

# 小鼠 3 种 $\alpha$ 1,2 岩藻糖转移酶基因的比较

林 蓓\* 齐藤真木子<sup>1</sup> 岩森正男<sup>2</sup>

(中国医科大学第二临床学院妇产科, 沈阳 110004; <sup>1</sup> 东京大学医学部小儿科, 东京 113-8655;

<sup>2</sup> 近畿大学理工学部化学科, 大阪 577-8502)

**摘要** 利用 RT-PCR 方法克隆小鼠 3 种 GDP 岩藻糖:  $\beta$ -半乳糖苷  $\alpha$ 1,2-岩藻糖转移酶( $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase,  $\alpha$ 1,2-FT)基因编码区 MFUT-I、MFUT-II、MFUT-III, 序列分析结果表明 MFUT-I、MFUT-II 和 MFUT-III 间具有相当的同源性, 且分别与人类 H 基因(78.4%)、Se 基因(79.0%)和 Sec1 基因(74.9%)具有序列同源性。将 3 种基因编码区分别插入表达载体 pcDNA3.1 的多克隆位点, 并将其分别转染于 COS-7 细胞, 结果显示 MFUT-I 和 MFUT-II 基因转染后的 COS-7 细胞具有  $\alpha$ 1,2-FT 活性, 但在 MFUT-III 基因转染后的 COS-7 细胞中检测不到这种活性。应用 Northern 印迹杂交法研究基因在小鼠组织中的表达情况。证实 MFUT-II 可在多种组织中产生 3.5 kb 大小的 mRNA 转录产物, 然而 MFUT-I 和 MFUT-III 分别只在附睾和睾丸中显著表达。Southern 印迹杂交分析结果显示: 基因 MFUT-II 仅为一个拷贝, 而 MFUT-I 和 MFUT-III 可能存在 2 个拷贝。因此, MFUT-I、MFUT-II 和 MFUT-III 分别为鼠的 H 基因、Se 基因和 Sec1 基因。

**关键词** 小鼠;  $\alpha$ 1,2-岩藻糖转移酶; 基因; 克隆; 表达

具有 Fuc $\alpha$ 1,2Gal $\beta$  结构的 H 抗原参与血型抗原的形成、细胞黏附、形态发生和癌细胞的转移等生物学行为<sup>[1,2]</sup>。GDP-岩藻糖:  $\beta$ -半乳糖苷  $\alpha$ 1,2-岩藻糖转移酶(EC 2.4.1.69,  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase,  $\alpha$ 1,2-FT)是 H 抗原的合成酶, 它是由两种不同的结构基因 H 基因和 Se 基因编码。Sec1 基因与 Se 基因相关, 是一种突变的  $\alpha$ 1,2-FT 基因, 其编码的酶无活性<sup>[3-5]</sup>。猩猩、牛、兔及大鼠等动物均存在人 H、Se 基因的类似物。尽管它们编码的酶的底物特异性非常相似, 但其组织分布不同。尤其是兔 H 基因(RFT-I)只在脑组织中表达。另外, 对应于人 Sec1 基因的兔 RFT-II 基因可编码一种有活性的  $\alpha$ 1,2-FT, 其与兔 Se 型 RFT-III 酶具有相似的底物特异性。

在小鼠消化道中,  $\alpha$ 1,2-FT 能催化岩藻糖转移到无唾液酸-GM<sub>1</sub>(GA<sub>1</sub>)上, 产生岩藻糖化-GA<sub>1</sub>, 这一过程发生在断奶期, 并接受发育性调控。但这一作用只存在于常规条件下培育的小鼠中, 而在无菌条件下培育的小鼠则没有这种现象。给无菌饲养的小鼠服用微生物和环己米特放线菌酮, 可以诱导该基因表达, 这表明  $\alpha$ 1,2-FT 的表达是受后生机制控制的。为了解岩藻糖化过程的调控机制和 H 抗原在消化道及其他各种组织中的作用, 我们克隆了与人 H、Se 和 Sec1 基因相对应的小鼠  $\alpha$ 1,2-FT 基因编码

区, 并研究了这些基因转染 COS-7 细胞后表达产物的特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

TLC(薄层层析)板购自 Sigma 公司(St-Louis, MO); 限制性内切酶 *Hind*III、*Not*I、*Eco*RI、*Kpn*I、*Sac*I 等为美国 Gibco BRL 公司产品; 鲑鱼精子 DNA、 $\beta$ -D-半乳糖和质粒转染试剂盒(CellPect Transfection Kit)为美国 Pharmacia 公司产品; 质粒纯化试剂盒 GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit 及 NucleoBond Plasmid Kits 分别为美国 Pharmacia 公司及 Clontech Laboratories 产品; 基因克隆试剂盒 Original TA Cloning Kit 为美国 Invitrogen 公司产品; AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> 及测序用试剂盒 Bigdye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 为美国 PE, Applied Biosystems 公司产品; GDP-<sup>14</sup>C-Fucose(270.0 mCi/mmol)及 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP 为美国 NEN 公司产品; 表达质粒 pcDNA3.1 (+) 为美国 Invitrogen 公司产品; 转染用大肠杆菌 (Competent Cell)JM109 为日本 Toyobo 公司产品。测

收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-04-13

\* 通讯作者。Tel: 024-83956387; Fax: 024-83956787; E-mail: linbei88@hotmail.com

序仪ABI PRISM™ 310Genetic Analyzer 为美国Perkin Elmer, Norwalk, CT 制造; 影像分析仪BAS2000为日本Fuji Film 公司制造; 液体闪烁计数器Tri-Carb1500为Packard 公司制造。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠3种 $\alpha$ 1,2-FT基因的克隆** 利用AGPC (acid guanidium-phenol-chloroform)法提取小鼠十二指肠上皮细胞中的总RNA<sup>[6]</sup>, 然后应用cDNA合成试剂盒(Pharmacia, 美国)合成cDNA, 并以此为模板, 采用RT-PCR方法克隆小鼠3种 $\alpha$ 1,2-FT基因编码区, 具体方法如下: 引物设计参照基因库报道小鼠及大鼠的 $\alpha$ 1,2-FT基因序列, 引物(见表1)由Pharmacia公司(日本)合成。50  $\mu$ l PCR反应体系, 反应条件为94  $^{\circ}$ C变性9 min, 进入循环, 94  $^{\circ}$ C 1 min, 50  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 25个循环后72  $^{\circ}$ C延伸10 min, 部分PCR产物于含0.5%溴乙锭的1.2%的琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外线(320 nm)下观察特异性条带。克隆基因分别命名为MFUT-I、MFUT-II及MFUT-III。利用TA克隆试剂盒(Invitrogen公司, 美国)将PCR产物直接连接于载体pCR2.1后, 转染于大肠杆菌INV $\alpha$ F', 具体操作参照试剂盒说明进行。随机选取15个菌落, 利用PCR方法测定插入片断长度, 方法如下: PCR反应体系15  $\mu$ l, 反应条件同上, 引物为载体上引物T7 PromoterPrimer及M13 Reverse, 模板为大肠杆菌, 根据PCR产物长度, 选取阳性克隆。

**1.2.2 质粒的提取、纯化及测序** 利用质粒提取试剂盒(GFX™ Micro Plasmid Prep Kit, Pharmacia, 美国)提取、纯化质粒; 利用双脱氧链终止法(dideoxynucleotide terminator)方法进行基因序列分析, 方法如下: 20  $\mu$ l PCR反应系, 其中包括: 0.4  $\mu$ g质粒, 3 pmol引物, 8  $\mu$ l BigDye™ Premixture (Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, 美国), 反应条件为: 96  $^{\circ}$ C变性5 min, 进入循环, 96  $^{\circ}$ C 10 s, 50  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 4 min, 25个循环。所得

产物加热处理后, 利用测序仪ABI PRISM™ 310Genetic Analyzer(美国)进行测序, 测序结果利用GenBank数据库进行分析。测序使用引物为载体上引物及部分测序得知的基因序列。

**1.2.3 表达载体pcDNA3.1-MFUT的构建** 将上述克隆的质粒DNA及表达载体pcDNA3.1(+)用EcoRI酶切或HindIII和NotI双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段, 插入到表达载体相应的位点, 构建后载体命名为pcDNA3.1-MFUT-I、pcDNA3.1-MFUT-II和pcDNA3.1-MFUT-III。

**1.2.4  $\alpha$ 1,2-FT在COS-7细胞中的表达** 利用质粒转染试剂盒(CellPectTansfection Kit, Pharmacia, 美国)将表达载体pcDNA3.1-MFUT-I、pcDNA3.1-MFUT-II或pcDNA3.1-MFUT-III分别转染到COS-7细胞中, 细胞在含有10%FCS的DMEM培养基中培养72 h, 然后搜集细胞, 将其在0.25 mol/L蔗糖溶液悬浮细胞, 超声波破碎细胞, 以700 g转速离心10 min, 取上清液测定其 $\alpha$ 1,2-FT活性。对照组COS-7细胞只转染空载体。

**1.2.5  $\alpha$ 1,2-FT活性的测定** 以寡糖苯- $\beta$ -D-半乳糖为底物, 分别以转染有pcDNA3.1、pcDNA3.1-MFUT-I、pcDNA3.1-MFUT-II或pcDNA3.1-MFUT-III的COS-7细胞匀浆上清液作为酶源。反应体系中包括: 0.38 mmol/L底物、20 mmol/L MnCl<sub>2</sub>、1% Triton X-100、50 mmol/L 甲次膦酸盐-盐酸缓冲液(pH 5.8)、0.37  $\mu$ mol/L GDP-[<sup>14</sup>C]岩藻糖(270.0 mCi/mmol NEN, 美国)及酶(0.4 mg), 总体积为100  $\mu$ l, 混合液在37  $^{\circ}$ C下温育1 h后, 用300  $\mu$ l氯仿/甲醇(2:1)终止反应, 混匀, 2000 r/min离心2 min, 去出上方水溶液, 下层干燥后进行薄层层析(CD TLC板, Merck公司, 德国)分析, 展开溶剂为乙醇:吡啶:1-butanol:水:乙酸(100:10:10:30:3)。利用影像分析仪(BAS2000, Fuji Film 东京)和液体闪烁计数器(Tri-Carb1500, Packard)测定反应产物的放射活性。

**1.2.6 小鼠 $\alpha$ 1,2-FT探针的制备** 利用PCR方法

Table 1 PCR primers used for cloning of murine  $\alpha$ 1,2-FT gene

Gene	Primer name	Primers	GenBank No.
MFUT-I	MFUT-I-U	5'-ATA GCT ATG TGG ACT CCC AGC CG-3'	Y09883
	MFUT-I-L	5'-AGT CAG ACC AAT CTA AAA AGA CTG-3'	
MFUT-II	MFUT-II-U	5'-GCT AAG TTA AAT CCA GCA GCC ATG-3'	AB006138
	MFUT-II-L	5'-AGG CTG GTG TTA GTG CTT AAG GAG-3'	
MFUT-III	MFUT-III-U	5'-TGC CAT GCC TTC TGA CTC CTG-3'	Y09882
	MFUT-III-L	5'-AGC ATG TGC ACT ACA GCA AGG-3'	

制备3种 $\alpha 1,2$ -FT基因特异性探针,具体方法如下:分别采用下列引物进行PCR扩增,引物PROBE-I-U 5'-ACT TAG CTG GTG GAG AC-3', PROBE-I-L 5'-AAG GCA GCC TCA GGC CT-3'制备探针PROBE-I,用于基因MFUT-I检测;PROBE-II-U 5'-TAC CTC ACG GGT GGG GA-3', PROBE-II-L 5'-GGT AAG CTG CTT CTG GC-3'制备探针PROBE-II,用于基因MFUT-II检测;PROBE-III-U 5'-CCT GGC AGG TGG TGA TA-3', PROBE-III-L 5'-GCT GGC TTA AAG ATT TTG A-3'制备探针PROBE-III,用于基因MFUT-III检测。20  $\mu$ l PCR反应体系,其中包括0.5 u *Taq*聚合酶(AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>, Applied Biosystems, 美国), 50 ng含有相关基因片段的质粒DNA模板, 4 mmol/L dATP, dTTP, dGTP各1  $\mu$ l及150  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP(NEN, 美国), 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C变性9 min, 进入循环, 94  $^{\circ}$ C 40 s, 60  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s, 25个循环, 反应产物利用探针精致试管(ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro Columns, Pharmacia, 美国)进行纯化。

**1.2.7 Northern 杂交分析** 采用AGPC法从组织中提取总RNA, 将其在甲醛-琼脂糖凝胶(1.2%)上进行电泳分离, 然后再转移到尼龙膜Hybond-N+(Amersham, 美国)上。尼龙膜在65  $^{\circ}$ C, 预杂交液中(6 $\times$ SSC、5 $\times$ Denhart溶液、0.1% SDS和100  $\mu$ l/ml变性鲑鱼精子DNA)处理4 h。然后分别应用前面制备的<sup>32</sup>P标记的特异性探针进行杂交, 在65  $^{\circ}$ C反应15 h之后, 将尼龙膜在1 $\times$ SSC、0.1% SDS中, 室温下漂洗2次, 在0.2 $\times$ SSC、0.1% SDS中65  $^{\circ}$ C下漂洗3次。最后, 用放射影像分析仪(BAS2000, Fuji Film, 日本)进行分析。

**1.2.8 Southern 杂交分析** 采用SDS方法从小鼠脑组织中提取DNA, 利用*Hind*III、*Sac*I、*Pst*I及*Eco*RV等内切酶进行消化。将其在1%琼脂糖凝胶上电泳分离, 然后再转移到尼龙膜上。应用前面制备的<sup>32</sup>P标记的特异性探针进行杂交。

## 2 结果

### 2.1 3种基因MFUT-I、MFUT-II和MFUT-III的克隆及比较

利用PCR方法克隆了3种 $\alpha 1,2$ -FT基因编码区。这3种基因序列具有明显的相似性(表2), 3种基因编码的蛋白质分别为: MFUT-I, 337个氨基酸, 估计分子量为42.39 kDa(基因库注册号为AF113533);

**Table 2 Comparison of deduced amino acid among three murine  $\alpha 1,2$ -FT**

	$M_r$	% Homology based on		
		MFUT-I	MFUT-II	MFUT-III
MFUT-I (377 aa)	42 392	100%		
MFUT-II (347 aa)	39 214	65% (197/299)	100%	
MFUT-III (368 aa)	41 436	58% (177/301)	75% (252/333)	100%

**Table 3 Comparison of the deduced amino acids of the murine  $\alpha 1,2$ -FT with other cloned  $\alpha 1,2$ -FT**

$\alpha 1,2$ -FT	% Homology based on		
	MFUT-I	MFUT-II	MFUT-III
Rat FTA	93 % (350/376)	65 % (195/298)	59 % (178/299)
Rat FTB	63 % (204/319)	89 % (317/354)	75 % (258/340)
Rat FTC	62% (173/277)	86 % (238/275)	92 % (278/299)
Human H	77 % (284/367)	65 % (195/296)	58% (174/300)
Human Se	68 % (202/296)	79 % (275/347)	73 % (243/331)
Human Sec1	60 % (94/157)	64 % (139/216)	75 % (167/223)
Orangutan FT1	77 % (274/354)	65 % (193/296)	57 % (173/300)
Orangutan FT2	68 % (202/296)	79 % (277/347)	72 % (241/331)
Rabbit FT-I	76% (284/370)	67 % (194/287)	59 % (188/314)
Rabbit FT-II	68 % (191/279)	72 % (238/328)	78 % (268/343)
Rabbit FT-III	68 % (204/300)	77 % (270/347)	74 % (245/328)
Cow FT1	75 % (273/362)	67 % (202/299)	61 % (181/294)
Cow FT2	67 % (199/296)	77 % (270/348)	72 % (232/320)
Cow FT3	65 % (181/278)	78 % (217/276)	75 % (255/336)
Pig FT1	73 % (268/367)	66 % (196/296)	62 % (178 /286)
Pig FT2	65 % (203/309)	79% (275/347)	72% (237/326)

MFUT-II, 347个氨基酸, 估计分子量为39.21 kDa(基因库注册号为AF064792); MFUT-III, 368个氨基酸, 估计分子量为41.46 kDa(基因库注册号为AF113532)。它们的氨基酸序列均包含有一种处于N末端区的跨膜片段及3或4个潜在的N-连接糖基化位点。结果表明MFUT-I、MFUT-II和MFUT-III与其他已报道糖基转移酶相似, 属于2型跨膜蛋白。将3种 $\alpha 1,2$ -FT氨基酸序列与人类、鼠和兔等的相应序列进比较, 可发现这些 $\alpha 1,2$ -FT序列在不同的物种中具有较好的保守性, 特别是与大鼠间的同源性高达89%~93%, 而且在前面提到的跨膜区和N-糖基化位点上也具有相似性<sup>[7]</sup>。将鼠和人 $\alpha 1,2$ -FT的氨基酸序列进行比较可知: MFUT-I、MFUT-II和MFUT-III分别与人类H基因、Se基因和Sec1基因对应(表3)。

### 2.2 MFUT-I、MFUT-II和MFUT-III在COS-7细胞中的表达

以苯- $\beta$ -D-半乳糖为基质, 分别对转染pcDNA3.1-MFUT-I、pcDNA3.1-MFUT-II或pcDNA3.1-MFUT-III的COS-7细胞的溶胞产物, 进行岩藻糖转移酶活性分析。结果显示转染pcDNA3.1-MFUT-I和

pcDNA3.1-MFUT-II 细胞制备的  $\alpha 1,2$ -FT 能催化 GDP-[ $^{14}\text{C}$ ]岩藻糖, 使之整合入底物苯- $\beta$ -D-半乳糖中, 而转染有 pcDNA3.1-MFUT-III 和载体 pcDNA3.1 细胞制备的  $\alpha 1,2$ -FT 则无此作用<sup>[8]</sup>, 表明 MFUT-I 和 MFUT-II 基因编码的蛋白质具有  $\alpha 1,2$ -FT 活性, 而 MFUT-III 基因编码的蛋白质无此种活性。MFUT-I 酶和 MFUT-II 酶对苯- $\beta$ -D-半乳糖的  $K_m$  值分别为 28.85 mmol/L 和 54.73 mmol/L。

### 2.3 $\alpha 1,2$ -FT 基因在组织中的表达

应用 Northern 印迹杂交法检测 3 种  $\alpha 1,2$ -FT 基因在成年小鼠组织中的表达。MFUT-I 和 MFUT-III 主要分别在附睾和睾丸中表达。MFUT-II 的 3.5 kb 转录产物在多种组织中表达, 包括: 心、肝、肾、睾丸、附睾、子宫、胃、小肠、盲肠和结肠, 其中在肠道中同时表达 1.6 kb 和 7.4 kb 转录产物。

### 2.4 3 种基因的 Southern 杂交分析

分别利用 3 种  $\alpha 1,2$ -FT 基因的探针 PROBE-I, PROBE-II 或 PROBE-III 进行 Southern 杂交分析, 结果如图 1 所示, 3 种探针杂交后的杂交带高度明显不同。MFUT-I 基因功能部位虽然不存在 *Hind*III 或 *Sac*I 的酶切位点, 可是 *Hind*III 或 *Sac*I 酶切处理后基因组 DNA 与探针 PROBE-I 杂交时均形成 2 个杂交斑。MFUT-III 基因功能部位也不存在 *Sac*I 的酶切位点, 可是 *Sac*I 酶切处理后基因组 DNA 与探针 PROBE-III 杂交时也形成 2 个杂交斑, 推论基因 MFUT-I 及 MFUT-III 可能存在 2 个拷贝。MFUT-II 基因组 DNA 用 *Hind*III、*Sac*I、*Pas*I 或 *Eco*RV 这 4 种酶处理后, 与探针 PROBE-II 杂交仅仅形成 1 个杂交斑, 推论基因 MFUT-II 可能仅存在 1 个拷贝。

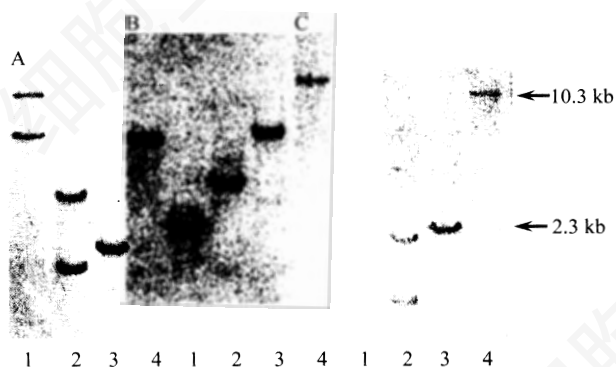


Fig. 1 Southern blot analysis with mouse MFUT-I, MFUT-II and MFUT-III probes

Mouse genomic DNA was cut by *Hind*III (lane 1), *Sac*I (lane 2), *Pas*I (lane 3) and *Eco*RV (lane 4) and hybridized with three probe of  $\alpha 1,2$ -FT gene, respectively. A: PROBE-I; B: PROBE-II; C: PROBE-III.

## 3 讨论

本研究中, 我们克隆并鉴定了 ICR 小鼠 3 种  $\alpha 1,2$ -FT 基因。结果证明小鼠  $\alpha 1,2$ -FT 与其他糖基化转移酶家族一样也是由多基因编码, 具有底物的相似性及底物特异性。已知人  $\alpha 1,2$ -FT 的同工酶是由两种密切相关的基因编码, 它们分别对应于 H 血型位点(FUT1)和分泌型(Se)血型位点(FUT2)<sup>[3,4]</sup>, 现已从大鼠(RFTA), 兔(RFT-I)和小鼠(FUT1)中分离出人 H 基因的类似物。它们的氨基酸序列和生化性质具有相似性<sup>[9-11]</sup>。在本文报道的 3 种基因中, MFUT-I 与人 H 基因 FUT1、大鼠 RFTA 和兔 RFT-I 基因序列同源性分别为 77%、93% 和 76%, 表明 MFUT-I 是人 H 基因的类似物。MFUT-I(GenBank 登记号 AF113533)与鼠 FUT1(GenBank 登记号 U90553)的同源性为 98.9%, 而与 GenBank 登记号为 Y09883 的片段完全相同。MFUT-I 与鼠 FUT1 序列的差异性可能是由于基因突变或用于基因克隆的 cDNA 的不同造成的<sup>[11]</sup>; 同时还可能因为 MFUT-I 存在 2 个拷贝, 本研究 Southern 杂交分析结果已经得到证实。另一方面, MFUT-II 和 MFUT-III 分别是人 Se 基因和 Sec1 基因的类似物。其相关基因也已从大鼠(RFTB 和 RFTC)、兔(RFT-II 和 RFT-III)中获得<sup>[9,10,12]</sup>。MFUT-II 的氨基酸序列与人 Se、兔 RFT-III 和大鼠 RFTB 的同一性分别为 79%、77% 和 89%。这种蛋白质序列的排列着重突出在几处高同源序列, 尤其是从 64 位亮氨酸到 347 位组氨酸的催化控制区。这表明由 Se 基因编码的蛋白质在动物物种中具有较好的保守性, 由 H 基因编码的蛋白质也具有相似的保守性。与它们的保守蛋白质序列相反, 这些基因的组织表达在动物物种中明显不同。在人类, H 基因转录产物主要在中胚叶组织中表达, 在红细胞系及血型抗原合成过程中尤为明显, 而兔和小鼠则分别在神经组织和附睾中优先表达。兔的 H 基因编码的  $\alpha 1,2$ -FT 所合成的 H 抗原分布在局限性区域, 比如: 有髓纤维中的轴突和髓鞘, 以及腹侧角的大神经元。它们的表达在轴突延长和髓鞘形成过程中受发育性调控。我们利用 TLC 免疫染色法, 曾经观察到鼠的附睾中存在 H 基因转录产物的发育性调控, 在附睾的生精细胞成熟过程中就存在这一调控过程。与 H 基因转录产物在不同动物物种中的组织表达存在明显差异相反, Se 基因转录产物在人、兔、小鼠和大鼠的消化道中普遍表达, 但 Se 基因转录产物在小鼠小肠中的表达与微生物和宿主在断奶期的相互

作用有关, 这表明 Se 基因在小鼠消化道限制性区域中的转录受后生性调控<sup>[7]</sup>。Se 基因转录产物诱导产生的糖结合物负责形成血型 H、Le<sup>b</sup> 或 Le<sup>x</sup> 的抗原性, 而且可能诱导有效的上皮功能。

与人 Sec1 基因编码的蛋白质相似, 小鼠 MFUT-III 基因编码的蛋白质也不具有  $\alpha$ 1,2-FT 的活性。在人类 Sec1 基因是由于转录过程中出现移码而使终止密码中断, 最终导致蛋白质失去活性。小鼠的 Sec1 基因 MFUT-III 主要在特定组织附睾中存在表达, 但是我们实验中其酶却无活性, 其原因可能有二, ①由于基因 MFUT-III 的变异, 导致蛋白质无活性; ②可能存在两种 MFUT-III 基因, 其中一种无酶活性。因为我们利用 Southern 印迹杂交分析证实 MFUT-III 基因存在两个拷贝, 但是目前为止尚无第 2 种 MFUT-III 基因的报道。其次, 我们还证实: 无论 MFUT-I 还是 MFUT-II 基因剔除, 在小鼠附睾中都可检测  $\alpha$ 1,2-FT 活性的存在<sup>[13]</sup>, 这说明或者附睾中存在第 2 种 MFUT-III 基因表达, 或者附睾中同时存在 MFUT-I 和 MFUT-II 的少量表达。

$\alpha$ 1,2-FT 是负责对糖链进行末端修饰的酶, 可以决定组织和细胞的抗原性, 在多种生物事件中这种酶的编码基因的表达必须接受弹性调控, 我们以往的结果证明服用了微生物的无菌小鼠十二指肠和空肠上皮中岩藻糖基化糖脂因  $\alpha$ 1,2-FT 基因表达及酶活性的改变而变化<sup>[11]</sup>。通过克隆这 3 种  $\alpha$ 1,2-FT 基因获得的信息为描述  $\alpha$ 1,2-FT 家族转录调控的特征提供了途径。

### 参考文献 (References)

- [1] Yazawa S *et al.* *Glycobiology*, 2002, **12**: 545
- [2] Bry L *et al.* *Science*, 1996, **273**: 1380
- [3] Larsen RD *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 6674
- [4] Koda Y *et al.* *Eur J Biochem*, 1997, **246**: 750
- [5] Kelly R.J *et al.* *J Biol Chem*, 1995, **270**: 4640
- [6] Chomczynski P *et al.* *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156
- [7] Lin B *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1487**: 275
- [8] Lin B *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 2001, **388**: 207
- [9] Bureau V *et al.* *Eur J Biochem*, 2001, **268**: 1006
- [10] Hitoshi S *et al.* *J Biol Chem*, 1995, **270**: 8844
- [11] Domino SE *et al.* *Biochem J*, 1997, **327**: 105
- [12] Hitoshi S *et al.* *J Biol Chem*, 1996, **271**: 16975
- [13] Iwamori M *et al.* *Biochem J*, 2004, **380**: 75

## Comparison of the Three Murine GDP-fucose: $\beta$ -galactoside $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase MFUT-I, MFUT-II and MFUT-III

Bei Lin\*, Makiko Saito<sup>1</sup>, Masao Iwamori<sup>2</sup>

(Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China;

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-0003, Japan;

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan )

**Abstract** Three members of a GDP-fucose:  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase ( $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase,  $\alpha$ 1,2-FT), MFUT-I, MFUT-II, and MFUT-III, from a cDNA of murine small intestine, were cloned by RT-PCR. MFUT-I, MFUT-II, and MFUT-III exhibited sequence homology together and with the human H (78.4%), Se (79.0%), and Sec1 (74.9%) gene products, respectively. The open reading frames were ligated into mammalian expression vector pcDNA 3.1 (pcDNA3.1-MFUT-I, pcDNA3.1-MFUT-II, pcDNA3.1-MFUT-III,) and then transiently transfected into COS-7 cells using a Cellfect transfection kit and the cells was used for determination of  $\alpha$ 1,2-FT. COS-7 cells transfected with MFUT-I and MFUT-II exhibited  $\alpha$ 1,2-FT activity, but no activity was detected in COS-7 cells with MFUT-III. The expression of three gene in murine tissues were analyzed by Northern blotting. MFUT-II yielded a 3.5 kb mRNA transcript in several tissues, whereas MFUT-I and MFUT-III were predominantly expressed in epididymis and testis, respectively. Southern blot analysis showed that MFUT-II was present in the mouse genome as a single-copy gene but MFUT-I and MFUT-III were present as tow-copy gene. Our results suggest that MFUT-I, MFUT-II and MFUT-III correspond to the human H, Se and Sec1 genes, respectively.

**Key words** mouse;  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase; gene; clone; expression

Received: December 10, 2004 Accepted: April 13, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-24-83956387, Fax: 86-24-83956787, E-mail: linbei88@hotmail.com