

# 奶牛 $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶基因的克隆表达

姚晶<sup>1,2</sup>, 张阳旻<sup>1,2</sup>, 吴正钧<sup>1</sup>, 任婧<sup>\*1</sup>

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 光明乳业股份有限公司 技术中心, 上海 200436; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

**摘要:** 唾液酸化路易斯-X(sialyl lewis x, Slex) 是选择素家族的一个共同糖配体, 通过与选择素竞争性地结合炎症细胞, 可以抑制炎症反应。克隆表达 Slex 合成过程中的关键酶, 就可以在体外进行 Slex 的生物合成, 从而进行相关生物制剂的开发。 $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶(alpha-(1,3)-fucosyltransferase, FT)就是参与 Slex 生物合成过程的关键酶之一。利用相关软件对牛的 FT 基因进行了生物信息学的分析, 了解了 FT 的相关理化性质。通过 PCR 的方法获得了 FT 基因, 构建了重组质粒 *pMD19-FT*, 并亚克隆至表达载体 *pPIC9K*。通过电转化将线性化的表达质粒 *pPIC9K-FT* 整合到宿主菌 *Pichia pastoris* GS115 基因组上, 构建了重组酵母 *GS115-FT*。经诱导表达后, SDS-PAGE 检测到了目的蛋白质条带, 证明了此基因在 *P. pastoris* GS115 中能够可溶性表达。

**关键词:** 唾液酸化路易斯-X; 牛;  $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶; 克隆; 表达

**中图分类号:** Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)03—0261—07

## Clone and Expression of Alpha-(1,3)-Fucosyltransferase from *Bos Taurus*

YAO Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Yangyang<sup>1,2</sup>, WU Zhengjun<sup>1</sup>, REN Jing<sup>\*1</sup>

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center of Bright Dairy Co.Ltd., Shanghai 200436, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Sialyl lewis x (Slex) was one of the common glyco ligands of the selectin family. Slex combining with the inflammatory cells competitively could make inflammation reaction restrain efficiently. Clone and expression of the key enzymes in the biosynthesis process of Slex made the biosynthesis process of Slex *in vitro* possible, and it was also good for some related research of biological agents. Alpha-(1,3)-fucosyltransferase (FT) was the very one of the key enzymes in the biosynthesis process of Slex. In order to understand some related physicochemical properties of the FT gene, its sequence was analyzed by using approaches of bioinformatics online. The FT gene was inserted into a recombinant plasmid *pMD19-T*, and subcloned to the expression plasmid *pPIC9K* later. The linear expression plasmid *pPIC9K-GT* was integrated to the genome of *Pichia pastoris* GS115 by electrotransformation. After inducible expression, the soluble target protein was detected by SDS-PAGE. The result demonstrated that successfully expressed in *P. pastoris* GS115.

收稿日期: 2013-07-01

基金项目: 国家 973 计划项目(2010CB735705); 上海市科委项目(09DZ2251400)。

\* 通信作者: 任婧(1980—), 女, 陕西西安人, 高级工程师, 主要从事乳酸菌分子生物学研究。E-mail: renjing@brightdairy.com

**Keywords:** Sialyl lewis x, Slex; *B. taurus*; alpha-(1,3)-fucosyltransferase, FT; clone; expression

$\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶 (alpha-(1,3)-fucosyltransferase, FT) 参与 Lewis 糖链合成最后一步的岩藻糖化反应, FT 有 6 类, 包括 FT-<sub>1</sub>、FT-<sub>2</sub>、FT-<sub>3</sub>、FT-<sub>4</sub>、FT-<sub>5</sub> 和 FT-<sub>6</sub>, 其主要功能是催化 GDP-岩藻糖的岩藻糖基转移至糖链中 N-乙酰氨基乳糖单位的 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)上。Lewis 是一组存在于细胞表面糖脂和糖蛋白糖链(主要在 O-糖链, 也可在 N-糖链)上的糖类抗原<sup>[1-3]</sup>。唾液酸化 Lewis (Slex) 则是一种细胞粘附分子——选择素 (selectin) 的共同糖配体, 选择素主要参与了细胞粘附和迁移, 这与细胞的生长发育、组织正常功能的维持、炎症的发生及肿瘤的形成和转移等多种生理过程密切相关, 但其中的作用机制, 如 Slex 的表达与癌细胞的增殖、转移、凋亡之间的关系等, 并不十分清楚<sup>[4-5]</sup>。FT 是 Slex 合成过程中必不可少的糖基转移酶, 催化合成反应的最后一步, 调节和控制着 Slex 的表达。由于 FT 与免疫应答反应、肿瘤的发生发展及转移等体内生理活动密切相关, 国内外学者对于 FT 的研究多集中在 FT 的酶活、表达量、参与合成产生的 Slex 的结构与体内这些生理活动的关系, 以及 FT 基因的调控作用等方面<sup>[6-9]</sup>。为了研究 FT 基因的作用, 相关学者已经成功克隆了人、鼠、兔等的 FT 基因, 并分别在人表皮癌细胞系 A431、小鼠脾细胞、原核表达系统 pET30 中成功表达; 而牛的 FT 相关基因的克隆表达尚未见报道<sup>[10-12]</sup>。作者通过对牛的其中一种 FT 基因开展相关的分子生物学研究, 为进一步理解其在体内的生理功能和作用机理, 及相关疾病新型药剂的研发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 为光明乳业股份有限公司技术中心实验室保存, 基因型: supE44 $\Delta$ lacU169( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15)hsdR recA1 endA1 gurA1 thi-1 relA1。毕赤酵母 GS115, 为 Invitrogen 公司产品, 由复旦大学惠赠。

质粒 pMD19-T, 为 TaKaRa 公司产品。毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K, 为 Invitrogen 公司产品, 由上海生物工程有限公司惠赠。

### 1.2 试剂和仪器

**1.2.1 主要试剂** 限制性内切酶 Not I-HF、Ava I-HF、Bam HI-HF、Sac I-HF, NEB 公司产品; T4 DNA 连接酶、溴酚蓝指示剂(6x buffer)、X-Gal、硫酸卡纳霉素、氨苄青霉素、血液组织细胞基因组提取试剂盒、蛋白 loading buffer、标准蛋白 Marker, 天根公司产品; Taq DNA 聚合酶, probest DNA 聚合酶, Wide range DNA Marker, DL2000 DNA Marker, TAKARA 公司产品; 其余常规试剂均为国产分析纯。

**1.2.2 主要仪器设备** TC-25/H 型 PCR 仪, 杭州博日科技有限公司制造; EPS-300A 型数显双稳电泳仪, 上海天能科技有限公司制造; 412951 型凝胶成像仪, BIO-RAD 公司制造。

### 1.3 FT 基因片段的生物信息学分析

**1.3.1 基本理化性质预测分析** 根据 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 上公布的 FT 的蛋白质序列 (获取号: NP\_777160.1), 登录 <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>, 在线对其相对分子质量、氨基酸组成、等电点及疏水性等基本理化性质进行分析<sup>[13]</sup>。

**1.3.2 蛋白质组学预测分析** 利用网站工具软件 PROF 软件 (<http://www.predictprotein.org/>) 和 HNN 软件 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) 预测 FT 的二级结构。利用网站工具软件 Scan Prosite (<http://www.predictprotein.org/>) 对 FT 进行结构域分析。利用网站工具软件 SWISS-MODEL 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行建模, 预测该酶的三级结构, 结果用蛋白质三维图象软件 java 2.0 查看<sup>[14-16]</sup>。

**1.3.3 蛋白质序列的同源性分析与系统进化树的构建** 将氨基酸序列提交至 NCBI 数据库中, 利用网站工具软件 BLAST 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对分析。进而利用 Clustal W 软件进行多序列同源性比对和聚类分析, 系统进化树使用 MEGA 5.0 软件的邻接归并法 (NJ 法) 构建<sup>[17]</sup>。供试物种为: 家犬 (*Canis lupus familiaris*, NP\_001005380.1), 大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*, XP\_002927989.1), 黑猩猩 (*Pan troglodytes*, NP\_001008978.1), 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*, XP\_002714636.1), 家鼠 (*Mus musculus*, NP\_034373.1), 马 (*Equus caballus*, XP\_001503875.1), 褐鼠 (*Rattus norvegicus*,

NP\_445917.1), 鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*, XP\_001506677.1), 短尾猴 (*Monodelphis domestica*, XP\_001367612.1), 红原鸡 (*Gallus gallus*, NP\_001072970.1), 火鸡 (*Meleagris gallopavo*, XP\_003204387.1), 安乐蜥 (*Anolis carolinensis*, XP\_003225370.1)。还有人 (*Homo sapiens*, CAB41890.1)。

#### 1.4 FT 基因片段的扩增

由于奶牛的 FT 基因不含有内含子, 因此可以直接从基因组 DNA 直接扩增获得。从荷斯坦奶牛静脉采血 5 mL, 分装置至含有抗凝剂的 1.5 mL 的离心管中, 液氮速冻, 后置于一80 °C 的超低温冰箱贮存。用血液、组织、细胞基因组 DNA 抽提试剂盒抽提基因组, 并电泳检测, 保存基因组 DNA 于 TE 缓冲液中备用, 主要操作按照试剂盒说明书。

参考 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库荷斯坦奶牛  $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶 ( $\alpha$ -(1,3)-fucosyltransferase, FT) 编码区序列, 设计引物:

P1: ACTGAGCCTAGGATGACCTCAGCATCCAAAGG; P2: AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAATTCCAAACCATTCTCTAAATTACC, 进行 PCR, 用质量分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并对目的 DNA 回收纯化。

#### 1.5 重组质粒 pMD19-FT 的构建

将上述 PCR 产物溶液于质量分数 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳后, 以 Marker 为参照估算扩增产物的物质的量。在与 T 载体连接前, 首先进行一个加 A 反应。然后将目的基因片段和载体 pMD19-T 按摩尔比 1:3~1:10 进行连接反应并转化。对转化的重组子进行蓝白斑筛选, 挑选出目的重组子, 并对重组子进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定。将 PCR 鉴定与双酶切鉴定均为阳性的转化子送至 Invitrogen 公司进一步测序鉴定。送至 Invitrogen 公司测序, 测序引物为 M13(+), M13(-), 对测序结果进行比对分析。

#### 1.6 表达质粒 pPIC9K-FT 的构建

制备具有双黏性末端的重组质粒 pMD19-FT 以及 pPIC9K 质粒片段, 按一定比例加入到含有 T4 连接酶缓冲液和 T4 连接酶的体系中, 16 °C 连接过夜, 转化。并按上述方法进行重组子的筛选及鉴定, 测序引物为  $\alpha$ -factor/3' AOX, 并根据测序结果, 对目的基因的序列及位置进行验证。

1.7 重组酵母 GS115-FT 转化子制备及诱导表达  
抽提鉴定正确的重组质粒 pPIC9K-FT, 电转化

至 *P. pastoris* GS115 感受态细胞, 电转化电压 1.5 kV, 电击时间 5 ms。电击结束后取 900  $\mu$ L 山梨醇溶液混匀菌体并移至 1.5 mL 离心管中, 30 °C 静置培养 1h。取 200  $\mu$ L 转化液涂布至 MD 平板, 30 °C 培养 2~3 d 至出现 His<sup>+</sup>转化子。

待转化子长至肉眼可见时, 将转化子菌落编号并一一对应地点在含有 G418 硫酸盐质量浓度为 2 mg/mL 的 MD 和 MM 平板上, 30 °C 培养 2~3 d, 筛选在 MD、MM 平板上都正常生长的转化子 His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>。随机挑取 5 个 His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>转化子, 用 Lysis buffer for microorganism to direct PCR 试剂进行菌落 PCR, PCR 引物为  $\alpha$ -factor/3' AOX。

取鉴定 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 转化子接种至 100 mL 的 BMGY 培养基中, 30 °C 250 r/min, 培养至 OD<sub>600</sub>=2.0~6.0。3 000 g 离心 5 min 收集菌体, 用 BMMY 培养基重悬并稀释至 OD<sub>600</sub>=1.0, 分别进行诱导培养 24、48、72 h, 以 1% (体积分数) 甲醇为诱导剂进行诱导表达。蛋白质样品 15 000 r/min 离心 2 min 收集上清液, 取 1 mL 置液氮中速冻并保存于一80 °C。添加甲醇至 V(上清):V(甲醇)=1:1, 4 °C 静置 1 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 沉淀复溶于 100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 质量分数 12% SDS-PAGE 检测蛋白质表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 FT 基因的生物信息学分析

2.1.1 FT 基因基本理化性质 FT cDNA 为 1 101 bp, 有 1 个 ORF (碱基序列 9~1088), 不含有内含子。通过其序列的在线分析发现, FT 的化学式为 C<sub>1930</sub>H<sub>2885</sub>N<sub>489</sub>O<sub>535</sub>S<sub>15</sub>, 原子总数为 5 854, 相对分子质量为 41 978.9, 包括 359 个氨基酸残基, 等电点理论值为 7.61, 负电荷残基 (Asp+ Glu) 总数为 34, 正电荷残基 (Arg+ Lys) 总数为 35, 不稳定系数为 45.20, 故认为该蛋白质为不稳定蛋白质。脂肪系数为 80.33, 亲水性评估为 -0.275。依据氨基酸分值越低亲水性越强和分值越高疏水性越强的规律, 可见该酶为亲水性蛋白质。该酶的氨基酸组成如表 1 所示, 其中相对含量比较多的氨基酸为 Ser (31 个, 占 8.6%), 含量比较少的氨基酸是 Tyr (6 个, 占 1.7%)。其在哺乳动物体内的半衰期预测值为 30 h, 在酵母菌中则 >20 h, 在大肠杆菌中为 >10 h。

2.1.2 FT 基因的蛋白质组学分析 通过 PROF 和 HNN 软件对 FT 进行二级结构的预测, 结果如表 2

表 1 FT 的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of alpha-(1,3)-fucosyltransferase

氨基酸名称	数量/个	占比/%	氨基酸名称	数量/个	占比/%	氨基酸名称	数量/个	占比/%
Ala	14	3.9	Arg	11	3.1	Asn	25	7.0
Asp	14	3.9	Cys	9	2.5	Gln	10	2.8
Glu	20	5.6	Gly	11	3.1	His	13	3.6
Ile	23	6.4	Leu	31	8.6	Lys	24	6.7
Met	6	1.7	Phe	23	6.4	Pro	19	5.3
Ser	31	8.6	Thr	23	6.4	Trp	12	3.3
Tyr	18	5.0	Val	22	6.1			

所示。从预测的结果可以看出,两种方法所得出的二级结构中,包含的  $\alpha$  螺旋基本一致,而  $\beta$  折叠、自由卷曲则有一定差别。利用 ScanPROSITE 对 FT 的功能域分析发现,它有 3 个 N 糖基化位点,1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点,6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,3 个酪蛋白激酶 磷酸化位点,1 个酪氨酸激酶磷酸化位点以及 2 个 N 豆蔻酰基化位点,如表 3 所示。利用 SWISS-MODEL 软件预测的 FT 的三维结构如图 1 所示。

表 2 FT 二级结构分析

Table 2 Predicted secondary structure of alpha-(1,3)-fucosyltransferase

分析方法	二级结构		
	$\alpha$ 螺旋	$\beta$ 折叠	自由卷曲
PROF 软件	88 个(24.51%)	75 个(20.89%)	196 个(54.60%)
HNN 软件	100 个(27.86%)	94 个(26.18%)	165 个(45.96%)

表 3 FT 蛋白功能域分析

Table 3 Predicted protein function of alpha-(1,3)-fucosyltransferase

功能域	起始氨基酸位置
N 糖基化位点	62,101,153
cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点	159
蛋白激酶 C 磷酸化位点	55,95,157,227,237,254
酪蛋白激酶 磷酸化位点	39,146,294
酪氨酸激酶磷酸化位点	211
N 豆蔻酰基化位点	90,219

**2.1.3 蛋白序列同源性分析与系统进化树的构建** 将蛋白质序列在 NCBI 上进行 BLAST, 通过多重序列比对,发现和供试物种的同源性都非常高。通过 MEGA 5.0 建立的系统进化树如图 2 所示,可以看出,供试的 14 个物种的 FT 被聚成 2 大类:红原鸡、火鸡和安乐蜥的 FT 为一类。其中雉科的红原鸡、火

鸡为一支。褐鼠、家鼠等其他 11 个哺乳动物的 FT 聚为另一类。其中,短尾狨的 FT 自为一支,其他 10 个的 FT 聚为一支。在此 10 个物种的 FT 中,鸭嘴兽的 FT 为一分支,其他 9 种聚为另一分支。这 9 个物种 FT 又分为 2 个分支:褐鼠、家鼠、黑猩猩和家兔,以及人的 FT 聚为一个分支,其中家兔又自成一分支,褐鼠和家鼠聚为一组,黑猩猩和人聚为一组,两两组成另一个分支;大熊猫、家犬、马和牛的 FT 聚为另一分支,其中大熊猫自成一支,马和牛的 FT 组成的小分支和家犬聚为另外一分支。

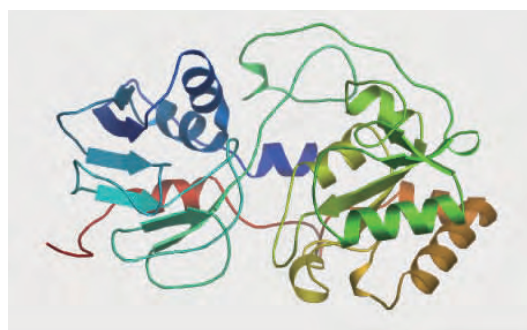


图 1 SWISS-MODEL 预测的 FT 三维结构

Fig. 1 Predicted 3D structure of alpha-(1,3)-fucosyltransferase by SWISS-MODEL

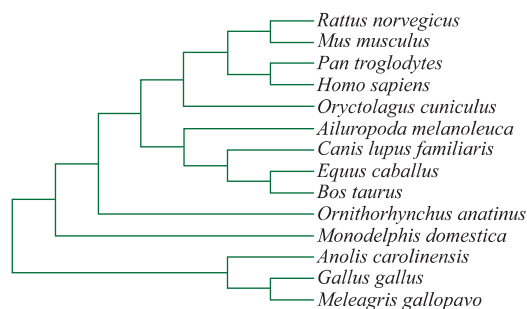
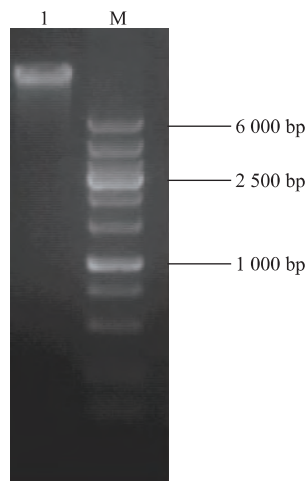


图 2 FT 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of alpha-(1,3)-fucosyltransferase

## 2.2 荷斯坦奶牛基因组 DNA 的提取和目的基因的扩增

为得到奶牛 $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶的相关基因,根据 GenBank 数据库中报道的岩藻糖基转移酶基因设计 PCR 引物,并结合表达载体引入相关酶切位点。用血液、组织、细胞基因组 DNA 抽提试剂盒按照试剂盒说明书抽提基因组,并进行电泳检测,如图 3 所示,可以看出,基因组 DNA 条带清晰、整齐,说明该试剂盒提取的基因组 DNA 纯度较高,品质较好。保存基因组 DNA 于 TE 缓冲液中,作为扩增目的基因的模板备用。

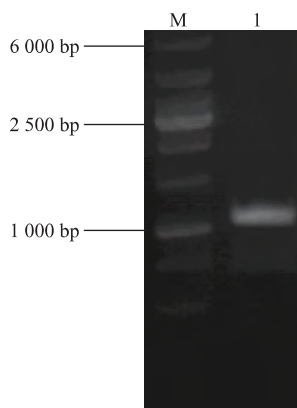


1 基因组; M marker

图 3 基因组 DNA 电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis result of genomic DNA

将上步抽提的基因组 DNA 作为模板,加入到 50  $\mu$ L PCR 体系中进行 PCR 反应,电泳检测在约 1.1 kb 处出现目的条带,如图 4 所示。



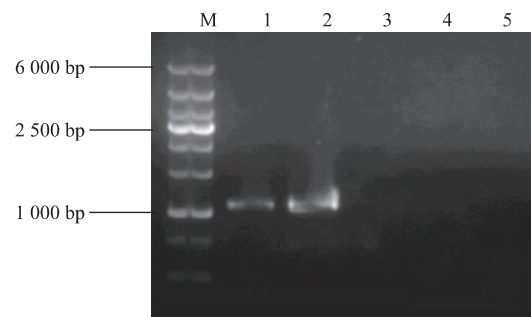
1 PCR 产物; M marker

图 4 PCR 产物电泳图

Fig. 4 Electrophoresis result of PCR product

## 2.3 重组质粒阳性克隆筛选及鉴定

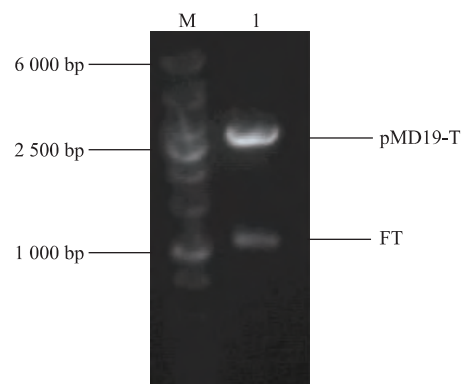
上步 PCR 扩增产物经回收试剂盒纯化后,进行加 A 反应。按照载体与插入片段摩尔比约为 1:3~1:10,进行 T 载体连接。连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,利用蓝白斑筛选转化子。经过夜培养,平板上可明显观察到蓝白斑。对平板上正常生长的白色菌斑随机挑取 5 个,进行 PCR 鉴定,结果如图 5 所示,发现①号、②号菌落为阳性克隆。继而将②号菌落进行双酶切鉴定,可以得到较好的酶切结果(图 6)。将②号菌保种后送样测序分析。将测序结果与 NCBI 公布的 FT 基因比对,结果发现 PCR 产物发生了一个碱基突变。通过多次重复实验,发现在同一位点均发生相同的碱基突变,由于本实验中 PCR 模板为中国荷斯坦乳牛,而 genebank 中公布的序列来源为美国乳牛,推测这个位点的突变属于个体差异。至此,构建出重组质粒并命名为 *pMD19-FT*。



M marker; 1 ①号菌; 2 ②号菌; 3 ③号菌; 4 ④号菌; 5 ⑤号菌

图 5 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR analysis of the DH5 $\alpha$



M marker; 1 质粒 *Avr* /*Not* -HF 双酶切

图 6 ②号菌质粒的双酶切图

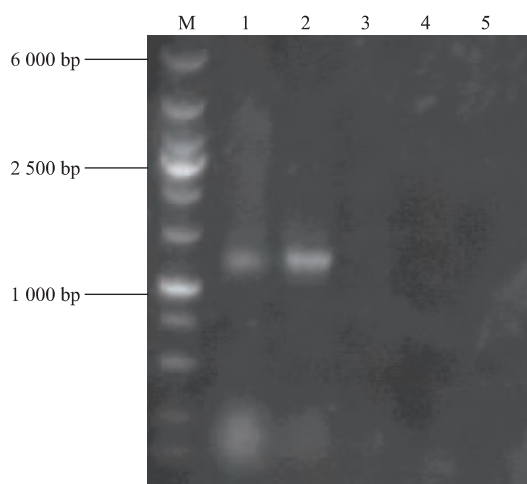
Fig. 6 Restriction endonuclease of *pMD19-FT*

## 2.4 表达载体的构建及鉴定

将含有 FT 编码区序列的重组质粒 *pMD19-FT*

和表达载体 *pPIC9K* 双酶切后,取适量于 16 °C 过夜连接,转化到 *E. coil* DH5 $\alpha$ 。用通用引物  $\alpha$ -factor 与 3' AOX 对挑取的菌落进行 PCR 鉴定,如图 7 所示,①号菌、②号菌可能为阳性克隆。

将①号菌质粒进行双酶切鉴定,测序验证,结果为阳性,证明目的基因 FT 已正确连接到表达载体 *pPIC9K* 中,说明已成功构建表达载体 *pPIC9K-FT*。



M marker; 1 ①号菌; 2 ②号菌; 3 ③号菌; 4 ④号菌; 5 ⑤号菌

图 7 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 7 PCR analysis of the DH5 $\alpha$

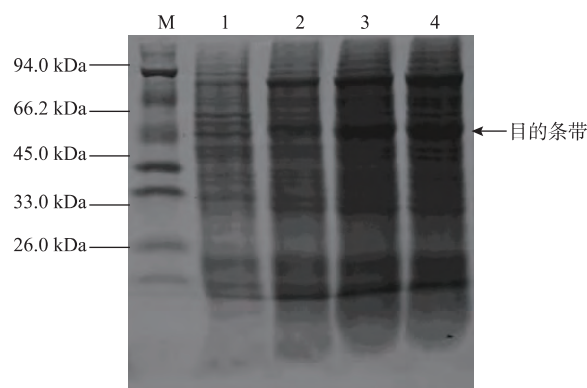
### 2.5 重组酵母的筛选鉴定及其诱导表达

大量制备 *pPIC9K-FT*, 用限制性内切酶 *Sac* I-HF 将其线性化并浓缩至 0.5~1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。将线性化质粒电转化至宿主菌 *P. pastoris* GS115 中, 筛选有 G418 抗性的 His+Mut+转化子, 并进行 PCR 鉴定。挑选在 MD、MM 平板上长得最快的 G418 抗性的 His+Mut+转化子, 经 G418 终质量浓度为 2 mg/mL 的 BMGY 培养至 OD<sub>600</sub>=2.0~6.0 时, 收集菌体用 G418 终质量浓度为 2 mg/mL 的 BMMY 稀释至 OD<sub>600</sub>=1.0, 再进行诱导培养。并对目的基因蛋白质进行诱导表达, 结果如图 8 所示。在约 45.0 kDa 处, 有一条明显的蛋白质条带, 其相对分子质量与预测值相符, 而此处阴性对照无此条带, 因此可以判断此条带为目的基因 FT 可以在宿主菌 *P. pastoris* GS115 中成功表达, 并可以分泌至胞外, 而且随着培养时间的增加, 目的蛋白质含量也不断积累。

## 3 结语

依据 NCBI 上的相关序列, 对奶牛 FT 基因进行

了生物信息学的分析, 通过在线预测可知, 目的蛋白质 FT 为一种可溶性稳定蛋白质, 具有糖基化、磷酸化、酰胺化等多个功能位点。利用蛋白质分析软件 SWISS-MODEL 对其三维结构进行了建模预测。通过对 FT 基因的生物信息学分析, 对主要理化性质及蛋白质结构进行了预测, 这对其克隆表达、分离纯化等后续相关工作的开展具有一定的指导意义。将 FT 编码区序列连接到重组质粒 *pMD19-T* 载体上并转化至 *E. coil* DH5 $\alpha$  中, 对转化子进行 PCR 鉴定、双酶切鉴定及测序鉴定, 证明了此段克隆基因的正确性。在此基础上进一步构建了真核表达系统 *P. pastoris* GS115-FT, 并对其进行诱导表达, 通过 SDS-PAGE 进行了目的检测, 结果显示目的蛋白质的相对分子质量大小与预测值相符, 且能够成功分泌到胞外并随之累积, 证实了之前生物信息学分析的部分结果是可靠的。但是, 有蛋白质的产生并不代表蛋白质就是有活性的。如果在表达过程中, 重组蛋白质由于糖基化等后修饰需要或者经过折叠等导致了酶学性质的变化或者丧失, 对其今后的开发利用都会产生巨大的影响。因此, 后续的工作将重点研究所表达重组蛋白质的酶学性质, 进一步证实其中一个点突变来源于个体差异的推测, 及其他生物信息学的分析结果的可靠性。在证实重组蛋白质相关酶学性质后, 进一步优化发酵条件, 以期在发酵周期内获得最大的生物量, 为后续的开发利用创造条件。



M protein marker; 1 阴性对照; 2 24 h; 3 48 h; 3 72 h

图 8 GS115-GT 不同时间的 SDS-PAGE 图谱

Fig.8 SDS-PAGE analysis of expression by GS115-FT

作者利用分子生物学技术成功克隆了奶牛的 FT 基因, 并在真核系统中可溶性表达, 这为 FT 的大量制备提供了可能, 为后续的科研工作, 如酶学

性质、Slex 的生物合成及相关生理、病理机理等方面 的深入研究打下了良好的基础。

### 参考文献:

- [1] 陈惠黎. 糖复合物的结构和功能[M]. 上海:上海医科大学出版社,1997:54-270.
- [2] Becker D J, Lowe J B. Fucose; Biosynthesis and biological function in mammals[J]. **Glycobiology**, 2003, 13(7):41-53.
- [3] Javaud C, Dupuy F, Maftah A, et al. The fucosyltransferase gene family; an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution[J]. **Genetica**, 2003, 118(2-3):157-170.
- [4] Munro J M. Expression of sialyl-lewis X an E-selectin ligand in inflammation, immune processes and lymphoid tissues [J]. **American Journal of Pathology**, 1992, 141:1397-1408.
- [5] Wang Q Y, Guo P, Duan L L, et al.  $\alpha$ 1,3-Fucosyltransferase- stimulates the growth of hepatocarcinoma cells via cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1[J]. **Cell Mol Life Sci**, 2005, 62:171-178.
- [6] Miyashiro M, Furuya S, Sugita T. Development of a sensitive separation and quantification method for sialyl Lewis X and Lewis X involving anion-exchange chromatography: biochemical characterization of alpha 1,3 fucosyltransferase [J]. **J Biochem**, 2004, 136(5):723.
- [7] 吴兴中, 陈迎风. 岩藻糖糖链与肝癌细胞的迁移作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002(6):932-937.  
WU Xingzhong, CHEN Yingfeng. Fucosylated oligosaccharides in the migration of hepatoma cells[J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 2002(6):932-937. (in Chinese)
- [8] 李文桦, 张文.  $\alpha$ 1,3 岩藻糖基转移酶 和糖蛋白 CD24 与肿瘤转移的研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(10):790-795.  
LI Wenhua, ZHANG Wen. Advance in the study of  $\alpha$ 1,3 fucosyltransferase and glycoprotein CD24 in tumor metastasis[J]. **China Oncology**, 2008, 18(10):790-795. (in Chinese)
- [9] Elmgren A, Mollicone R, Costache M, et al. Significance of individual point mutations, T202C and C314T, in the human Lewis (FUT3) gene for expression of Lewis antigens by the human alpha (1,3/1,4)-fucosyltransferase, Fuc-TIII [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1997, 272(35):21994-21998.
- [10] 杨雪松, 贾爽, 张震波, 等. 人  $\alpha$ 1,3-岩藻糖基转移酶 IV 荧光真核表达载体的构建及鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(10):1064-1068.  
YANG Xuesong, JIA Shuang, ZHANG Zhenbo, et al. Construction and identification of human fucosyltransferase 4 eukaryotic fluorescent expression vector[J]. **World Chinese Journal of Digestology**, 2008, 16(10):1064-1068. (in Chinese)
- [11] Elizabeth M S, Frances I S, Gherman W, et al. Cloning of a rat  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase gene; a member of the fucosyltransferase IV family[J]. **Glycoconjugate Journal**, 1997, 14(2):249-258.
- [12] 哲名家, 张森涛, 云涛, 等. 兔岩藻糖基转移酶基因的克隆与原核表达[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2012, 40(4):21-24.  
ZHE Mingjia, ZHANG Miaotao, YUN Tao, et al. Cloning and prokaryotic express of rabbit fucosyltransferases[J]. **Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed**, 2012, 40(4):21-24. (in Chinese)
- [13] Baxeavanis A D, Ouellette B F F. 生物信息学[M]. 李衍达, 孙之荣, 译. 北京:清华大学出版社, 2000:231-250.
- [14] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: A Web-Based environment for protein structure homology modelling[J]. **Bioinformatics**, 2006, 22:195-201.
- [15] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. **Nucleic Acids Research**, 2003, 31:3381-3385.
- [16] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling [J]. **Electrophoresis**, 1997, 18:2714-2723.
- [17] Mount D W. 生物信息学[M]. 钟扬, 王莉, 张亮, 译. 北京:高等教育出版社, 2003:301-345.