

人胎肝唾液酸转移酶基因的克隆及测序*

尚 杰 邱若仑 金 斌** 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 根据已克隆的唾液酸转移酶的保守区的序列,以人胎肝 mRNA 为模板扩增出 150bp 的片段并测序。其中一个片段(s38)与已克隆的唾液酸转移酶的活性中心有 57%~97% 的同源性。根据 s38 的序列合成寡核苷酸并标记后用作探针筛选人胎肝 cDNA 文库。从文库中分离了一个编码 $\alpha 2, 3$ -唾液酸转移酶的 cDNA。该 cDNA 序列含一个编码 340 个氨基酸的开放读框,推导的氨基酸序列与人颌下腺 Gal $\beta 1, 3$ GalNAc $\alpha 2, 3$ -唾液酸转移酶相同,与猪颌下腺 $\alpha 2, 3$ -唾液酸转移酶有 83.2% 的同源性。表明从人胎肝 cDNA 文库中分离的 cDNA 所编码的蛋白为 Gal $\beta 1, 3$ GalNAc $\alpha 2, 3$ -唾液酸转移酶。

关键词 唾液酸转移酶,人胎肝,cDNA

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0277-80

唾液酸在诸如细胞-细胞识别、细胞-基质相互作用、粘附、血液循环中血清糖蛋白的维持及蛋白趋靶等多种生命过程中担负着重要作用。在发育、分化和癌基因转化过程中细胞表面唾液酸水平以调控的方式变化^[1]。但对细胞表面唾液酸水平是如何调控而导致多种细胞过程的目前仍知之甚少,对唾液酸转移酶的研究是了解糖缀合物唾液酸化的调控机制的关键。

唾液酸转移酶家族催化将唾液酸从 CMP-唾液酸上转移到糖链末端,根据已知唾液酸化寡糖结构推测至少存在 12 种不同的唾液酸转移酶^[2]。目前已从不同动物及组织中克隆了 13 种唾液酸转移酶基因,已克隆酶的一级序列在催化区中部均有 1 个由 55 个氨基酸构成的保守区“sialyl motif”,这些酶均有严格的底物专一性^[1,3]。

为研究人胎肝唾液酸化糖缀合物的生物合成机制及了解它们在胚胎时期及疾病过程中生物学作用,我们试图用已克隆的唾液酸转移酶基因的序列信息分离人胎肝唾液酸转移酶 cDNA。本文首次报道从人胎肝 cDNA 文库中克隆了一个编码唾液酸转移酶的 cDNA。

1 材料和方法

1.1 材料

人胎肝 mRNA 及 cDNA 文库购自 CLONTECH Laboratories, Inc.。

1.2 引物合成

根据已克隆的 10 种唾液酸转移酶的“Sialyl motif”编码区序列比较^[3-12],设计了一对

* 中国科学院院长基金特别资助项目(No. 5980601)。

** 通讯作者。

收稿日期:1998-07-06,修回日期:1999-04-30。

PCR 兼并引物, *Bam*H I 和 *Hind*III 位点被分别引入引物的 5'-端以进行克隆测序。

Primer 1; 5'-TTGGATCC TGCCG(CG)CGCTG(CT)(AG)(CG)(CT)(GCTA)(GA)T(CG)GT-3'
*Bam*H I

Primer 2; 5'-AT AAGCTT(GT)GT(GCTA)GT(CT)(TC)(TG)G(CG)(TAG)(GC)CC(CA)AC-3'
*Hind*III

1.3 RT-PCR

以人胎肝 mRNA 为模板, 用 Promega 公司的反转录试剂盒转录 cDNA 第一链, 以 mRNA-cDNA 为模板进行 PCR 扩增(94℃ :1 min, 37℃ :2 min, 72℃ :1 min; 30 cycles)。扩增片段(150bp)以 *Bam*H I /*Hind*III 消化后克隆于 pUC19, 然后测序。

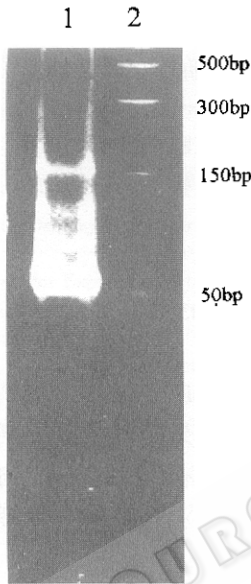


图 1 PCR 产物的 12% 琼脂糖电泳
Fig.1 PCR products on 12% agarose gel
1. PCR product; 2. PCR Marker

1.4 人胎肝 cDNA 文库的筛选

根据克隆的保守序列合成寡核苷酸, 经 [γ -³²P]ATP 标记后作探针。按 Clontech 的手册在尼龙膜筛选约 10⁶ 噬菌斑的人胎肝 cDNA λ DR2 文库。筛选出一个阳性单克隆噬菌斑。

2 结果与讨论

2.1 探针的获得及测序

根据 10 种已克隆的唾液酸转移酶的保守序列设计兼并引物^[3-12]以克隆人胎肝唾液酸转移酶基因。将 PCR 扩增片段(150bp)(图 1)克隆到 pUC19 中并测序。如图 2 所示, 其中一个 PCR 扩增片段 s38 经联网检索证明为一个唾液酸转移酶“sialyl motif”编码序列, 检索结果见表 1。检索结果表明 s38 与 17 个已从人及其他动物中克隆的唾液酸转移酶 cDNA 有 57%~97% 的同源性。

2.2 文库的筛选及克隆的测序

根据 s38 的序列合成一 25 个碱基的寡核苷酸(5'-AGATAGACAGTCAC-GACTTTGTCCT-3'), 经 [γ -³²P]ATP 标记后作为探针, 用于筛选人胎肝 λ DR2 噬菌体

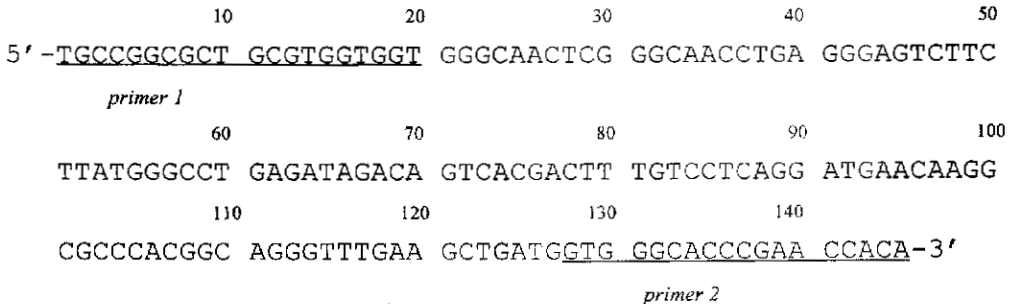


图 2 PCR 产物 s38 的核苷酸序列
Fig.2 Nucleotide sequence of s38 from PCR amplification

cDNA文库。从文库中筛选到含一个 2.4kb cDNA 的阳性克隆。分离到的 cDNA 克隆含一个开放读框,编码一个由 340 个氨基酸组成的蛋白,由 cDNA 编码区推导的氨基酸序列与人颌下腺 CMP-NeuAc:Gal β 1,3GalNAc α -2,3-唾液酸转移酶相同;对 cDNA 序列的比较表明,在编码区内仅有一个碱基不同:编码 Ser₂₇₃的密码子第三位碱基在人胎肝 cDNA 中为 A,在人颌下腺 cDNA 中为 G;而在 5'-非编码区内人颌下腺 cDNA 多 203 个碱基,提示该基因的转录调控在胎肝和颌下腺中是不同的。另外,我们分离的 cDNA 与猪颌下腺 α -2,3-唾液酸转移酶的基因编码区同源性达 81%、氨基酸序列同源性达 83.2%^[4,5]。这些结果表明我们克隆的是 CMP-NeuAc:Gal β 1,3GalNAc α -2,3-唾液酸转移酶基因。

表 1 s38 序列的联网检索结果

Table 1 Blast search of s38 in GeneBank

Gene	Enzyme	Identities	Homology/(%)
gb L13972 HUMAIAT	<i>Homo sapiens</i> α 2,3-sialyltransferase, SAT4A	129/132	97
gb L29555 HUMSIATA	Human (clone hST30-1) sialyltransferase	128/132	96
gb M97753 PIGSLTFA	<i>Sus scrofa</i> α 2,3-sialyltransferase	112/132	84
emb X73523 MMGAL	<i>M. musculus</i> α 2,3-sialyltransferase	110/141	78
emb X96667 HSST30II	<i>H. sapiens</i> α 2,3-sialyltransferase	97/131	74
gb U63090 HSU63090	Human α 2,3-sialyltransferase	97/131	74
emb X76988 RNGALNACS	<i>R. norvegicus</i> α 2,3-sialyltransferase	96/131	73
emb X76989 MMGALNACS	<i>M. musculus</i> α 2,3-sialyltransferase	94/131	71
emb X77775 GGGALB	<i>G. gallus</i> α 2,6-sialyltransferase	83/132	62
gb L29556 HUMSIATB	Human (clone hSTX) sialyltransferase	73/123	59
gb U82762 HSU82762	Human sialyltransferase X (STX)	72/123	58
gb U33551 HSU33551	Human sialyltransferase (STX)	72/123	58
emb X83562 MMNGA28ST	<i>M. musculus</i> α 2,8-sialyltransferase	56/88	63
gb L13445 RATSIALYLA	Rat sialyltransferase	55/88	62
gb U14550 HSU14550	Human sialyltransferase SThM (sthm)	55/89	61
emb X99651 MMPSASX4	<i>M. musculus</i> polysialic acid synthase	48/74	64
emb X98014 MMA28ST	<i>M. musculus</i> α 2,8-sialyltransferase	62/107	57

催化唾液酸以 α 2,3 连接到 Gal β 1,3(4)GlcNAc/Gal β 1-3GalNAc 的唾液酸转移酶有 4 种,分别被分为 ST3Gal I、II、III 和 IV,它们具有不同的组织特异性并分别以糖蛋白和糖脂上的糖链作为受体^[1]。人颌下腺 α -2,3-唾液酸转移酶属 ST3Gal I。ST3Gal I 在颌下腺高度表达,在肾、脾、肝中等水平,脑中非常低,考虑到酶学特性和这些酶的组织分布,推测 ST3Gal I 主要涉及糖蛋白的 O-连接寡糖的生物合成^[1]。但这并非最后定论,因为目前的底物特异性研究均是体外实验结论。事实上已发现糖基转移酶在体内显示出与体外实验不一的底物专一性。Kannagi 等报道 ST3Gal I 对 Gal β 1,3GlcNAc 也有 α 2,3-唾液酸转移酶活性,形成 SLe^a 前体 (NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc)。他们也指出,与正常细胞相比,在结肠癌组织中 ST3Gal I 转录物的表达增高,表明 ST3Gal I 与 SLe^a 抗原在结肠癌组织中的表达升高有关^[15]。

目前还不清楚我们分离的 cDNA 所编码的酶是合成 O-糖链,还是合成糖蛋白和糖脂的糖链,以及该酶在不同的组织中是否有不同的底物专一性。对这些问题的回答将有助于揭示唾液酸转移酶基因表达调控及其在正常生理条件和疾病过程中的作用。目前我们

正进行人胎肝 α -2, 3-唾液酸转移酶基因的表达研究。

参 考 文 献

- [1] S. Tsuji. *J. Biochem.*, 1996, **120**:1~13.
- [2] P. Broquet, H. Baubiochon-Cortay, P. George *et al.* *Int. J. Biochem.*, 1991, **23**:385~389.
- [3] B. D. Livingston, J. C. Paulson. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**:11504~11507.
- [4] W. Gillespie, S. Kelm, J. C. Paulson. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**:21004~21010.
- [5] Y. C. Lee, N. Kurosawa, T. Hamamoto *et al.* *Eur. J. Biochem.*, 1993, **216**:377~385.
- [6] Y. C. Lee, N. Kojima, E. Wada *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**:10028~10033.
- [7] H. Kitagawa, J. C. Paulson. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **194**:375~382.
- [8] H. Kitagawa, J. C. Paulson. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**:1394~1401.
- [9] U. Grundmann, C. Nerlich, T. Rein *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**:667.
- [10] J. Weinstein, E. U. Lee, K. McEntee *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**:17735~17743.
- [11] N. Kurosawa, M. Kawasaki, T. Hamamoto *et al.* *Eur. J. Biochem.*, 1994, **219**:375~381.
- [12] D. X. Wen, B. D. Livingston, K. F. Medzihradzsky *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**:21011~21019.
- [13] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, Cold Spring Harbor, NY.
- [14] M-L. Chang, R. L. Eddy, T. B. Shows *et al.* *Glycobiology*, 1995, **5**:319~325.
- [15] R. Kannagi, H. Ito, K. Zenita *et al.* *Glycoconjugate.*, 1995, **12**:534.

Cloning and Sequencing of Sialyltransferase Gene from Human Fetal Liver*

Shang Jie Qiu Ruolun Jin Cheng** Yang Shoujun Zhang Shuzheng

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Based on the sequences of the highly conserved segments in the previously cloned sialyltransferases, 150bp fragments were amplified and sequenced using human fetal liver mRNA as template. One of them (s38) showed 57%~97% identities with the active domains of previously cloned sialyltransferases. Based on the sequence of s38, an oligonucleotide was synthesized and labeled to screen human fetal liver cDNA library. A cDNA encoding α 2, 3-sialyltransferase has been isolated. The cDNA sequence included an open reading frame coding for 340 amino acids, and the deduced amino acid sequence showed 100% identity with that of human submaxillary gland Gal β 1, 3GalNAc α 2, 3-sialyltransferase, 83.2% identity with that of pig submaxillary gland α 2, 3-sialyltransferase. These results suggested the protein encoded by the cDNA from human fetal liver cDNA library was a Gal β 1, 3GalNAc α 2, 3-sialyltransferase.

Key words Sialyltransferase, human fetal liver, cDNA

* Supported by Special-aid of President-Fundation of Chinese Academy of Sciences(No. 5980601).

** To Whom Correspondence Should be Addressed.