

· 基础论著 ·

糖基转移酶C3ORF39的亚细胞内定位及组织分布特征研究

魏红山 李学永 肖凡 郝晓花 黄玉波 杜雅莉

【摘要】 目的 Notch分子是一个高度糖基化修饰的信号分子,但催化其O-葡聚糖中木糖转糖基反应的糖基转移酶至今未能明确。本研究旨在克隆表达人类糖基转移酶61家族中的C3orf39,初步明确其细胞内定位及部分组织分布特征。**方法** 体外克隆表达C3ORF39重组蛋白,免疫新西兰兔制备该重组蛋白的多克隆抗体;采用免疫组织化学方法明确该基因编码的糖基转移酶在部分组织细胞中的分布特征。构建荧光重组蛋白编码质粒,转染HepG2细胞,利用激光共聚焦显微镜观察该糖基转移酶可能的亚细胞定位。**结果** 制备的C3ORF39重组蛋白多克隆抗体具有较高的免疫活性和特异性。免疫组织化学分析显示,该糖基基因主要表达与肝细胞、肠上皮细胞、肾小管上皮细胞和胃腺体上皮细胞;部分表达于淋巴结、脾脏、间质细胞。激光共聚焦观察显示,该糖基转移酶定位于内质网-Golgi体分泌途径上游。**结论** 糖基基因C3orf39定位于分泌途径中的内质网或cis-Golgi体部分,广泛表达与上皮组织和部分间质细胞。

【关键词】 糖基基因; C3ORF39; 糖基转移酶; Notch信号途径; 肝细胞癌

Subcellular location of glycosyltransferase C3ORF39 in HepG2 cells, and distribution in different tissues WEI Hong-shan, LI Xue-yong, XIAO Fan, HAO Xiao-hua, HUANG Yu-bo, DU Ya-ju. *Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China*
Corresponding author: WEI Hong-shan, Email: drwei@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective Notch molecular is a highly glycosylated signal protein, but the glycosyltransferase catalyzing Xylose transferase to O-glycan is remain elucidated. The present study was designed to prepare C3ORF39 recombinant protein and its polyclonal antibody, and to determine its subcellular location and tissue distribution. **Methods** The C3ORF39 recombinant protein was prepared in vitro, and immunized rabbit to prepare polyclonal antibody. The tissue distribution of C3ORF39 was examined in different tissue by immunohistochemistry method. The subcellular location was determined by laser confocal fluorescence microscopy. **Results** The prepared polyclonal antibody showed higher activity and specificity. The immunohistochemical staining demonstrated that C3ORF39 mainly scattered in hepatocytes, intestinal epithelial cells and renal tubular epithelial cells, gastric epithelial cells; moderately expressed in interstitial cells of lymph node and spleen. C3ORF39 was located in endoplasmic reticulum and cis-Golgi complexity of HepG2 cells. **Conclusions** The C3ORF39 was located in proximity of secretory pathway of HepG2 cells, and mainly scattered in epithelial cells and moderately expressed in some interstitial cells.

【Key words】 Glycogene; C3ORF39; Glycosyltransferase; Notch signal pathway; Hepatocellular carcinoma

肝癌是一种高度致死性恶性肿瘤,主要与慢性HBV和HCV感染有关。除早肝癌手术切除外,中晚期肝癌依然缺乏有效治疗措施。其根本原因在于导致肝癌发生的分子生物学机制依然未能明确^[1]。

近期研究揭示,Notch信号途径和TGF- β 信号途径是肝癌增殖信号的主要调控机制^[2]。而且,Notch信号途径的激活与肝癌的发生有关^[3]。Notch信号途径是细胞增殖分化命运的决定者,其活性直接决定细胞的增殖或凋亡以及肿瘤的发生^[3]。与其他信号分子不同,Notch分子具有高度修饰的特征。且与一般糖蛋白不同,Notch分子上的修饰聚糖不仅有N-聚糖,还有复杂的O-岩藻聚糖,O-葡聚糖等罕见聚糖分子^[4]。催化合成这些聚糖分子的糖基转移酶绝

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.04.002

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81071411; 81271901)

作者单位: 100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所; 新发突发传染病研究北京市重点实验室(魏红山、肖凡、郝晓花、黄玉波); 河北省邯郸市中心医院急诊科(李学永); 哈尔滨医科大学第二附属医院消化科(杜雅莉)

通讯作者: 魏红山, Email: drwei@ccmu.edu.cn

大多数已经明确,但催化这些聚糖结构中木糖转移的糖基转移酶至今未能明确。本研究旨在克隆表达人类糖基因中的一个可能的木糖转移酶,推测其可能具有转木糖活性,初步了解其功能分布特征,为其糖基转移酶功能研究奠定基础。

材料与方 法

一、材料

逆转录试剂盒购自TaKaRa公司,鼠抗-His单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉生物公司,化学发光底物购自PIERCE公司,蛋白分析试剂盒为Sigma公司产品,His Trap-FF 5亲和层析柱为美国GE公司产品。*Eco* R I、*Hind* III等限制性内切酶,无DNA酶的RNA酶,购自TaKaRa公司,pGEM-T-EASY, T4 DNA连接酶购自Promega公司,PCR用*Taq*酶购自鼎国生物公司。DL2000 DNA Marker、DL 15000 DNA Marker购自TaKaRa公司。

二、方法

1. 质粒的构建: pET-32a (+) 原核表达质粒, pDsRED-N1和pEGFP-C1真核荧光蛋白表达质粒均为本室保存。*E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21和HepG2细胞系为本室保存。抗原修复液(pH6.0)为福州迈新生物技术公司产品,DAB显色液购自Dako公司, Terberfect转染试剂盒购自Fermentas公司, DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吡啶)核染色剂购自Sigma公司。本研究中所使用的PCR引物及相应的扩增条件如表1所示。寡核苷酸引物合成及测序由北京奥科生物公司完成。

2. 重组蛋白的诱导表达: 酶切、测序鉴定正确的pET-32a (+) -C3orf39原核表达质粒,转化大肠埃希菌BL21,成功诱导条件为37℃, 230~250 r/min振荡至菌浓度为 $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$, IPTG (0.2 mmol/L) 诱导, 30℃诱导1 h。集菌,裂解,收获包涵体,双蒸水洗涤3次,梯度尿素(8~0 mmol/L)透析复性,镍柱纯化,BCA法蛋白浓度测定。SDS-PAGE电泳,Western blot鉴定(抗-His为一抗)。

3. 多克隆抗体制备及鉴定: 体重2 kg的雄性新

西兰兔,免疫前3天耳缘静脉取血分离血清作为阴性对照。初次免疫时,1 mg弗氏佐剂乳化重组蛋白,2周后强化剂量减半。共重复免疫4次后,采集静脉血纯化抗体。SDS-PAGE电泳,行Western blot鉴定;ELISA法测定抗体滴度。

4. 免疫组织化学: 利用制备的多克隆抗体作为一抗,对不同组织切片进行染色。主要操作步骤包括脱蜡,水化,微波抗原修复,分别一抗、二抗孵育,DAB显色,显微镜观察。

5. 激光共聚焦显微镜观察: 将酶切、测序鉴定正确的pEGFP-C1-C3orf39和pDsRED-N1-calreticulin荧光蛋白重组质粒转染HepG2细胞,培养24 h,低温丙酮固定,激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM500,德国)观察。

结 果

一、重组蛋白的纯度和浓度及多克隆抗体活性
pET-32a (+) -C3orf39质粒转化大肠埃希菌后诱导表达蛋白纯化后电泳条带如图1所示,估计纯度在90%以上。纯化后浓度为0.592 mg/L,透析浓缩后浓度为1.463 mg/L。Western blot鉴定正确(图1A~E)。多克隆抗体的纯度及活性。免疫后抗体效价2次测量均值与免疫前2次测量均值比较,结果均大于2.1倍,证明抗-C3orf39多克隆抗体效价>1:1 280 000(表2)。Western blot鉴定显示,所制备抗体具有较高的特异性(图1F、G)。

二、C3orf39蛋白的细胞内定位

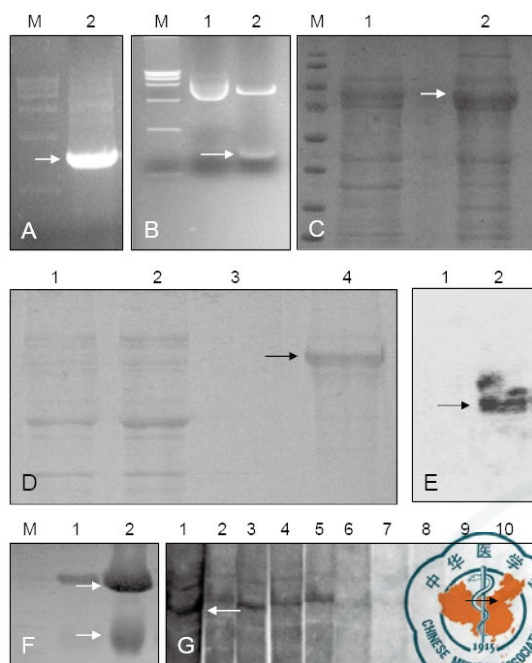
酶切,测序鉴定正确pEGFP-C1-C3orf39, pDsRED-N1-calreticulin真核表达质粒(图2A~D)共转染HepG2细胞,24 h后固定,激光共聚焦观察。结果如图2所示,C3orf39绿色荧光重组蛋白与内质网居民蛋白calreticulin-红色荧光蛋白重组蛋白共定位于内质网,提示C3orf39在细胞内表达于分泌途径。

三、C3orf39蛋白部分组织表达特征

本研究对胃组织、直肠组织、淋巴结、脾脏组织、肝和肾组织该蛋白表达特征进行了免疫组织化学观察。结果显示,该蛋白质淋巴结、脾脏以及直肠黏

表1 本研究中所构建目的质粒所使用的引物及扩增条件

目的质粒	引物	扩增条件
PET-32a (+) -C3orf39	5' -GATATCATGCACCTCTCGGCGGTG-3' 5' -CTCGAGTCGTGTTGCACACAGC-3'	94℃, 30 s; 57℃, 30 s; 72℃, 120 s
pEGFP-C1-C3orf39	5' -AAGCTTCCATGCACCTCTCG-3' 5' -GGATCCTTCGTGTTGCACACC-3'	94℃, 30 s; 53℃, 30 s; 72℃, 90 s
pDsRED-N1-calreticulin	5' -AAGCTTTTCGAGATGCTGCTATCCGTG-3' 5' -GGATCCGGTACCAACAGCTCGTCCTTG-3'	94℃, 30 s; 54℃, 30 s; 72℃, 80 s



注：A：C3orf39基因CDs片段PCR扩增结果（M：marker；1：目的片段）。B：PET-32a（+）-C3orf39原核表达质粒酶切鉴定EcoR I、Hind III双酶切片段PCR产物1%琼脂糖电泳结果（M：marker；1：空质粒；2：目的质粒）。C：C3orf39重组蛋白诱导表达SDS-PAGE电泳结果（M：marker；1：非诱导；2：IPTG诱导后）。D：重组蛋白的纯化结果SDS-PAGE电泳结果（1~3：不同时间段Ni柱清洗液；4：洗脱目的蛋白）。E：目的蛋白的Western blot鉴定（1：BSA对照；2：目的蛋白）。F：纯化后的重组蛋白多克隆抗体（M：marker；1：清洗液；2：洗脱液，白色箭头所示为抗体球蛋白的轻、重链）。G：多克隆抗体活性鉴定Western blot分析（箭头所示为目的蛋白条带）

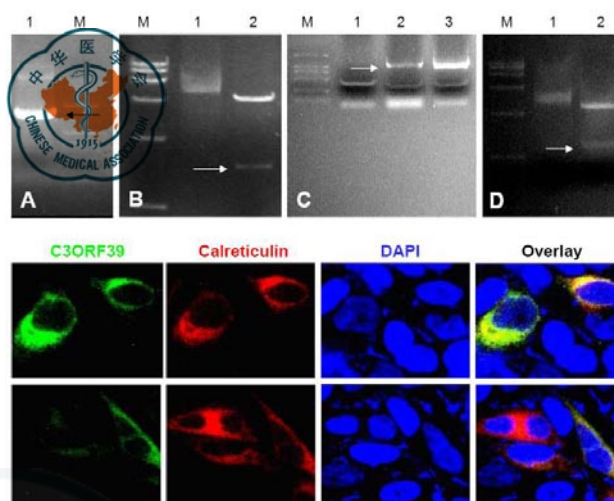
图1 C3orf39重组蛋白的表达及多克隆抗体的制备

膜组织的部分细胞中等强度表达，肾小管上皮和肾小球系膜细胞弱表达；肝实质细胞高表达（图3）。

讨 论

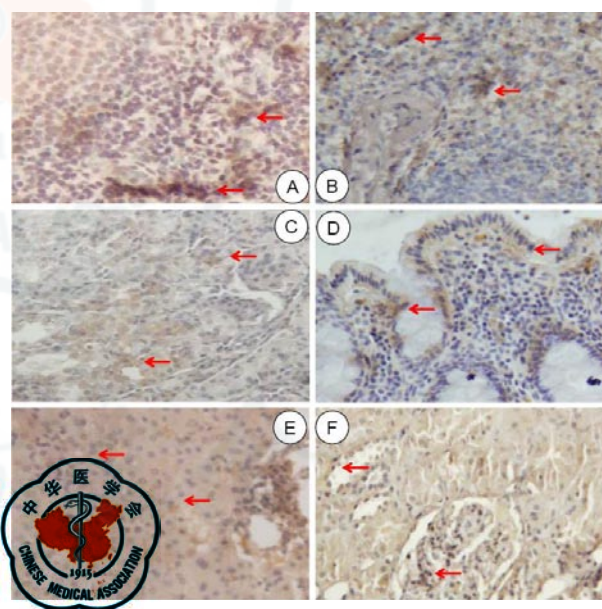
根据目前的观察结果，人类糖基因C3orf39是一个广泛表达的基因，主要表达于部分组织的间质细胞以及上皮细胞，肝细胞高表达。该基因编码糖基转移酶定位于内质网-Golgi体分泌途径上游。

迄今为止，编码与双糖、寡糖以及多糖合成有关的人类糖基因（糖基转移酶基因）约200多个，是人类基因组中仅次于磷酸化基因群的第2大基因群。酶学分类集中于E.C.X.Y.。95%以上的人类糖基因已经克隆表达，其中多数供体底物和受体底物已经明确^[5]。但催化Notch受体上O-葡聚糖中的木糖基转移的 β -1, 2木糖转移酶至今未能阐述。对糖基转移酶数据库复习发现，人类糖基转移酶61家族成员共有两个糖基因（C3orf39和C3orf64）^[6-7]。该家族具有 β -1, 2糖基转移酶催化活性，功能上类似



注：A：C3orf39目的片段的PCR电泳结果（1：目的条带；M：marker）。B：pEGFP-C1-C3orf39质粒的酶切鉴定（M：marker；1：空质粒酶切；2：重组质粒酶切，箭头所示为目的片段）。C：Calreticulin基因CDs扩增PCR结果（M：marker，1~3：不同浓度PCR扩增产物）。D：pDsRED-N1-calreticulin质粒酶切结果（M：Marker；1：空质粒；2：目的质粒，箭头所示为目的片段）。下图显示的激光共聚焦观察结果

图2 C3orf39荧光重组蛋白的细胞内定位



注：箭头所示为阳性表达组织/细胞，C3orf39蛋白呈胞浆模式分布。A：淋巴结，阳性细胞主要见于间质细胞，T细胞区若表达。B：脾脏，高表达与间质细胞，部分T细胞弱表达。C：胃组织，主要见于胃壁腺体细胞高表达，部分基底细胞弱表达。D：直肠上皮，上皮绒毛细胞，黏膜下层间质细胞高表达。E：肝组织，肝实质细胞弱表达。F：肾组织，部分肾小球系膜细胞高表达，小管上皮细胞弱表达

图3 C3orf39在不同组织的表达分布特征

于糖基转移酶90家族成员。糖基转移酶90家族成员催化转糖基反应亦为翻转型，供体底物为UDP-Xylose。受体底物为甘露糖，葡萄糖，以及半乳糖聚糖残基^[8-10]。生物信息学资料提示，C3orf39和

表2 重组蛋白免疫前后兔血清ELISA效价比较

免疫时间	抗体滴度					
	阴性对照	1 : 5000	1 : 20000	1 : 80000	1 : 320000	1 : 1280000
免疫前	0.233	0.078	0.078	0.064	0.043	0.011
第4周	0.031	0.348	0.088	0.068	0.025	0.003
第8周	0.233	0.712	0.676	0.476	0.239	0.093

C3orf64可能具有新的木糖基转移酶,可能与Notch分子的O-糖基化修饰有关,而Notch分子的罕见修饰聚糖则是决定Notch分子信号转导的关键影响因素,如淋巴细胞的成熟和分化,免疫器官的发育等^[11,13]。C3orf64糖基因也已经克隆表达,另有文献报道。

人类已知与蛋白聚糖合成有关的木糖转移酶 I 和 II (EC 2.4.2.26) 催化UDP-木糖中的木糖转移至蛋白聚糖中核心蛋白的丝氨酸残基上^[14]。而Notch分子中的木糖位于O-葡聚糖分子(Xylβ1-2Xylβ1-2Glc-Ser)中,该糖苷键结构域蛋白聚糖的结构显然不同^[15]。本研究初步表达了人类糖基因C3orf39,并制备了其多克隆抗体。结果提示,该基因编码的糖基转移酶可能定位于内质网或cis-Golgi体,该分子与Notch分子之间的相互作用待进一步探讨。

参 考 文 献

- Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer*,2013,13(2):123-135.
- Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*,2009,49(1):318-329.
- Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P, et al. Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*,2013,144(7):1530-1542.
- Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol*,2004,14(5):320-328.
- Stanley P. Regulation of Notch signaling by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*,2007,17(5):530-535.
- Singh S, Phillips GN Jr, Thorson JS. The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation. *Nat Prod Rep*,2012,29(10):1201-1237.
- Lafite P, Daniellou R. Rare and unusual glycosylation of peptides and proteins. *Nat Prod Rep*,2012,29(7):729-738.
- Banerjee DK. N-glycans in cell survival and death: cross-talk between glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta*,2012,1820(9):1338-1346.
- Luzhetskyy A, Méndez C, Salas JA, et al. Glycosyltransferases, important tools for drug design. *Curr Top Med Chem*,2008,8(8):680-709.
- Wilson IB. The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cell Mol Life Sci*,2004,61(7-8):794-809.
- Luther KB, Haltiwanger RS. Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *Int J Biochem Cell Biol*,2009,41(5):1011-1124.
- Stanley P, Guidos CJ. Regulation of Notch signaling during T- and B-cell development by O-fucose glycans. *Immunol Rev*,2009,230(1):201-215.
- Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, et al. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol*,2010,28:343-365.
- Götting C, Kuhn J, Kleesiek K. Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci*,2007,64(12):1498-1517.
- Jafar-Nejad H, Leonardi J, Fernandez-Valdivia R. Role of glycans and glycosyltransferases in the regulation of Notch signaling. *Glycobiology*,2010,20(8):931-949.

(收稿日期: 2013-03-27)

(本文编辑: 孙荣华)

魏红山, 李学永, 肖凡, 等. 糖基转移酶C3ORF39的亚细胞内定位及组织分布特征研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(4): 487-490.