

人FUT3基因真核表达载体的构建与表达

岳丽玲, 樊丽, 刘吉成

背景资料
细胞癌变过程中总伴有糖链结构的改变。岩藻糖残基是细胞表面寡糖链中重要基团之一, 可参与构成某些重要黏附分子的糖链结构, 如Lewis抗原决定簇(LeA、LeX、sLeA和sLeX)。sLeX和sLeA作为肿瘤相关抗原在许多恶性肿瘤细胞表面高度表达, 而 α 1, 3-岩藻糖基转移酶(FUT3)是参与合成Lewis抗原的关键酶之一。

岳丽玲, 樊丽, 刘吉成, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所 黑龙江省齐齐哈尔市 161006
岳丽玲, 黑龙江中医药大学 黑龙江省哈尔滨市 150040
岳丽玲, 在读博士, 副教授, 主要从事多糖抗肿瘤的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30772751
黑龙江省青年科学基金资助项目, No. QC08C28
作者贡献分布: 本课题由岳丽玲与樊丽设计; 研究过程由岳丽玲与樊丽操作, 刘吉成指导完成; 本论文写作由岳丽玲完成。
通讯作者: 刘吉成, 教授, 博士生导师, 161006, 黑龙江省齐齐哈尔市, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所. qyybliu@126.com
电话: 0452-2663103
收稿日期: 2009-09-02 修回日期: 2009-11-02
接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Construction of human FUT3 eukaryotic expression vector and its expression in human breast adenocarcinoma cells

Li-Ling Yue, Li Fan, Ji-Cheng Liu

Li-Ling Yue, Li Fan, Ji-Cheng Liu, Medicine and Drug Research Institute, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China
Li-Ling Yue, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772751; and the Youth Science Foundation of Heilongjiang Province, No. QC08C28
Correspondence to: Professor Ji-Cheng Liu, Medicine and Drug Research Institute, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China. qyybliu@126.com
Received: 2009-09-02 Revised: 2009-11-02
Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To construct the human FUT3 (α 1, 3-fucosyltransferase) eukaryotic expression vector and analyze its expression in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells.

METHODS: The full-length FUT3 cDNA was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pMD18-T simple vector for sequence analysis. Then the FUT3 gene was subcloned into pEGFP-C1 plasmid. The resulting recombinant vector pEGFP-C1-FUT3 was identified by digestion with restriction endonucleases and transfected into MDA-MB-231 cells. A stably transfected cell line was established using G418 selection. The expression of FUT3 was

observed under a fluorescence microscope and examined by semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: The full-length human FUT3 cDNA was successfully obtained, and the recombinant plasmid pEGFP-C1-FUT3 was successfully constructed. After transfection into MDA-MB-231 cells, green fluorescence (green fluorescent protein) was observed. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that FUT3 was highly expressed in MDA-MB-231 cells.

CONCLUSION: The FUT3 eukaryotic expression vector pEGFP-C1-FUT3 that can express FUT3 in MDA-MB-231 cells is constructed successfully and can be used to study the biological functions of the FUT3 gene.

Key Words: α 1, 3-fucosyltransferase III; Enhanced green fluorescent protein; Gene cloning

Yue LL, Fan L, Liu JC. Construction of human FUT3 eukaryotic expression vector and its expression in human breast adenocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3210-3213

摘要

目的: 构建增强型绿色荧光蛋白为报告基因的pEGFP-C1-FUT3真核表达载体, 分析其在细胞系MDA-MB-231中的表达。

方法: 采用RT-PCR扩增FUT3全长基因片段, 克隆至pMD18-T载体进行测序分析, 将FUT3亚克隆至pEGFP-C1表达载体并酶切鉴定。利用脂质体将重组真核表达载体pEGFP-C1-FUT3转染入人乳腺癌细胞MDA-MB-231中, 经G418筛选获得稳定转染的细胞系, 荧光显微镜观察及RT-PCR检测FUT3的表达。

结果: 成功获得人全长FUT3基因并构建了真核表达载体pEGFP-C1-FUT3, 体外转染MDA-MB-231细胞后荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白的表达, 半定量RT-PCR检出高水平表达的FUT3。

结论: 成功构建了增强型绿色荧光蛋白为

同行评议者
李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

报告基因的FUT3真核表达载体,并在MDA-MB-231中稳定表达,为进一步研究FUT3的生物学功能提供基础。

关键词: α 1, 3-岩藻糖基转移酶; 增强型绿色荧光蛋白; 基因克隆

岳丽玲, 樊丽, 刘吉成. 人FUT3基因真核表达载体的构建与表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3210-3213
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3210.asp>

0 引言

肿瘤复发转移是癌症患者死亡的主要原因,异常糖基化是恶性肿瘤转移的重要机制之一. Lewis寡糖抗原是细胞表面糖复合物(糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖)中的糖链成分,已经发现其在多种肿瘤中的合成异常增加,与肿瘤增殖、浸润、转移、临床分期及预后密切相关^[1]. 岩藻糖基转移酶(fucosyltransferase, FUT)是参与合成Lewis寡糖抗原的关键酶,催化GDP-Fuc的Fuc转移至糖链中N-乙酰氨基乳糖残基的N-乙酰氨基葡萄糖上,并以 α 1, 2-、 α 1, 3/4和 α 1, 6岩藻糖苷键相连接^[2]. α FUT共有9个亚型,其中只有 α FUT3可以形成 α 1, 3以及 α 1, 4两类键,故又称为 α 1, 3/1, 4 FUT3,既可合成LeX、LeY及sLeX,又可合成LeA、LeB及sLeA^[3]. 本研究成功地构建人FUT3基因真核表达载体pEGFP-C1-FUT3,并体外转染人乳腺癌细胞系MDA-MB-231,为进一步研究FUT3及其产物Lewis抗原的表达调控提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株MDA-MB-231购自上海中科院细胞库;大肠杆菌DH5 α 感受态细胞由本室保存;脂质体(lipofectamineTM 2000)及TRIzol为Invitrogen公司产品; pEGFP-C1质粒购自Biosciences Clontech公司;胎牛血清、Leibovitz's L-15培养基购自Gibco公司;血液总RNA提取试剂盒、质粒小量及中量提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自Omega公司;限制性内切酶EcoR I、Xho I、T4 DNA连接酶、pMD18-T Simple、RT-PCR试剂盒为TaKaRa公司产品,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成. 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因FUT3的RT-PCR扩增: 参照GenBank FUT3基因ORF序列通过Primer 5.0软件设计特异性引物: 上游5'-ccgctcgagTTCGCAA

CCCATACAGTGAA-3', 下游5'-ccggaattcCAGGCAGATGAGGTTCCCC-3', 分别在5'端加上Xho I和EcoR I的酶切位点. 采用Omega血液总RNA提取试剂盒提取健康男性外周血总RNA. 以总RNA为模板,使用TaKaRa cDNA Kit进行逆转录反应,获得cDNA. PCR扩增FUT3基因,反应体系按说明书,反应条件为: 95℃预变性5 min, 95℃变性50 s, 62.8℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 35个循环;最后72℃延伸10 min,扩增片段长度为1172 bp. PCR扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.2 T载体克隆和测序: DNA凝胶回收试剂盒回收纯化PCR产物,将目的片段与pMD18-T载体16℃过夜连接. 取连接产物转化DH5 α 感受态大肠杆菌,蓝白斑筛选挑取阳性克隆送交Invitrogen公司测序鉴定。

1.2.3 pEGFP-C1-FUT3真核表达载体的构建: 用Xho I、EcoR I分别双酶切重组pMD18-T-FUT3质粒及pEGFP-C1空载体,凝胶电泳回收并纯化目的基因片段,用T4 DNA连接酶连接,过夜. 次日,连接产物转化DH5 α 感受态大肠杆菌, Omega小提质粒试剂盒抽提质粒DNA,内切酶Xho I和EcoR I双酶切鉴定。

1.2.4 真核表达载体pEGFP-C1-FUT3转染人乳腺癌细胞MDA-MB-231: 转染前24 h将处于对数生长长期的人乳腺癌细胞MDA-MB-231用胰酶消化,按4 \times 10⁵个细胞/孔的浓度接种于6孔板内,37℃培养至细胞密度为80%-90%时换无血清无双抗Leibovitz's L-15培养基,用脂质体lipofectamineTM 2000分别介导空质粒及重组质粒转染MDA-MB-231细胞,按试剂说明书进行操作. 转染24 h后,换用含有G418(800 mg/L)的L-15培养液进行筛选,2 wk后G418改为400 mg/L维持剂量筛选. 分离出抗G418的阳性克隆,然后再扩大培养,得到稳定传代的细胞克隆,荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的表达情况。

1.2.5 RT-PCR鉴定FUT3基因在MDA-MB-231细胞中的稳定表达: 收集稳定转染FUT3基因的乳腺癌MDA-MB-231细胞,用TRIzol提取细胞总RNA,进行逆转录. 以 β -actin为内参照,半定量PCR鉴定FUT3基因. FUT3引物序列为: 上游5'-GAAGCTGTGGAGGAACGC-3', 下游5'-TGAACCAAGCCGCTATGC3-3', 扩增片段为308 bp; β -actin引物序列为: 上游5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3', 下游5'-GAAAGGGTGTA

创新盘点
本研究首次克隆人FUT3的基因,并且转染至MDA-MB-231细胞中获得稳定表达的细胞株。

应用要点

本文成功地构建人FUT3基因真核表达载体pEGFP-C1-FUT3, 并体外转染人乳腺癌细胞系MDA-MB-231, 为深入研究FUT3对糖抗原合成的调控及FUT3对肿瘤细胞行为学的影响提供了理想的载体。

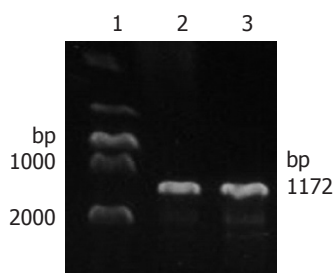


图1 FUT3基因PCR产物的琼脂糖电泳。1: DL-2000 DNA Marker; 2-3: FUT3 PCR产物。

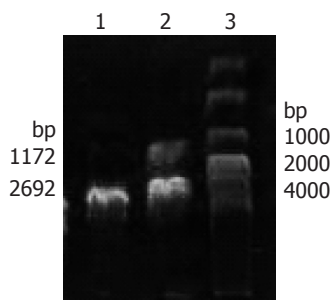


图2 pMD18-T-FUT3质粒酶切后琼脂糖凝胶电泳图。1: pMD18-T-FUT3; 2: pMD18-T-FUT3/*Xho*I + *Eco*R I; 3: DL-10000 DNA Marker。

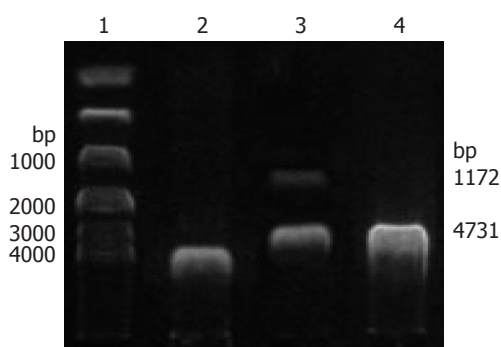


图3 重组质粒pEGFP-C1-FUT3双酶切鉴定。1: DL10 000 DNA Marker; 2: pEGFP-C1-FUT3; 3: pEGFP-C1-FUT3/*Xho*I + *Eco*R I; 4: pEGFP-C1。

CGCAACT-3', 扩增片段为303 bp。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

2 结果

2.1 FUT3目的基因的PCR扩增 以人外周血白细胞提取的RNA为模板, 逆转录合成cDNA, PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳可见1172 bp处有明显的扩增条带, 与预期结果一致(图1)。

2.2 T载体克隆的鉴定 目的基因与T载体连接后, pMD18-T-FUT3重组体经*Xho*I与*Eco*R I双酶切后产生2692 bp的pMD18-T载体片段和1172 bp的FUT3基因片段2个条带, 表明pMD18-T-FUT3质粒构建成功(图2)。菌液测序结果显示: 插入T载体的序列与GenBank中登录的人FUT3基因编码区(CDS)报道序列完全一致。

2.3 真核表达载体pEGFP-C1-FUT3的酶切鉴定 重组质粒pEGFP-C1-FUT3经限制性内切酶*Xho*I和*Eco*R I双酶切后, 经琼脂糖凝胶电泳

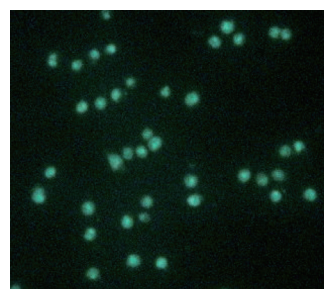


图4 荧光显微镜观察转染pEGFP-C1-FUT3的MDA-MB-231细胞($\times 200$)。

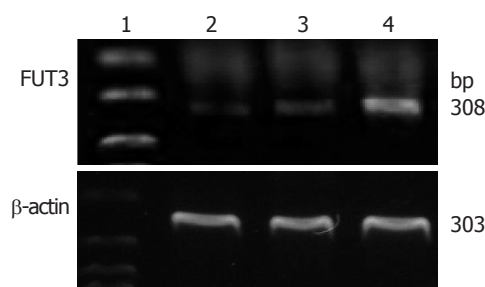


图5 各转染组细胞FUT3基因的mRNA水平。1: DL 2000 DNA Marker; 2: 未转染细胞组; 3: 转染pEGFP-C1空载体组; 4: 转染pEGFP-C1-FUT3组。

显示在4731 bp和1172 bp处有2个片段, 分别与pEGFP-C1载体以及FUT3目的基因大小一致, 证明FUT3已经成功构建到pEGFP-C1载体中(图3)。

2.4 荧光显微镜检测 FUT3在MDA-MB-231细胞中的表达 利用脂质体转染技术, 将重组质粒pEGFP-C1-FUT3与空载体质粒pEGFP-C1转染入MDA-MB-231细胞中, 倒置荧光显微镜下观察到转染pEGFP-C1-FUT3细胞内有较强的绿色荧光, EGFP-FUT3融合蛋白主要定位在细胞质(图4)。

2.4 目的基因FUT3在MDA-MB-231细胞中的mRNA表达 308 bp处有目的基因表达, 转染pEGFP-C1-FUT3组的细胞FUT3基因表达与未转染组及转空载体组相比, 表达量有明显增高, 而未转染组与转空载体组细胞FUT3表达量均较低(图5)。

3 讨论

细胞癌变过程中总伴有糖链结构的改变, 黏附、迁移及侵袭等重要的细胞学行为都与特定的糖链的结构或糖基有关^[3]。岩藻糖残基是细胞表面寡糖链中的重要基团之一, 可参与构成某些重要黏附分子的糖链结构, 如Lewis抗原决定簇(LeA、LeX、sLeA及sLeX)的构成^[4]。许多恶性肿瘤细胞表面有LeX及其相关结构的高度表达, sLeX与sLeA在某些类型的肿瘤中作为肿瘤标志物, 与患者生存率直接相关并可作为转移性疾病的预后指标^[5-7]。LeX结构的表达取决于 $\alpha 1, 3/4$ FUT, 是LeX抗原合成中的最后一步。该

基因编码6种 α 1, 3/4FUTs家族成员(FUT3-7与FUT9)^[8-9]. FUT3(Lewis血型)主要分布在肾、胆囊、乳汁中^[10], 是唯一可形成 α 1, 3与 α 1, 4两类键的FUT, 既能合成带 α 1, 3-Fuc的LeX、LeY、sLeX, 又能唯一合成带 α 1, 4-Fuc的LeA、LeB及sLeA. 研究表明^[11-13], FUT3基因与FUT6基因与某些肿瘤的sLeX合成相关. Kazuhiro *et al*^[14]测得在15株上皮细胞癌细胞系中有14株表达sLeX结构, 8株表达sLeA, 其中14株细胞系中能检测到FUT3的mRNA, 与sLeX在细胞表面的表达相一致. Kimura *et al*^[15]利用免疫组织化学染色检测正常结肠组织中FUT3表达很少, 而在结肠肿瘤组织中, FUT3呈现大量增强的表达, 呈分散、随机分布. 因此, 建立一个具有生物学功能的FUT3蛋白表达系统, 对深入研究FUT3的生物学功能及分子机制有着十分重要的作用.

为了明确在肿瘤转移过程中FUT3基因调控机制, 本实验克隆了FUT3基因的全序列, 并成功地构建了以EGFP为报告基因的真核表达质粒pEGFP-C1-FUT3, 通过脂质体2000成功地稳定转染靶细胞MDA-MB-231, 荧光检测及RT-PCR证实FUT3在MDA-MB-231细胞中有效表达. 表达载体的构建是在细菌质粒上引入一个真核启动子, 在启动子的下游插入目的蛋白的编码基因, 由于质粒上不仅有大肠杆菌的复制起点, 而且有真核启动子, 所以表达载体既可在大肠杆菌中复制又在真核细胞中表达. 同时pEGFP-C1表达载体中含有EGFP, 该基因与目的基因连接形成融合蛋白, 可以进行细胞水平上的快速筛选、检测该载体的转染和表达效率, 而不影响目的基因的表达.

总之, 本研究成功构建了EGFP为报告基因的真核表达载体pEGFP-C1-FUT3, 为深入研究FUT3对糖抗原合成的调控及FUT3对肿瘤细胞行为学的影响提供了理想的载体, 同时为下一步的重组质粒实验奠定了基础.

4 参考文献

- Brooks SA, Leatham AJ. Expression of the CD15 antigen (Lewis x) in breast cancer. *Histochem J* 1995; 27: 689-693
- Prorok-Hamon M, Notel F, Mathieu S, Langlet C, Fukuda M, El-Battari A. N-glycans of core2 beta(1,6)-N-acetylglucosaminyltransferase-I (C2GnT-I) but not those of alpha(1,3)-fucosyltransferase-VII (FucT-VII) are required for the synthesis of functional P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1): effects on P-, L- and E-selectin binding. *Biochem J* 2005; 391: 491-502
- Ito H, Hiraiwa N, Sawada-Kasugai M, Akamatsu S,

- Tachikawa T, Kasai Y, Akiyama S, Ito K, Takagi H, Kannagi R. Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-transferases in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer* 1997; 71: 556-564
- Raes G, Ghassabeh GH, Brys L, Mpofu N, Verschueren H, Vanhecke D, De Baetselier P. The metastatic T-cell hybridoma antigen/P-selectin glycoprotein ligand 1 is required for hematogenous metastasis of lymphomas. *Int J Cancer* 2007; 121: 2646-2652
- Kimura H, Shinya N, Nishihara S, Kaneko M, Irimura T, Narimatsu H. Distinct substrate specificities of five human alpha-1,3-fucosyltransferases for in vivo synthesis of the sialyl Lewis x and Lewis x epitopes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 131-137
- Magnani JL. The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Arch Biochem Biophys* 2004; 426: 122-131
- Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem* 2008; 143: 725-729
- Kudo T, Fujii T, Ikegami S, Inokuchi K, Takayama Y, Ikehara Y, Nishihara S, Togayachi A, Takahashi S, Tachibana K, Yuasa S, Narimatsu H. Mice lacking alpha1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology* 2007; 17: 1-9
- Escrevente C, Machado E, Brito C, Reis CA, Stoeck A, Runz S, Marme A, Altevogt P, Costa J. Different expression levels of alpha3/4 fucosyltransferases and Lewis determinants in ovarian carcinoma tissues and cell lines. *Int J Oncol* 2006; 29: 557-566
- Narimatsu H. [Human fucosyltransferases: tissue distribution of blood group antigens, cancer-associated antigens and fucosyltransferases] *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1998; 43: 2394-2403
- Togayachi A, Kudo T, Ikehara Y, Iwasaki H, Nishihara S, Andoh T, Higashiyama M, Kodama K, Nakamori S, Narimatsu H. Up-regulation of Lewis enzyme (Fuc-TIII) and plasma-type alpha1,3fucosyltransferase (Fuc-TVI) expression determines the augmented expression of sialyl Lewis x antigen in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1999; 83: 70-79
- Johnson PH, Donald AS, Clarke JL, Watkins WM. Purification, properties and possible gene assignment of an alpha 1,3-fucosyltransferase expressed in human liver. *Glycoconj J* 1995; 12: 879-893
- Malagolini N, Santini D, Chiricolo M, Dall'Olio F. Biosynthesis and expression of the Sda and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon. *Glycobiology* 2007; 17: 688-697
- Yago K, Zenita K, Ginya H, Sawada M, Ohmori K, Okuma M, Kannagi R, Lowe JB. Expression of alpha-(1,3)-fucosyltransferases which synthesize sialyl Le(x) and sialyl Le(a), the carbohydrate ligands for E- and P-selectins, in human malignant cell lines. *Cancer Res* 1993; 53: 5559-5565
- Kimura H, Kudo T, Nishihara S, Iwasaki H, Shinya N, Watanabe R, Honda H, Takemura F, Narimatsu H. Murine monoclonal antibody recognizing human alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *Glycoconj J* 1995; 12: 802-812

同行评价
本研究构建了FUT3的绿色荧光表达载体, 为阐释其在肿瘤中的生物学作用奠定了基础, 有一定的参考意义.