酶^[17, 18]进行共价修饰进而改变残基的理化性质并调控蛋白质功能。各类生物体中存在的翻译后修饰酶是天然的蛋白质编辑工具库, 通过对各类酶进行酶学表征与工程化改造将有助于发展蛋白质编辑技术。

课题组前期探索了针对人细胞的糖蛋白去糖编辑器, 并构建了针对SARS-CoV-2刺突蛋白的靶向去糖基化编辑器^[17]。糖蛋白靶向编辑器还处在刚刚开始, 亟需发现新的糖蛋白靶标和新的糖肽酶进行更广泛探索, 积累经验。本研究利用模式真核生物酿酒酵母, 利用其成熟的遗传操作体系及真核细胞间诸多保守特性, 开展糖蛋白组学和去糖基化编辑器研究。本研究系统比较不同来源糖肽酶的体内作用特性, 筛选并验证潜在作用新底物, 并在此基础上, 进一步探究了基于糖肽酶的蛋白质靶向去糖基化编辑在酿酒酵母中的编辑效果, 为真核生物糖蛋白功能研究及后续糖蛋白编辑工具的开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

酿酒酵母BY4741购于北京庄盟国际生物基因

科技有限公司。PNGase序列由苏州金唯智生物科技有限公司进行密码子优化并合成。pRS426-PGK、p416-TEF1均为本课题组保存。

酿酒酵母缺陷型培养基、RIPA细胞裂解液、脱脂奶粉、鲑鱼精DNA购于北京索莱宝科技有限公司。SDS-PAGE电泳仪、电泳液、转膜液、蛋白预制胶购于金斯瑞生物科技有限公司。逆转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit、SYBR®Green Realtime PCR Master Mix 购于东洋纺生物科技有限公司。其余化学试剂购于阿拉丁试剂（上海）有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酿酒酵母培养

取少量甘油菌涂布于固体培养基，30℃恒温培养箱中倒置培养至长出单菌落。挑取单菌落接种于液体培养基，220 rpm，30℃，水平摇床过夜培养，稀释至 $OD_{600} = 0.2$ ，继续培养至 $OD_{600} = 0.7-0.8$ 进行下游实验。

1.2.2 酿酒酵母转化

取培养至 $OD_{600} = 0.5-0.8$ 菌液，离心收集菌体并使用无菌水洗涤，菌体重悬于转化混合液（33%PEG3350，0.1 M LiAc，0.3 mg/mL 鲑鱼精DNA，适量质粒），42℃水浴锅热激40 min，离心收集菌体并使用无菌水重悬涂布于固体培养基，30℃恒温培养箱中倒置培养3-4 d。

1.2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)

菌体培养至 $OD_{600} = 0.8-1.0$ ，取10 mL菌液离心收集菌体，ddH₂O洗涤两次。向菌体加入适量RIPA裂解液与0.5 mm 钨珠，使用冷冻破碎仪（-50℃，70 Hz，时间60 s，间隔20 s，重复6次）进行细胞破碎，离心取上清液。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度，待测蛋白样品中加入5×上样缓冲液，98℃煮样10 min，上样至SDS-PAGE蛋白预制胶分离蛋白，通过半干转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene fluoride，PVDF）膜。PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭2 h；一抗4℃摇床孵育过夜，TBST洗涤3次；二抗室温摇床孵育45 min，TBST洗膜3次，每次5 min。

1.2.4 免疫共沉淀

蛋白溶液中加入适量抗体结合磁珠，4℃、

10 r/min 过夜孵育，使用SDS-PAGE上样缓冲液变性洗脱蛋白复合物。

1.2.5 RT-qPCR

菌体培养至 $OD_{600} = 0.8-1.0$ ，取10 mL菌液离心收集菌体，ddH₂O洗涤两次。菌体转移至研钵并加入适量液氮，充分研磨，根据试剂盒制造商提供试验方案提取RNA。按照说明书方案将mRNA反转录成cDNA。以cDNA为模板采用SYBR Green I染料法于CFX Connect™荧光定量PCR检测系统（Bio-Rad）进行实时定量PCR，所用引物见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对基因表达量。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
PNG1-F	GGAGCTGCTTCGCTACTTCA
PNG1-R	CTTGACTGCCCAGAGGTGTC
ACT1-F	TTTGACCCATACCGACCATGATACCT
ACT1-R	TCCTCGTGCTGTCTTCCCATCT

1.2.6 蛋白质组学分析

委托杭州景杰生物科技股份有限公司完成。采用亲水相互作用色谱（HILIC）富集糖肽，后在重氧水（H₂¹⁸O）中使用PNGase F切除糖链并标记糖基化位点。利用Glycosmos数据库^[19]，对质谱鉴定的位点进行进一步筛选，得到糖基化修饰位点。

1.2.7 数据处理

数据的统计分析及部分统计作图使用GraphPad Prism 10.1.2；

对于两组数据之间的比较选用t-test进行评估，多组数据之间的比较选用单因素方差分析。本研究显著性标注为*：P < 0.05；**：P < 0.01；***：P < 0.001；****：P < 0.0001；ns：无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 PNGase表达菌株构建

为了研究糖肽酶在酿酒酵母中的作用情况，本研究通过同源重组及组氨酸缺陷培养基筛选，构建了ScPNGI敲除菌株以排除酿酒酵母内源胞质PNGase（ScPng1）的背景干扰，并在此基础上构

建糖肽酶表达菌株。RT-qPCR 结果显示敲除菌株相较野生型菌株几乎无 *ScPNG1* 转录 [图 1(a)]。ScPng1 三个结构域组成：N 端螺旋区（含 H1/H2 端部螺旋）、中心保守的转谷氨酰胺酶样（Transglutaminase-like）催化核心，以及参与蛋白互作的外围区域组成 [图 1(b)]。已有研究表明，其 N 端 H1 螺旋结构的缺失能够增强蛋白结构灵活性，实现变性蛋白及天然蛋白的高效去糖基化编辑^[20]。基于此，本研究拟选择 ScPng1 的 H1 截短突变体 Png1ΔH1 以及去除信号肽序列的经典去糖基化工具酶 PNGF 为研究对象。以 pRS426-PGK

(-) 为质粒骨架，分别构建了 Png1ΔH1、PNGF 及其各自失活突变体 dPng1ΔH1-C191A、dPNGF-D61A 的表达载体。由于蛋白质糖基化修饰过程发生于内质网及高尔基体，内质网及高尔基体腔中糖基化修饰蛋白丰度更高，糖肽酶在内质网中可能具有更高的底物浓度，因而在糖肽酶的 N 端分别引入来自 Ost1 或 Mf(Alpha)1 蛋白的信号肽序列，以引导其进入内质网腔，同时在 C 端融合内质网滞留基序^[21]，构建了内质网驻留的 Png1ΔH1 (ER)、PNGF (ER) 及其失活突变体 dPNGF (ER) [图 1(c)]。

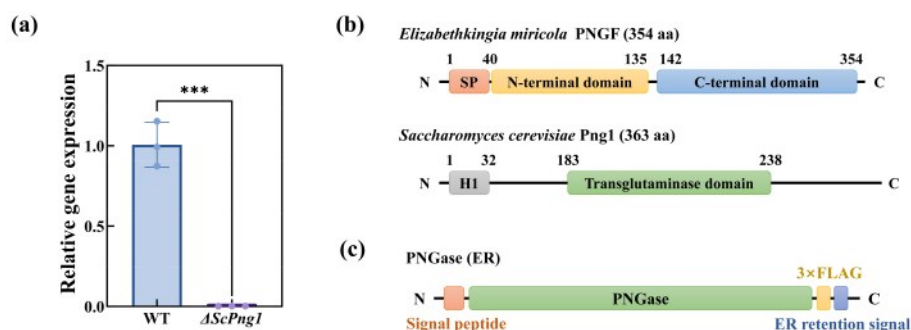


图1 酿酒酵母糖肽酶表达菌株的构建

(a): 使用 qPCR 检测野生型 (WT) 与基因敲除株 ($\Delta ScPNG1$) 中 *ScPNG1* 的转录水平 (双尾 T 检验, ***: $P < 0.001$, 误差棒: 平均值 $\pm$ 标准差)。 (b): 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 及脑膜炎败血伊丽莎白菌 (*E. meningoseptica*) 来源的肽: N-糖苷酶结构域示意图。 (c): PNGase (ER) 示意图。

Fig. 1 Construction of PNGase-expressing *S. cerevisiae* strains

(a): qPCR analysis of *ScPNG1* transcript levels in wild-type (WT) and knockout ($\Delta PNG1$) strains (two-tailed Student's *t*-test. ***: $P < 0.001$; error bars: mean $\pm$ SD). (b): Domain architecture of peptide: N-glycanases from *S. cerevisiae* and *E. meningoseptica*. (c): Schematic representation of PNGase(ER).

为验证糖肽酶在酿酒酵母中的表达情况，本研究采用 PEG/LiAc 化学转化法将正确构建的目的质粒分别转入 *ScPNG1* 敲除菌株。除 PNGF (ER) 外，均获得转化子，推测可能是由于添加了内质网滞留信号肽的 PNGF 具有较强的细胞毒性，完全抑制了菌株生长。进而构建了 *GALI* 启动子驱动的半乳糖诱导型 PNGF (ER) 表达质粒，转化后在以葡萄糖为碳源的固体培养基上成功获得转化子，并使用含 2% 半乳糖的酵母浸出粉培养基进行诱导表达。Western blot 结果显示，所有成功转化获得单菌落的菌株，均可在相应分子量处检测到清晰的特异性蛋白条带 [图 2(a-d)]。

糖基化修饰过程起始于内质网，因而内质网驻留的糖肽酶也可发生糖基化编辑。使用 NetNGlyc-

1.0 在线工具 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) 对 Png1ΔH1、PNGF 进行潜在糖基化位点的预测，Png1 在 N68 及 N170、PNGF 在 N93 及 N192 处可能存在糖基化修饰。Western blot 结果显示，内质网驻留的 Png1ΔH1 及 dPNGF 均存在大于理论分子量的条带 [图 2(b, d)]。值得注意的是 PNGF (ER) 不存在明显大于理论分子量的条带 [图 2(d)]，推测可能是由于 PNGF 自身具有较高去糖基化活性，自身糖链被去除。使用抗体连接磁珠富集 dPNGF (ER)，并在体外使用商品化 PNGF 处理，Western blot 显示处理后蛋白仅存在理论分子量条带 [图 2(e)]，与 PNGF (ER) 一致，表明 PNGF (ER) 确实经历了糖基化修饰。

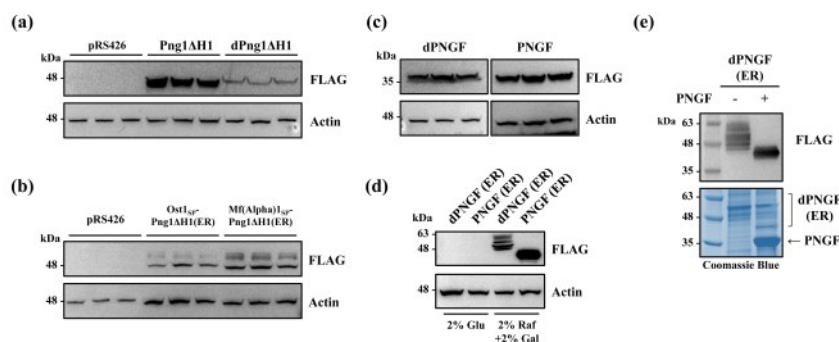


图2 酿酒酵母不同糖肽酶表达菌株的验证

(a): Western blot 验证 Png1ΔH1 及其失活突变体 dPng1ΔH1 在酿酒酵母细胞中的表达。(b): Western blot 验证内质网滞留的 Png1ΔH1(ER) 在酿酒酵母细胞中的表达。(c): Western blot 验证 PNGF 及其失活突变体 dPNGF 在酿酒酵母细胞中的表达。(d): Western blot 验证 PNGF(ER) 的半乳糖诱导表达 (三次独立实验, 结果相似)。dPNGF(ER): 富集的菌株表达 dPNGF(ER); PNGF: 商品化 PNGF。(e): 体外酶切验证 dPNGF(ER) 糖基化修饰 (三次独立实验, 结果相似)。

Fig. 2 Validation of PNGase-expressing *S. cerevisiae* strains

(a): Western blot validation of Png1ΔH1 and its inactive mutant dPng1ΔH1 expression in *S. cerevisiae* cells.(b): Western blot validation of ER-retained Png1ΔH1(ER) expression in *S. cerevisiae* cells.(c): Western blot validation of PNGF and its inactive mutant dPNGF expression in *S. cerevisiae* cells.(d): Western blot validation of galactose-inducible PNGF(ER) expression (three independent experiments with similar results). dPNGF(ER): enriched from *S. cerevisiae* strains expressing dPNGF(ER); PNGF: commercially available PNGF. (e): In vitro enzymatic deglycosylation assay confirming glycosylation of dPNGF(ER) (three independent experiments with similar results).

为评估菌株的生长状况, 对各菌株进行了全自动生长曲线分析, 结果显示, 与对照组相比, 含内质网驻留信号的 Png1ΔH1 表达菌株的生长明显减缓, 进入对数生长期的时间延迟了 8 小时。这些现象表明, 糖肽酶的内质网定位存在一定的生理毒性, 抑制菌株的正常生长 [图 3]。

2.2 糖肽酶在酿酒酵母中的底物鉴定

为了进一步确定糖肽酶在酿酒酵母内去糖基

化靶点蛋白, 针对上述构建的 dPng1ΔH1、Png1ΔH1、Png1ΔH1(ER)、dPNGF、PNGF 表达菌株进行定量糖蛋白组学分析。各组样品糖蛋白糖基化位点的归一化定量值 (修饰肽段的相对定量值/对应蛋白的相对定量值) 统计显示糖肽酶造成了酿酒酵母整体蛋白糖基化水平的显著降低, 其中胞质 Png1ΔH1 表达组检测到的去糖基化程度最高, 略高于内质网滞留组 [图 4(a)], 体现了蛋白质去糖基化过程的复杂性。

PNGF 组中糖蛋白去糖基化程度远高于

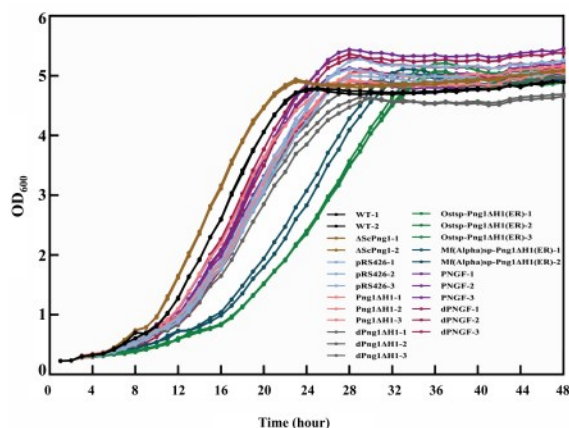


图3 不同糖肽酶表达菌株的生长差异

Fig. 3 The growth differences of *S. cerevisiae* strains expressing different glycopeptidases

不同糖肽酶表达菌株在 SD-Ura 液体培养基中的同步生长曲线。

Synchronized growth curves of strains expressing different PNGases in SD-Ura liquid medium.

Png1ΔH1组样品 [图4(b)]。结合上述无法获得组成型 PNGF (ER) 表达转化子致死这一现象, 说明 PNGF 在酿酒酵母中展现了更高的去糖基化酶活性。进一步设定筛选阈值为相对定量比值 (实验组归一化定量值/对照组归一化定量值) ≤ 0.667 , 以获得显著下调的肽段与蛋白集合作为糖肽酶的潜在靶标蛋白。以此标准, Png1ΔH1 表达组共筛选得到 116 条肽段, 映射 77 个糖蛋白, PNGF 表达组共筛选得到 174 条肽段, 映射 98 个糖蛋白 [图4(c, d)]。对筛选得到的潜在靶标蛋白进行 GO 富

集分析, 结果显示潜在靶标蛋白主要定位于内质网 (膜/腔) 与高尔基体等分泌途径关键细胞器, 并延伸至液泡/细胞周缘, 并且在细胞壁组织、糖基化修饰、内质网应激响应等过程显著富集 [图4(e)]。Png1ΔH1 与 PNGF 的潜在靶标蛋白在功能上具有很高重叠度, 但也存在一定差异, Png1ΔH1 具有较多参与蛋白折叠质量控制、脂质代谢等过程的潜在靶标蛋白, 而 PNGF 的潜在靶标蛋白则较多参与细胞壁组织、糖代谢、GPI 锚定过程 [图4(f)]。这表明二者在酿酒酵母中虽具有一定数量的

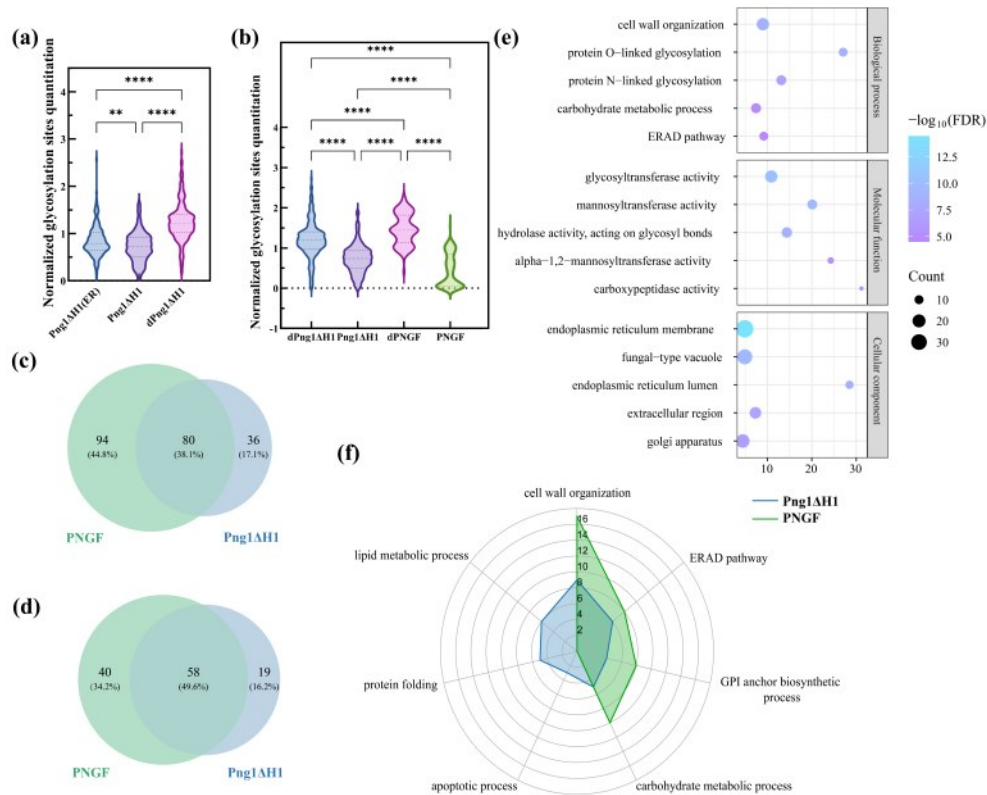


图4 定量糖蛋白组学鉴定糖肽酶的可能靶标蛋白

Fig. 4 Identification of potential PNGase target glycoproteins by quantitative glycoproteomics

(a, b): 不同菌株条件下糖基化位点归一化定量值 (修饰肽段的相对定量值/对应蛋白的相对定量值) 分布的小提琴图 (单因素方差分析, ****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, ns: 无显著性差异)。

(c, d): PNGF 与 Png1ΔH1 筛选得到的显著差异 (实验组归一化定量值/对照组归一化定量值 ≤ 0.667) 糖基化修饰肽段及映射蛋白质的韦恩图分析。

(e): 筛选得到的显著差异糖基化修饰肽段及映射蛋白质的 GO 富集分析。

(f): PNGF 与 Png1ΔH1 潜在靶蛋白生物学过程 (biological process, BP) 富集差异条目。

(a, b): Violin plots showing the distribution of normalized glycosylation site values (modified peptide relative abundance/corresponding protein relative abundance) under different strain backgrounds (one-way ANOVA; **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, ns: not significant).

(c, d): Venn diagrams illustrating significantly downregulated glycosylated peptides (normalized ratio ≤ 0.667) and their mapped proteins in PNGF and Png1ΔH1 expression groups.

(e): GO enrichment analysis of significantly downregulated glycosylated peptides and their mapped proteins.

(f): Differences in enriched biological process (BP) terms between potential target proteins of PNGF and Png1ΔH1.

共有底物,但仍存在一定的底物特异性。

2.3 部分糖蛋白组学鉴定靶蛋白的去糖基化验证

在基于质谱的蛋白质N-糖基化位点鉴定中,仅凭脱酰胺信号推断N-糖基化位点存在系统性风险,需结合更严格的证据链或独立实验进行确认^[22]。为了进一步确认糖蛋白组学初步获得蛋白的准确性,本研究选取了一组蛋白(共7个)进行糖基化编辑验证,包括蛋白二硫化物异构酶(Protein disulfide-isomerase) Pdi1、谷胱甘肽水解酶酶原(Glutathione hydrolase proenzyme) Ecm38、核糖核酸酶 T2(Ribonuclease T2) Rny1、磷脂转运ATP酶辅助亚基(Phospholipid-transporting ATPase accessory subunit) Cdc50、信号肽酶复合体亚基(Signal peptidase complex subunit) Spc3、内质网形态维持蛋白(Maintenance of mitochondrial morphology protein) Mmm1、脂肪酸延长酶(Fatty acid elongase) Elo3。其中已有文献表明在酿酒酵母中Mmm1是Png1的直接底物^[23],作为阳性对照。在候选靶标

糖蛋白C端添加HA标签序列与糖肽酶在BY4741菌株中共表达。Western blot结果显示,7个靶标蛋白在Png1ΔH1表达组中相较对照组出现一致的迁移率改变,并且在细胞质Png1ΔH1表达组中更为显著[图5(a-g)]。这一结果表明这7个靶标蛋白在酿酒酵母中可作为Png1ΔH1的底物。此外,在此实验条件下,多数实验出现Png1ΔH1(ER)表达组的内参肌动蛋白量显著低于其他组的情况,尤其是在与膜蛋白靶标共同表达时这一现象更为明显,造成这一现象的具体原因还有待进一步研究。基于去糖信号的清晰程度及靶标蛋白的功能特征,进一步选定Cdc50、Ecm38、Rny1进行后续进一步深入研究。

糖肽酶在生物界中广泛存在,并且结构存在一定的差异,这造成了其酶学特征及底物偏好的多样性^[24]。在此基础上,为进一步评估不同生物来源糖肽酶在酿酒酵母中的底物适应性及去糖基化编辑差异,本研究继续对不同生物来源的糖肽酶进行了比较分析。采用同样方法进一步比较分析了PNGF以及来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻

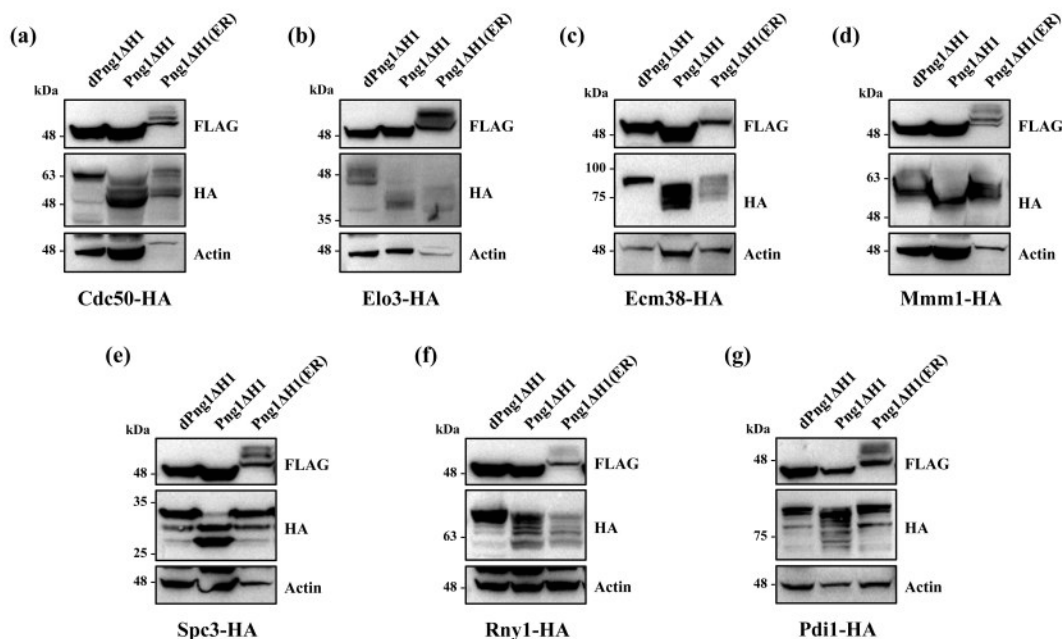


图5 Png1ΔH1对部分糖蛋白组学鉴定靶蛋白的去糖基化验证

Fig. 5 Validation of Png1ΔH1-mediated deglycosylation of selected glycoprotein targets

(a-g) Western blot 验证过表达Png1ΔH1与靶标蛋白条件下,靶标蛋白的表达情况(三次独立实验,结果相似)。通过条带分子量差异反应靶标蛋白去糖基化水平。

(a-g): Western blot analysis of target protein expression under Png1ΔH1 and target protein overexpression conditions. (three independent experiments with similar results). The deglycosylation level of the target protein is reflected by the molecular weight shift of the bands.

(*Oryza sativa*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 以及人 (*Homo sapiens*) 源的细胞质糖肽酶在酿酒酵母中对糖蛋白 (Cdc50、Ecm38、Rny1) 的去糖基化编辑能力。结果显示对于不同底物蛋白, 糖肽酶的去糖基化编辑效果存在差异 [图6 (a-c)]。但不同糖肽酶在酿酒酵母细胞中的表达量存在显著差异, 其中 Png1 Δ H1 与 PNGF 的表达量显著高于其他糖肽酶, 去糖基化编辑效果也相对更加显著 [图6 (a-c)]。因此去糖基化编辑效果的差异是糖肽酶表达量与底物偏好性共同造成的结果。

2.4 蛋白质靶向去糖基化编辑器的构建及功能分析

为进一步提升糖肽酶对目标蛋白的去糖基化编辑效率, 本研究进一步构建了蛋白质靶向去糖基化编辑器。选择来自热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的黏附蛋白 (Cohesin, Coh)-锚定蛋白 (Dockerin, Doc) 蛋白质相互作用系统^[25, 26], 实现糖肽酶与目标蛋白靶向作用 [图7 (a)]。选取 Cdc50、Ecm38、Rny1 作为靶标蛋白, 以 pRS426-PGK(-) 质粒为骨架, 构建了 Target-Coh2-HA 融合表达载体, 以 p416-TEF1(-) 质粒为骨架, 构建了 PNGase-DocS-3x Flag 融合表达载体, 二者共转化。Western blot 结果显示, Rny1-

Coh2 与理论分子量相同 (结果未展示), 因而可能未能完成正常的糖基化修饰。在可稳定表达且正常糖基化修饰的靶标蛋白 Cdc50-Coh2, Ecm38-Coh2 中, DocS 靶向元件显著增强了 Png1 Δ H1 与靶标蛋白间的相互作用, 并且提升了其对靶标蛋白的去糖基化编辑效果 [图7(b, c)]。

融合蛋白连接子的设计是工具蛋白效能的关键变量之一^[27], 本研究比较了 10/20/40 个氨基酸长度的无结构重组多肽连接子 XTEN^[28] 对于 Png1 Δ H1 靶向去糖基化编辑效果的影响, 在不同长度连接子之间未观察到显著差异 [图7(d, e)]。

为了进一步评估靶向互作元件在不同生物来源糖肽酶中的适用性, 选择 10 个氨基酸长度的连接子构建融合表达载体。采用相同方法评估其靶向去糖基化编辑效果, 结果显示相较于未使用靶向元件, 靶向互作元件可以增强部分糖肽酶对特定靶标蛋白的去糖基化编辑效果 [图6 (a, b), 图8 (a, b)]。

上述研究均是在过表达靶标蛋白的条件下验证其去糖基化编辑效果, 为了进一步验证靶向去糖基化编辑糖肽酶在正常生理条件下对靶标蛋白的作用效果。通过同源重组构建 *CDC50* 原位 C 端添加 HA 或 Coh2-HA 的融合蛋白表达菌株。在该菌株中分别转化 Png1 Δ H1 与 Png1 Δ H1-DocS 表达质

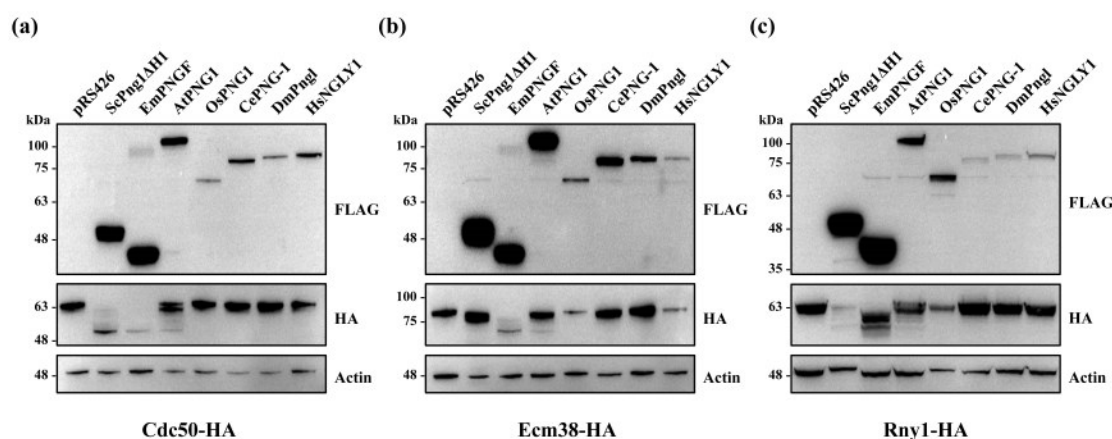


图6 不同来源的PNGase对部分糖蛋白组学鉴定靶蛋白的去糖基化验证

Fig. 6 Validation of selected glycoprotein target deglycosylation by PNGases from different sources

(a-c): Western blot 验证过表达 PNGase 与靶标蛋白条件下, 靶标蛋白的表达情况 (三次独立实验, 结果相似)。通过条带分子量差异反应靶标蛋白去糖基化水平。

(a-c): Western blot analysis of target protein expression in cells overexpressing target protein PNGases from various sources (three independent experiments with similar results). The deglycosylation level of the target protein is reflected by the molecular weight shift of the bands.

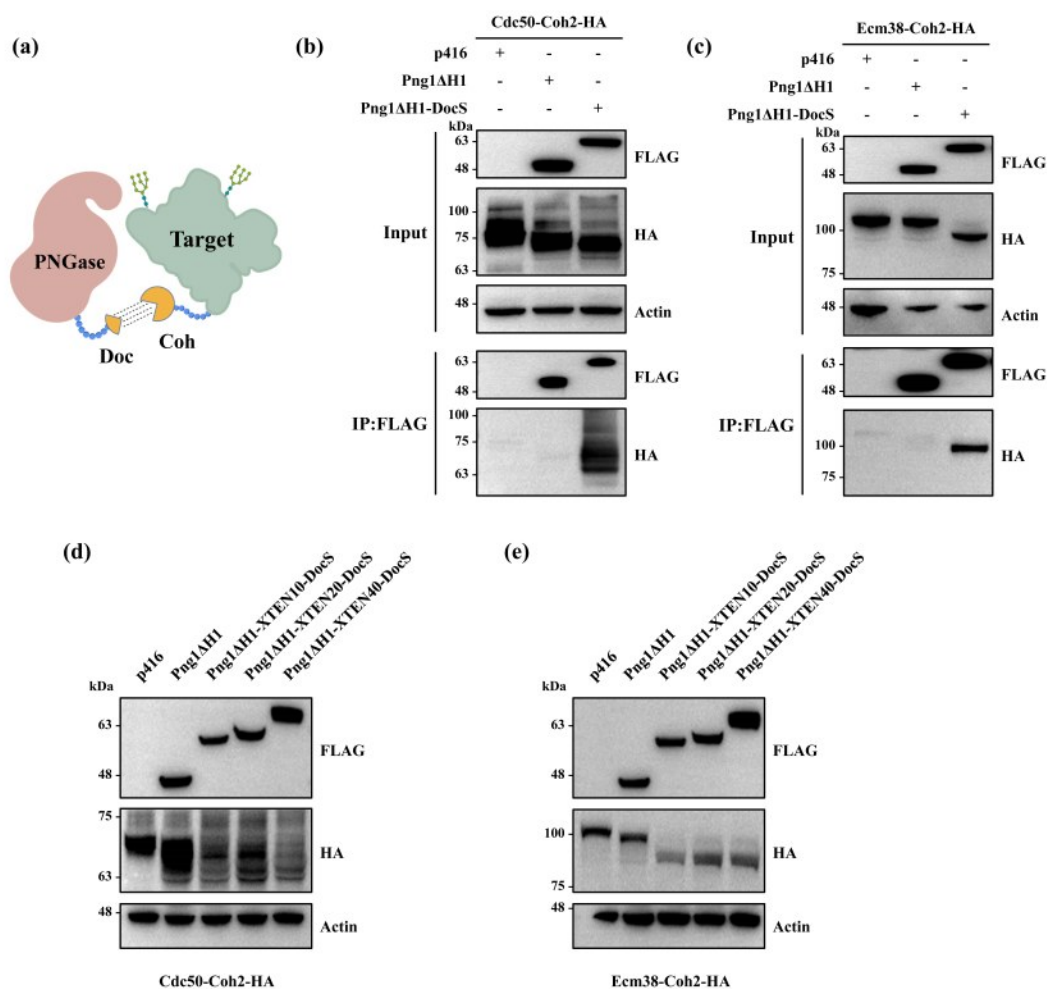


图7 靶向去糖基化编辑系统构建与功能验证

Fig. 7 Construction and functional validation of the targeted deglycosylation editing system

(a): 基于黏附蛋白 (Cohesin, Coh) -锚定蛋白 (Dockerin, Doc) 元件的靶向去糖基化编辑系统设计示意图。

(b, c): 免疫共沉淀显示 Coh2-DocS 元件增强 Png1ΔH1 与靶标蛋白间的相互作用 (三次独立实验, 结果相似)。

(d, e): Western blot 分析不同连接子长度 (XTEN10/20/40) 对靶向去糖基化编辑系统的影响 (三次独立实验, 结果相似)。通过条带分子量差异反应靶标蛋白去糖基化水平。

(a): Schematic diagram of the targeted deglycosylation editing system based on the cohesin (Coh)-dockerin (Doc) interaction element.

(b, c): Co-immunoprecipitation assays demonstrating that the Coh2-DocS element enhances the interaction between Png1ΔH1 and target proteins (three independent experiments with similar results).

(d, e): Western blot analysis of the targeted deglycosylation editing system performance with different linker lengths (XTEN10/20/40) (three independent experiments with similar results). The deglycosylation level of the target protein is reflected by the molecular weight shift of the bands.

粒, 获取转化子后对靶标蛋白糖基化水平进行验证。结果显示在正常生理条件下, 含有靶向元件的 Png1ΔH1-DocS 对 Cdc50-Coh2 的去糖基化编辑效果显著优于无靶向元件的 Png1ΔH1 对 Cdc50 的去糖基化编辑效果, 前者使得去糖基化蛋白靶标蛋白占比由 16.5% 提升至 44.8% [图9]。

3 讨论与结论

既往对 PNGase 的认识多将其视为糖蛋白降解前的辅助性去糖步骤, 去糖基化被认为与底物的降解或清除相关^[23]。本研究表征了糖肽酶 Png1ΔH1 及 PNGF 在酿酒酵母中的蛋白质去糖基化

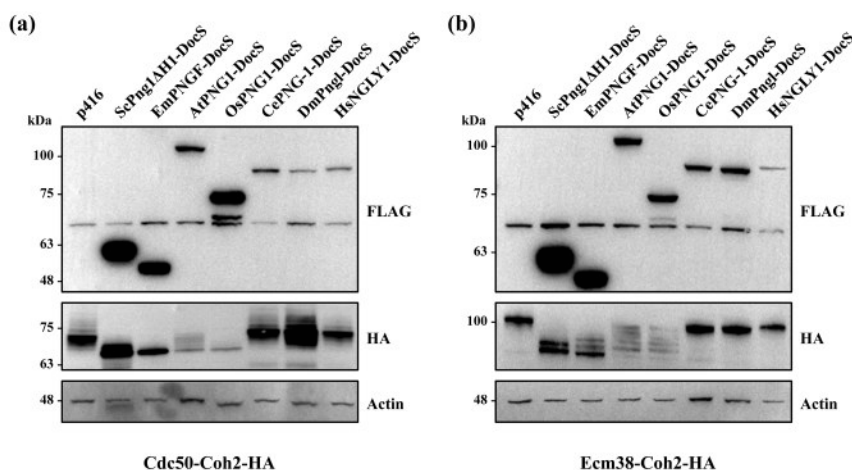


图8 基于不同糖肽酶构建的靶向去糖基化编辑系统的编辑效果比较

Fig. 8 Comparison of editing efficiencies of targeted deglycosylation editing systems constructed with different PNGases

(a, b): Western blot analysis of target protein deglycosylation mediated by PNGases from different sources (three independent experiments with similar results). The deglycosylation level of the target protein is reflected by the molecular weight shift of the bands.

(a, b): Western blot analysis of target protein deglycosylation mediated by PNGases from different sources (three independent experiments with similar results). The deglycosylation level of the target protein is reflected by the molecular weight shift of the bands.

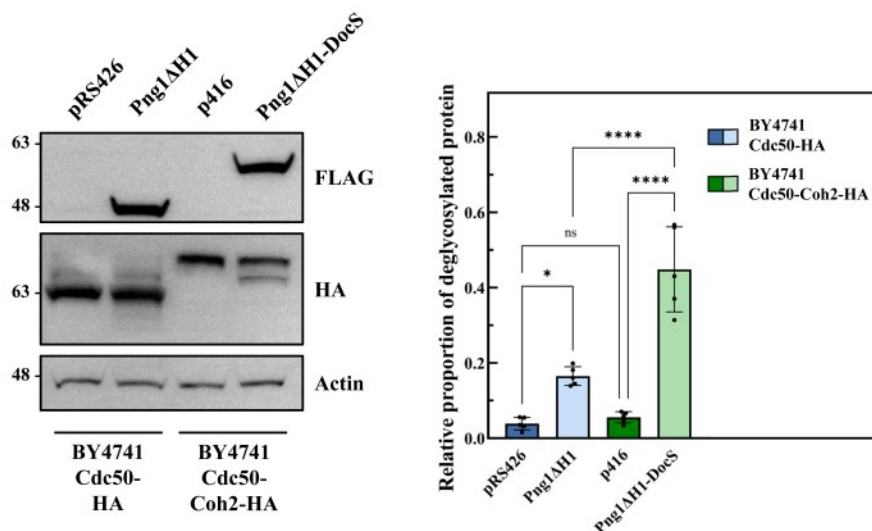


图9 正常生理条件下的靶向去糖基化编辑系统的功能验证

Fig. 9 Functional validation of the targeted deglycosylation editing system under physiological conditions

Western blot analysis of Png1ΔH1-mediated deglycosylation of Cdc50 under physiological conditions (without target protein overexpression) (five independent experiments with similar results). The deglycosylation level of the target protein is reflected by the molecular weight shift of the bands. The bar chart on the right shows the relative quantification of the target protein deglycosylation level (deglycosylated protein / total protein), based on densitometric analysis of Western blot bands (one-way ANOVA; ****: $P < 0.0001$, *: $P < 0.05$, ns: no significant difference, error bars: mean $\pm$ SD).

Western blot analysis of Png1ΔH1-mediated deglycosylation of Cdc50 under physiological conditions (without target protein overexpression) (five independent experiments with similar results). The deglycosylation level of the target protein is reflected by the molecular weight shift of the bands. The bar chart on the right shows the relative quantification of the target protein deglycosylation level (deglycosylated protein / total protein), based on densitometric analysis of Western blot bands (one-way ANOVA; ****: $P < 0.0001$, *: $P < 0.05$, ns: not significant; error bars: mean $\pm$ SD).

编辑功能。值得注意的是，本研究显示，无论在底物糖蛋白过表达还是正常生理条件下，靶标糖蛋白的去糖基化编辑并不总是导致蛋白降解

[图5, 图6]。N-糖链具有一定的空间结构，其存在与否会直接影响糖蛋白与其他生物大分子间的相互作用，例如程序性细胞死亡1配体 (PD-L1)

的糖基化修饰是其与程序性细胞死亡蛋白1 (PD1) 间物理接触所必需^[29, 30], 目前已有一些研究基于这一特征开发了基于PD-L1去糖基化的DGlyTAC技术用于癌症免疫治疗^[18]。除了糖链去除导致的蛋白质表面结构变化, 去糖基化编辑产生的氨基酸序列改变的蛋白(糖基化位点的天冬酰胺被修改为天冬氨酸)也会一定程度上改变蛋白质性质, 例如在去糖基化过程密切参与的NFE2L1/Nrf1功能调控中, 天冬酰胺到天冬氨酸的序列改变为该转录因子进入细胞核发挥正常功能的必要条件^[4, 31, 32]。这提示被编辑蛋白的稳定存在使其具有区别于原蛋白功能的可能性, 靶标蛋白的去糖基化编辑具有超越“促降解”属性的独立调控潜能, 这一点对未来开发糖蛋白编辑技术具有重要意义。

本研究构建的内质网滞留糖肽酶表现出一定的细胞毒性。这可能是由于内质网为N-糖基化起始及初级加工场所, 其内部微环境的稳态对糖蛋白的正确折叠至关重要^[1]。在内质网中持续滞留糖肽酶会持续切割新生糖蛋白的糖链, 阻碍糖基化蛋白的初步折叠, 这可能过早干预了新生糖蛋白的折叠与加工过程, 特别是对少量关键底物产生高敏感扰动, 从而引发强烈的蛋白质稳态压力和细胞毒性。该现象的具体分子机制仍有待进一步阐明。相较于Png1ΔH1, PNGF表现出更强的去糖基化活性与更广泛的底物谱, 这在一定程度上增加了脱靶风险, 这与本研究中PNGF(ER)对菌株表现出更强的生长抑制相符。本研究构建的内质网滞留糖肽酶并未表现出优于胞质定位糖肽酶的去糖基化编辑效果[图4(a), 图5], 这可能是由于糖肽酶内质网滞留存在一定细胞毒性, 因而得到的可能是糖肽酶表达量及活性相对较低的转化子。综合来看, 胞质定位策略更接近Png1的天然工作场景, 对宿主负担相对较低, 从工具开发的角度, 适合作为不同来源糖肽酶比较及靶向编辑器构建的基础平台; 而内质网定位策略虽然有助于揭示糖链形成在早期折叠与质量控制中的关键作用, 但其较强的宿主扰动和毒性也限制了其作为通用编辑体系的应用潜力。

Png1ΔH1与PNGF的结构域组成相对简单, 分子量较小, 因此在酿酒酵母中获得了较高水平的

表达。同时, 不同糖肽酶的结构特征与其催化活性之间的关联^[24], 也为糖肽酶的工程化改造提供了参考依据。未来可尝试通过结构域截短或不同来源结构域的组合等手段减小酶分子尺寸, 优化糖肽酶的表达水平, 同时基于结构信息构建糖肽酶突变体, 从而实现高效去糖基化编辑效果与潜在脱靶毒性间的平衡。此外, 细胞质糖肽酶在蛋白质折叠监控及ER相关降解(ERAD)途径中发挥重要作用^[33], 该过程涉及底物蛋白由内质网到细胞质基质的逆向转运^[34]。这表明糖蛋白的亚细胞定位存在多样性, 因此开发不同亚细胞定位的靶向去糖基化编辑工具以适应具体作用场景同样具有必要性。

为实现靶向去糖基化编辑, 本研究在靶标蛋白基因C端插入了Coh2元件提供靶向性, 实现了去糖基化编辑效果的进一步提升。目前已有大量的依赖于化学分子^[35]、光信号^[36]的互作元件被开发, 将这些蛋白质互作元件与糖肽酶偶联, 理论上能够实现动态可控的去糖基化编辑。本研究使用的Coh-Doc系统涉及基因组水平的人工改造, 这在工业菌株改造及机制研究的真核微生物(如酵母、丝状真菌)中是可以接受的。但未来开发用于治疗糖蛋白靶向编辑器, 需要融合靶向元件的人工设计及高通量筛选技术, 开发针对特定靶标蛋白的诸如纳米抗体、靶向肽或小分子靶向元件与编辑酶链接, 构建蛋白质靶向编辑器, 直接实现未经人工改造的细胞内原始蛋白的精准靶向去糖基化编辑。

综上所述, 本研究初步构建了基于Coh-Doc系统的糖蛋白靶向去糖基化编辑技术。该工作为开发基于糖肽酶的蛋白质靶向编辑技术奠定了基础, 同时也为研究蛋白质糖基化分子过程以及开发靶向糖蛋白的治疗工具提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] HELENIUS A, AEBI M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum [J]. Annual Review of Biochemistry, 2004, 73: 1019-1049.
- [2] OHTSUBO K, MARTIN J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease [J]. Cell, 2006, 126(5): 855-867.

- [3] ZHAO M, MA J, ZHANG L, et al. Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 32.
- [4] LEHRBACH N J, BREEN P C, RUVKUN G. Protein sequence editing of SKN-1A/Nrf1 by peptide: N-glycanase controls proteasome gene expression [J]. *Cell*, 2019, 177(3): 737-750.
- [5] TOMLIN F M, GERLING-DRIESSEN U I M, LIU Y-C, et al. Inhibition of NGLY1 Inactivates the Transcription Factor Nrf1 and Potentiates Proteasome Inhibitor Cytotoxicity [J]. *ACS Central Science*, 2017, 3(11): 1143-1155.
- [6] WANG T, VOGLMEIR J. PNGases as valuable tools in glycoprotein analysis [J]. *Protein Pept Lett*, 2014, 21(10): 976-985.
- [7] KONG J, PENG M, OSTROVSKY J, et al. Mitochondrial function requires NGLY1 [J]. *Mitochondrion*, 2018, 38: 6-16.
- [8] GALEONE A, HAN S Y, HUANG C, et al. Tissue-specific regulation of BMP signaling by *Drosophila* N-glycanase 1 [J]. *Elife*, 2017, 6: e27612.
- [9] FUJIHARA H, MASAHARA-NEGISHI Y, TAMURA M, et al. Lethality of mice bearing a knockout of the Ngly1-gene is partially rescued by the additional deletion of the Engase gene [J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(4): e1006696.
- [10] PANDEY A, ADAMS J M, HAN S Y, et al. NGLY1 deficiency, a Congenital disorder of deglycosylation: from disease gene function to pathophysiology [J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1155.
- [11] SEILER S, PLAMANN M. The Genetic Basis of Cellular Morphogenesis in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa* [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, 14(11): 4352-4364.
- [12] MAERZ S, FUNAKOSHI Y, NEGISHI Y, et al. The *Neurospora* Peptide: N-Glycanase Ortholog PNG1 Is Essential for Cell Polarity despite Its Lack of Enzymatic Activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(4): 2326-2332.
- [13] HUA Y, TAY N E S, YE X, et al. Protein editing using a coordinated transposition reaction [J]. *Science*, 2025, 388(6742): 68-74.
- [14] BEYER J N, SEREBRENIK Y V, TOY K, et al. Intracellular protein editing enables incorporation of noncanonical residues in endogenous proteins [J]. *Science*, 2025, 388(6746): eadr5499.
- [15] FU X-P, YUAN Y, JHA A, et al. Stereoretentive post-translational protein editing [J]. *ACS Central Science*, 2023, 9(3): 405-416.
- [16] SUN G, LIN J, YANG Z, et al. Small-molecule-mediated precision protein editing in living cells [J]. *Vita*, 2026. DOI: 10.15302/vita.2026.03.0020.
- [17] WU M, BAI G, ZHANG Z, et al. Targeted protein editing technique in living mammalian cells by peptide-fused PNGase [J]. *hLife*, 2024, 2(11): 576-591.
- [18] LI L, WU J, CAO W, et al. N-deglycosylation targeting chimera (DGlyTAC): a strategy for immune checkpoint proteins inactivation by specifically removing N-glycan [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2025, 10(1): 139.
- [19] YAMADA I, SHIOTA M, SHINMACHI D, et al. The GlyCosmos Portal: a unified and comprehensive web resource for the glycosciences [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(7): 649-650.
- [20] DELPRATO A M, WANG S, XIN F, et al. N-Terminal Deletion of Peptide: N-Glycanase Results in Enhanced Deglycosylation Activity [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(12).
- [21] MEI M, ZHAI C, LI X, et al. Characterization of aromatic residue-controlled protein retention in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(50): 20707-20719.
- [22] PALMISANO G, MELO-BRAGA M N, ENGHOLM-KELLER K, et al. Chemical Deamidation: A Common Pitfall in Large-Scale N-Linked Glycoproteomic Mass Spectrometry-Based Analyses [J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(3): 1949-1957.
- [23] HOSOMI A, FUJITA M, TOMIOKA A, et al. Identification of PNGase-dependent ERAD substrates in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(19): 3001-3012.
- [24] MIAO X, WU J, CHEN H, et al. Comprehensive Analysis of the Structure and Function of Peptide: N-Glycanase 1 and Relationship with Congenital Disorder of Deglycosylation [J]. *Nutrients*, 2022, 14(9): 1690.
- [25] BARAK Y, HANDELSMAN T, NAKAR D, et al. Matching fusion protein systems for affinity analysis of two interacting families of proteins: the cohesin-dockerin interaction [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2005, 18(6): 491-501.
- [26] YU Y, WU X, GUAN N, et al. Engineering a far-red light-activated split-Cas9 system for remote-controlled genome editing of internal organs and tumors [J]. *Science Advances*, 2020, 6(28): eabb1777.
- [27] MONTERREY D T, AYUSO-FERNÁNDEZ I, OROZ-GUINEA I, et al. Design and biocatalytic applications of genetically fused multifunctional enzymes [J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60.
- [28] SCHELLENBERGER V, WANG C-W, GEETHING N C, et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner [J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1186-1190.
- [29] LI C W, LIM S O, XIA W, et al. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12632.
- [30] LI C W, LIM S O, CHUNG E M, et al. Eradication of triple-

- negative breast cancer cells by targeting glycosylated PD-L1 [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(2): 187-201.e110.
- [31] YOSHIDA Y, OKADA M, ARAI N, et al. NFE2L1/Nrf1 forms a coactivator complex post-peptide: *N*-glycanase-mediated sequence editing and mitigates proteasome dysfunction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2026, 123(1): e2517547123.
- [32] FORCINA G C, POPE L, MURRAY M, et al. Ferroptosis regulation by the NGLY1/NFE2L1 pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022, 119(11): e2118646119.
- [33] HIRAYAMA H, HOSOMI A, SUZUKI T. Physiological and molecular functions of the cytosolic peptide: *N*-glycanase [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 41: 110-120.
- [34] MEUSSER B, HIRSCH C, JAROSCH E, et al. ERAD: the long road to destruction [J]. *Nature Cell Biology*, 2005, 7(8): 766-772.
- [35] FEGAN A, WHITE B, CARLSON J C, et al. Chemically controlled protein assembly: techniques and applications [J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(6): 3315-3336.

- [36] KOLAR K, KNOBLOCH C, STORK H, et al. OptoBase: a web platform for molecular optogenetics [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(7): 1825-1828.



通讯作者: 田朝光(1973—),男,研究员,博士,博士生导师。研究方向为真菌合成生物学等。
E-mail: tian_cg@tib. cas. cn



第一作者: 杨雨晗(1999—),女,硕士研究生。研究方向为生物化学与分子生物学。
E-mail: yangyh24@tib. cas. cn