



论文

糖类相关基因芯片的设计与制备

陈闻天[†], 刘晨[†], 于汉杰, 颜桦, 王岸潇, 陈超, 李铮*

西北大学生命科学学院, 国家微检测系统工程技术中心, 西安 710069

[†]同等贡献作者

*通讯作者, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

收稿日期: 2009-12-25; 接受日期: 2010-01-15

摘要 随着糖组学的发展, 研究表明某些疾病如肿瘤等的发生伴随着体内糖蛋白表面糖链结构的变化, 而糖链结构的形成与修饰经过糖基转移酶、糖苷酶和磺基转移酶的参与. 本研究从 Genebank 等数据库中选取人类糖基转移酶基因 127 条、糖苷酶基因 34 条和磺基转移酶 34 条以及管家基因 10 条. 通过对每个基因的 mRNA 序列进行探针设计, 制备出一款糖类相关基因芯片, 用于研究糖类相关基因的表达谱, 旨在揭示疾病发生与糖类相关基因表达变化的关联性. 制备的芯片应用于人肝癌细胞系 SMMC-7721 与正常肝细胞系 Chang's liver 的研究, 筛选出差异常表达的基因 34 个, 其中上调基因 19 个、下调基因 15 个. 通过对 2 个上调基因和 2 个下调基因进行 Realtime-PCR 验证, 得到了一致的实验结果.

关键词基因芯片
糖基转移酶
糖苷酶
磺基转移酶
SMMC-7721 肝癌细胞系
Chang's liver 肝细胞系

1 引言

糖链主要分布于细胞膜表面和细胞分泌的蛋白质表面上. 糖链的作用不仅可通过糖基化改变影响蛋白质功能, 还通过与糖结合蛋白的相互作用调控细胞识别、信号传递、以及细胞生长、分化和凋亡等生物学行为. 糖链的合成是由基因编码的糖基化转移酶等催化的, 据估计在人体细胞内的基因组中约有 0.5%~1.0% 的基因参与糖链的合成与代谢.

参与糖链结构形成与修饰的基因主要包括了糖基转移酶、糖苷酶和磺基转移酶. 糖基转移酶 (Glycosyltransferase) 指在二糖、寡糖、多糖以及糖与酯类、蛋白等形成过程中具有将活性糖类分子基团转移功能的数百种酶类分子^[1]. 国际生物化学联合会 (IUBMB) 将糖基转移酶根据反应底物与产物的立体化学性质进行分类, 对其编号为 EC 2.4. 目前 CAZY (Carbohydrate-Active Enzymes) 数据库已经建

议了一种依照糖基转移酶氨基酸序列同源性等进行分类的方法, 并将糖基转移酶分为 92 个亚家族^[2]. 糖苷酶亦称糖苷水解酶 (glycoside hydrolases), 是一类具有水解糖基化位点活性的酶类. IUBMB 对其编号为 EC 3.2.1, 并根据糖苷水解酶作用底物分子对其进行分类. Henrissat B, Bairoch A 等则对糖苷酶根据其氨基酸和折叠相似性划分为约 115 个亚家族^[3, 4]. 磺基转移酶 (EC 2.8) 是一类可以将供体分子的硫酸根基团转移到醇或胺等分子的转移酶^[5, 6].

某些疾病例如肿瘤发生时, 蛋白质和脂分子糖基化的异常会导致糖链发生结构和数量的改变. 对特定时期生物体内的参与形成 N-与 O-糖链的一整套酶系统来进行基因表达谱研究, 有助于揭示糖类相关基因与糖链形成的关系, 具有生物学和诊断学上的重要意义. 以肝癌为例, 其死亡率在恶性肿瘤中居第二位. 在我国由于各种条件影响, 大概有近 85% 的患者就诊时, 往往已属中晚期, 因此对于肝癌的早期

检测极为关键^[7]. 而以肝癌发生标记物的筛选为目的的工作, 某些特异表达的基因筛选也是其研究内容之一. 以肝癌标记物 AFP 蛋白为例, 肝癌发生时, AFP 蛋白出现了高度的岩藻糖化^[8, 9], 而据文献报道, 在导致 AFP 蛋白异常变化的过程中, Mgat3, Mgat5 与 FUT8 等基因均出现了异常的表达^[10, 11].

为了对影响糖链结构形成的众多基因表达状况进行监测, 需要一种高通量、快速高效的检测方法. 目前基因芯片已经应用于特征表达谱检测: 通过将整个基因组或者一部分基因的 DNA 片段或寡核苷酸固定在一定的载体基质上制备成基因芯片与待测样品进行杂交, 此过程中对样本进行荧光标记. 随后对载体进行激光共聚焦扫描, 测定芯片上各点的荧光强度, 通过专用软件分析出各基因在不同样本中的相对表达水平, 以揭示疾病的发生与基因变化的关系^[12].

在本实验中, 利用基因芯片表达谱技术, 从基因表达水平的层面通过对参与形成糖链分子的糖基转移酶、糖苷酶以及磺基转移酶等基因的选择、探针设计、芯片制备, 最终实现样品杂交进行糖基因表达谱检测. 经过扫描仪对基因芯片杂交结果的扫描和数据分析来确认某些基因发生的特异性变化, 它的意义不止在于为某些疾病检测提供了分子标记, 并且可以推测糖链分子发生的变化, 进一步研究肿瘤的发生与糖链变化之间的关系. 经过探针设计、实验条件优化和实验方案的确定, 本实验中设计与制备的糖类相关基因芯片可以为疾病发生时糖类相关基因研究提供一个快速、高通量的检测平台.

2 实验部分

2.1 实验材料与仪器

玻璃片基(76 mm×25 mm×1 mm; Gold-SEAL, 美国), 氨丙基三乙氧基硅烷(APTS, Sigma), 焦碳酸二乙酯(DEPC, Sigma Aldrich), TRIzol试剂(Invitrogen, 美国), cRNA扩增与标记试剂盒(陕西北美基因股份有限公司), Cy3, Cy5(GE, 美国). 芯片杂交盒(Agilent, 美国). 点样针(SMP 9B, TeleChem, 美国). 芯片扫描仪(Genepix 4000B, Axon, 美国). 芯片点样仪(晶芯® SmartArrayer 48 点样系统, 北京博奥). SMMC-7721 肝癌细胞系和Chang's liver肝细胞系(本实验室保存). 设计的205条探针与8条Realtime-PCR引物于上海生

工公司合成.

2.2 基因的选择与探针的设计

根据英国的CFG(Consortium for Functional Glycomics)^[13]和法国的CAZY的网站数据库信息^[14], 筛选出人类糖基转移酶、糖苷酶基因及磺基转移酶三大家族基因, 并通过Genebank数据库获取基因的mRNA序列. 应用Oligo6.0 软件对mRNA序列进行探针设计并通过BLAST同源性比对. 在探针设计时考虑以下的设计原则: (1)探针方向与mRNA序列相一致; (2)探针长度为60个碱基, 退火温度(T_m)介于85.0±5.0℃之间; (3)连续重复碱基不超过6个; (4)探针内部茎环结构的连结部分不超过6个碱基; (5)探针分子最稳定二级结构配对碱基长度少于6个碱基; (6)在BLAST数据库中进行比对分析, score值须大于60, 保证其连续同源片断不超过20个碱基.

2.3 氨基化片基的制备

将玻璃片基在无水乙醇中清洗3次, 每次10 min. 玻片离心甩干后放到10% NaOH 溶液中, 以80 r/min 的转速摇洗过夜. 次日超声处理15 min(功率70%), 再用超纯水清洗4次, 每次2 min, 无水乙醇清洗2次, 每次2 min. 将玻片放入1%APTS 溶液中(玻片必须在液面下), 摇床上70 r/min 避光反应3 h. 反应结束后以功率70%超声处理15 min. 离心甩干后用无水乙醇彻底摇洗. 室温下以600 r/min 离心甩干玻片后置于37℃烘箱中抽真空干燥3 h. 最后将玻片放入干燥器中, 于室温避光保存.

2.4 糖类相关基因芯片的点制

对合成的探针进行处理: 向含有作为杂交探针的1 OD单链DNA的离心管中加入20 μL左右无菌水, 并调整其浓度统一为100 μmol/L. 根据对糖类相关基因芯片矩阵设计的方案加于384孔板上对应的位置, 以1:1的体积加入点样缓冲液, 使每个孔中含有约40 μL点样液. 根据点样矩阵要求, 在加入探针溶液的同时, 将空白样品(2×点样缓冲液)、荧光质控(稀释1万倍的等比例Cy3和Cy5溶液)等按照要求加入相应位置. 384孔板经过短暂涡旋震荡, 离心后进行芯片点制. 本实验点样系统采用北京博奥的晶芯® SmartArrayer 48 微阵列芯片点样系统. 完成点制的芯片, 进行2500 mJ紫外交联, 于80℃高温固定4 h,

放于干燥盒内保存。

2.5 细胞的总RNA提取

当细胞瓶中培养的细胞数目达到约 10^7 个左右, 视为合格。将 PBS 缓冲液加入培养瓶中吹洗掉死细胞、未贴币细胞等悬浊成分。加入 TRIzol 试剂反复吹吸, 将裂解的细胞分装于 1.5 mL 离心管, 于 4 °C, 6000 r/min 离心 6 min。室温静置 5~30 min 后经过 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min。将上清转入新的离心管中, 加入 200 μ L 的 0.2 μ mol/L 氯仿, 震荡 30 次, 室温静置 15 min, 4 °C, 12000 r/min 离心 15 min。将上清液转入新离心管中, 加入 500 μ L 异丙醇混匀, 室温静置 10 min 后经过 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min。弃上清液, 加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀后经过 4 °C, 9800 r/min 离心 5 min, 再次弃上清液, 干燥沉淀。

2.6 样本的扩增与荧光标记

取约 1~8 μ g 总 RNA 通过线性扩增试剂盒进行样本的扩增成 cRNA, 并使用 Rneasy MiniKit 纯化试剂盒(QIAGEN)进行分离纯化。用紫外分光光度计计算 cRNA 扩增倍数和产量, 扩增结果大于 100 倍以上视为合格。将 SMMC-7721 细胞系的 cRNA 用 Cy5, Chang's liver 细胞系的 cRNA 用 Cy3 进行荧光标记。具体方法: 取 5 μ g cRNA, 经过真空干燥后加入预先孵育 1 h 的 5 μ L 荧光染料的 DMSO 溶液, 充分混匀后, 避光反应 1 h。随后加入 4.5 μ L 的 4 M 羟胺, 反应 15 min, 加 DEPC 水补至 100 μ L, 经过分离纯化。计算荧光标记效率, 大于 8 倍者视为合格。

2.7 芯片的杂交、扫描与数据分析

将制备的芯片放于封闭盒中, 在点样区上加入含有 0.01 μ mol/L BSA 的杂交缓冲液 300 μ L, 42 °C 预孵育 45 min。孵育结束后经过清洗快速甩干, 组装于杂交盒中。将经过 70 °C 片段化处理 30 min 后的杂交液, 取荧光染料标记的实验组与对照组 cRNA 各 1.2 μ g, 用水补齐至 150 μ L, 加入 6 μ L 片断化试剂(Agilent), 70 °C 水浴 30 min 后加入 150 μ L 杂交缓冲液。将混匀的 306 μ L 杂交液加入组装好的杂交盒, 放于杂交炉内 60 °C 杂交 12 h 后清洗芯片。

2.8 芯片结果数据分析

经 6 $\times$ SSC 与 0.1 $\times$ SSC 溶液各清洗一次后, 杂交

芯片经过快速甩干。使用 GenePix 4000B 扫描仪对芯片进行 532 nm 和 635 nm 双通道扫描, 获得荧光信号图像, 用 GenePix Pro3.0 图像处理软件, 对图像进行处理, 分析 Cy5 和 Cy3 两种荧光信号的强度和比值。去除实验中的坏点、没有信号的点, 以及前景和背景值之比小于 1.4 的点, 用管家基因标准化的方法对数据进行归一化处理。获取的数据导入 Spotfire8.0 软件进行分析, 以 Cy5 荧光值比 Cy3 荧光值得到表达倍数, 表达倍数大于 2 视为上调基因, 表达倍数小于 0.5 视为下调基因。

2.9 Realtime-PCR对实验结果的验证

将根据芯片杂交结果挑选出具有差异性表达的上调基因与下调基因, 使用 PrimerPremier5.0 软件对所选基因进行引物的设计, 随后进行 Realtime-PCR 验证, 根据结果判断其是否与芯片杂交结果所反映情况一致。

3 结果与讨论

3.1 糖类相关基因芯片的方法建立及条件优化

3.1.1 探针设计结果

遵循探针设计的基本原则, 利用 Oligo 6.0 软件对从 Genbank 数据库中获取筛选的基因 mRNA 序列进行探针的设计^[15]。共设计 205 条 60-mer DNA 分子探针, 表 1 为所随机挑选的其中十种探针与其 Tm 值、Oligo6.0 所提示具有最长连续碱基数量、BLAST 结果中的 Max Score 的对照关系。本实验所设计的探针 Tm 值在 85.0 ± 5.0 °C 范围为主, GC 含量介于 53%~62%, 均一性较好。无连续 6 个相同碱基重复, 二聚体或茎环结合的最多连续结合碱基数不足 6 个。所设计的探针序列由经 NCBI 的 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool), 基本局部相似性比对搜索工具)进行序列比对分析。比对结果 score 值均为 111, 因此说明探针序列具有高度的专一性。

3.1.2 糖类相关基因芯片的设计

本研究选用氨基化玻片作为芯片载体, 在片基中央设计一个 21 $\times$ 30 的点样矩阵, 矩阵大小 10.15 mm $\times$ 7.00 mm, 点间距为 350 μ m。样点种类共计 210 种, 每种样点重复 3 次, 共计 630 个样点。210 种样点

表 1 十种所设计杂交探针

基因名	探针序列(5' → 3')	Tm (°C)	最多连续匹配碱基	Max score
AGL	ACACGCTTAGATAGC CGATGTCTTATTAGA GGGCAGTTTGTGGTT CCTGATTTGGAATT	86.4	4	111
B3GALT3	AAAGGGGAGCACTCC TTGCCCCCTGTTTCCT GGGTTTATGCAGTTT TCTTTTAGAGTTTA	87.8	5	111
B3GAT1	CAGTCCAGAGACCTA ACATTCAGAATATAG CATTGGTTGCCTATT TTGAGATGGATTTAA	84.4	4	111
B3GNT3	CCAGTCAAGCTTCAC AGGCATTGTGATGGG GCAGCCTTGGGGAAT ATAAAATTTTGTGAA	87.8	6	111
DPM1	TAAAGGCTACGTCTT CCAGATGGAGATGAT TGTTTCGGGCAAGAC AGTTGAATTATACTAT	85.7	3	111
FUT5	CACCACTTATAGGGT ACAGGTGGGATCGAC TGTAATGAGGACTT CTGGAACATTCCAAA	87.8	5	111
GALNT14	CCTGATTGGTATCTGG AGACAGAAACCTAA TGGGAAGTGTTTATT GTTCTTTTCCTACA	85.7	4	111
GYS1	GGCTTCTGGCTTTTG CCCCAGCCCCTTGG ATACCAGTAATTCAA ACCTTCCTCATTTCA	89.8	4	111
st3gal5	GCTCGTTTACACTGC ACATTGAATACAGGT AACTAATTGGAAGGA GAGGGGAGGTCACCT	88.5	4	111
GBA3	ATTCGGCCCATATTT TGTGTGTTTGGACAA GTACATCTCCCTTTT GCCTAATGAACCTTTT	85.1	4	111

包含有检验 195 种糖类相关基因探针作为工作探针, 10 种人类管家基因作为阳性质控, 2 种与人类远源的其他生物基因作为阴性质控(猪流感病毒 NP 基因和口蹄疫病毒 VP1 基因), 2 种只含有点样缓冲液作为空白对照, 此外还含有 1 个荧光染料样点作为位置质控(见图 1).

3.1.3 探针与氨基化片基结合效果验证

对氨基化片基与单链 DNA 探针联接的可靠性验证采取 Vistra Green 染色. 设计一定的点样阵矩, 利用实验部分材料进行与正常点制过程相同的点样方

图 1 糖类相关基因芯片设计图

法制备一批芯片. 将制备的芯片清洗后用稀释到 1 万倍的 Vistra Green 染色 10 min, 芯片扫描仪读取荧光值(F1). 过夜清洗后再染色 10 min, 读取荧光值(F2). 挑选同种探针的三个样点的荧光值进行数值平均, 将 2 次染色平均荧光值进行比较, 如 F2/F1 大于 0.5, 即为质量合格(见图 2).

其中根据实验结果 F1 为 844, F2 为 799, F1/F2 为 0.9466. 因此认为按照试验方法效果理想, 大规模点样具有可行性.

3.1.4 芯片封闭条件的验证

芯片点制完成后需要进行封闭反应. 封闭反应原理是将玻片上剩余的活性官能团进行修饰, 用特定的生物或化学试剂与芯片上未反应的活性官能团反应. 假如未进行良好的封闭, 它们将非特异地与样本结合, 从而产生过高的背景值, 影响芯片杂交效果.

由图 3 可以看到封闭结果背景均一, 右下角的荧光质控点颜色明显, 其余检测样点均封闭效果良好.

图 2 (a) 芯片清洗 10 min 后染色; (b) 过夜清洗后再染色芯片扫描结果

图3 封闭后的糖类相关基因芯片

3.2 芯片杂交结果的验证

3.2.1 芯片杂交结果

杂交反应结束后芯片经过清洗用芯片扫描仪进行激光共聚焦扫描得到芯片结果(见图4)。由芯片杂交结果可以看到与设计矩阵相比,十个管家基因出现阳性质控信号,而阴性质控和空白位点没有杂交信号出现,说明整个芯片质量控制体系良好。

通过 Spotfire8.0 软件分析,最终确认共有 34 种基因出现特异表达的情况。见表2与图5。

3.2.2 芯片结果与Realtime-PCR的结果分析

验证实验选取未曾在肝癌研究中报道的上调和下调基因各2个。它们分别是在 SMMC-7721 肝癌细胞系中出现上调的 Alg10, Galnt11 和下调的 Galnt12 与 HMCS。

由图6可看出:荧光定量PCR检测和基因芯片结果一致,与 Chang's liver 正常肝细胞系相比在 SMMC-7721 肝癌细胞系中 Alg10 和 Galnt11 mRNA 表达量上升,而 Galnt12 和 HMCS mRNA 表达量下降,即在 SMMC-7721 细胞系中 Alg10 和 Galnt11 上调, Galnt12 和 HMCS 下调。

对四个特异表达的基因进行进一步研究,四种酶所参与的反应介绍如表3,它们均从不同层面参与了糖链的修饰。Alg10 基因参与 N-连接糖链形成, Galnt11 和 Galnt12 参与 O-连接糖链形成, HMCS 则参与糖胺聚糖磺基化的过程。

总之, Realtime-PCR 证实了糖类相关基因芯片对 SMMC-7721 肝癌细胞系中糖类相关基因表达谱研究结果的可靠性,因此说明四种所检测的基因在 SMMC-7721 细胞的糖链的变化中均有不同程度的特异性改变。

此外芯片筛选的结果中出现的 ST6Gal1 发生上调与 MGAT3 出现下调的异常表达在关于人类肝癌癌细胞中和人肝癌细胞转基因鼠模型中也有过类似的报道^[16~19]。进一步说明了芯片所筛选的结果具有一定的可靠性。

4 结论

本实验通过糖生物数据库筛选出糖类相关基因,并设计出 60-mer 寡核苷酸探针,最终设计出糖基转移酶探针 127 个,糖苷酶探针 34 个,磺基转移酶探针 34 个,管家基因探针 10 个。制备出的糖类相关基因芯片,经过条件摸索优化,通过对参与 SMMC-7721 细胞系与正常肝细胞系 Chang's liver 的比较研究,筛选出差异表达的糖类基因 34 个,其中上调基因 19 个,下调 15 个。从中挑选出了四个表达差异的基因:上调基因 Alg10 和 Galnt11,下调基因 Galnt12 和 HMCS。

图4 以肝癌细胞与肝细胞为样本的芯片杂交结果

图5 Spotfire8.0 软件对杂交结果所做的散点图

表 2 以 SMMC7721 为研究对象筛选出的差异表达糖基因

上调基因	Ration	Std Dev	下调基因	Ration	Std Dev
A4Gnt	2.6700	3.40E-01	HMCS	0.4300	5.65E-02
GCS1	3.6793	5.80E-01	ST6GalNAcI	0.4480	1.13E-01
Fut8	4.5357	6.20E-01	HS2St1	0.1308	4.05E-02
St6GalNAc2	5.3948	8.22E-01	CHST3	0.3338	1.06E-01
TST	4.0352	6.95E-01	GYS1	0.2724	5.10E-02
alg3	2.7508	3.15E-01	HS6ST2	0.0837	4.90E-02
B3Galnt1	2.3551	3.43E-01	NDST4	0.4427	1.18E-02
PIGZ	2.6198	2.95E-01	PIGT	0.0394	3.43E-03
B3GNT2	3.1645	1.32E-01	Alg8	0.4208	7.89E-02
DPM2	4.3238	5.65E-01	MGAT3	0.4394	9.20E-02
DPM3	2.8744	3.87E-01	POMT1	0.2272	7.21E-02
Galnt8	4.6127	5.82E-01	ABCC8	0.0982	1.12E-02
Alg10	2.4494	4.04E-01	Galnt12	0.2792	3.35E-02
Galnt11	3.2273	4.40E-01	B3Gnt8	0.1584	2.01E-02
B3GNT7	4.6977	5.44E-01	ST3Gal4	0.2531	4.00E-02
ST6Gal1	3.5538	4.10E-01			
SLC21A14	2.0635	3.01E-01			
GBE1	4.7218	4.95E-01			
SULT1A3	4.2686	7.35E-01			

通过用 Realtime-PCR 技术对这四个基因的表达水平进行验证, 其结果与芯片结果呈现出一致性. 证明它们的特异表达确实与 SMMC-7721 肝癌细胞系存在密切的关系; 初步建立了 SMMC-7721 肝癌细胞系的糖类相关基因差异表达谱, 用于对正常肝细胞和肝癌细胞的糖类相关基因表达谱研究.

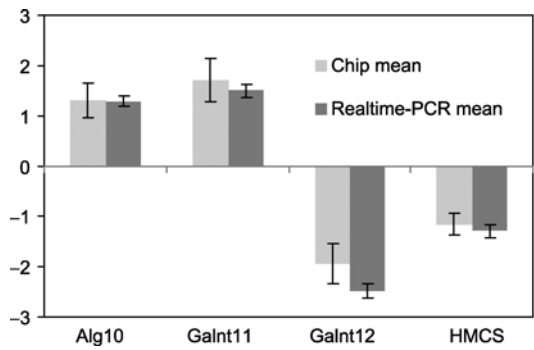


图 6 通过芯片与 Realtime-PCR 显示表达水平的比较

致谢 本工作得到科技部国际科技合作计划项目 (2009DFA32730) 和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(200806970018)资助, 特此致谢.

参考文献

1 Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77:

表 3 Realtime-PCR 反应所检测基因所参与反应

基因	中文名	功能
Alg10	天冬酰胺连接糖基化转移酶 10	在 N-连接糖基化的寡糖前体上连接第三个葡萄糖残基等
Galnt11	N-乙酰半乳糖胺转移酶 11	参与 O-连接寡糖链合成的起始步骤, 将 N-乙酰-D-半乳糖胺转移到丝氨酸或苏氨酸上
Galnt12	N-乙酰半乳糖胺转移酶 12	与 Galnt11 类似, 也许在黏蛋白类型寡糖链的初始合成中扮演重要角色
HMCS	钼辅因子硫化酶	在钼的参与作用下参与磺基化作用

本研究从基因表达谱芯片技术证明探索某些疾病发生的时候糖类相关基因所发生的特异变化, 通过对糖基转移酶、糖苷酶等的功能研究, 可以推测疾病发生时, 表面糖链发生的变化情况. 为进一步研究糖链变化所产生的生物信息提供一个高通量的检测平台.

521—555

- 2 Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat BA. Classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem*, 1997, 326: 929—939
- 3 Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, 7(5): 637—644
- 4 Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem*, 1993, 293: 781—788
- 5 Negishi M, Pedersen LG, Petrochenko E. Structure and function of sulfotransferases. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 390 (2): 149—157
- 6 Rath VL, Verdugo D, Hemmerich S. Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery. *Drug Discov Today*, 2004, 9(23): 1003—1011
- 7 黄正京, 周脉耕, 王黎君. 中国肝癌死亡率和乙肝病毒表面抗原携带率的地理分布研究. *疾病监测*, 2007, 22: 242—245
- 8 Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases, 2009, 50(3): 592—603
- 9 Wang M, Long RE, Comunale MA. Novel fucosylated biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(6): 1914—1921
- 10 Ang IL, Poon TC, Lai PB, Chan AT, Ngai SM, Hui AY, Johnson PJ, Sung JJ. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *Proteome Res*, 2006, 5(10): 2691—2700
- 11 Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, Hiramatsu N, Igura T, Hayashi N, Taniguchi N, Kondo A. Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *Proteome Res*, 2008, 7(6): 2222—2233
- 12 Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Foellettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotech*, 1996, 14: 1675—1680
- 13 Coutinho PM, Henrissat B. Carbohydrate-active enzymes . <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>.
- 14 Prestegard J, Finn M, Woods R, York W. Glyco Enzymes <http://www.functionalglycomics.org/glycomics/molecule/jsp/glycoEnzyme/geMolecule.jsp>
- 15 Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D25—30
- 16 Cao Y, Merling A, Crocker PR, Keller R, Schwartz-Albiez R. Differential expression of beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase and sialoglycans in normal and cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*, 2002, 82: 1515—1524
- 17 Dall'Olio F, Chiricolo M, D'Errico A, Gruppioni E, Altamari A, Fiorentino M. Expression of beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase and of alpha 2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis. *Glycobiology*, 2004, 14: 39—49
- 18 Pousset D, Piller V, Bureaud N, Monsigny M, Piller F. Increased alpha 2,6 sialylation of N-glycans in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1997, 57: 4249—4256
- 19 Toegel S, Pabst M, Wu SQ, Grass J, Goldring MB, Chiari C, Kolb A, Altmann F, Viernstein H, Unger FM. Phenotype-related differential alpha-2,6- or alpha-2,3-sialylation of glycoprotein N-glycans in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 22, Epub ahead of print.

The design and fabrication of glyco-gene microarrays

CHEN WenTian, LIU Chen, YU HanJie, YAN Hua, WANG AnXiao, CHEN Chao & LI Zheng

College of Life Sciences, National Engineering Research Center For Miniaturized Detection System, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: Glycosylation is the most common posttranslational modification of proteins. Glycosyltransferases are a ubiquitous group of enzymes that catalyse the transfer of a sugar moiety from an activated sugar donor onto saccharide or non-saccharide acceptors. Glycosyltransferase, glycosidase and sulphotransferase participate in the formation and modification of glycan chains. The growing evidences supported that the glycan structures on the cellular surface happened to change in tumors. In this report, 127 glycosyltransferases, 34 glycosidases, 34 sulfotransferases and 10 house keeping genes from the database of Genebank were selected to design 60-mer oligonucleotide probes according to their mRNA sequences. A kind of glyco-gene microarrays related to glycosylation of proteins was prepared and used to generate the glyco-gene expression profiles with liver normal cell line (Chang's liver) and liver cancer cell line (SMMC-7721). The result showed that there were 34 glycogenes of the differential expression, up-regulation of 19 gene expressions and down-regulation of 15 gene expressions by comparing SMMC-7721 cell with Chang's liver cell. The 2 genes (Alg10 and Galnt11) of up-regulation and 2 genes (HMCS and Galnt12) of down-regulation in SMMC-7721 cell were analyzed with the Realtime-PCR in order to confirm the results of the arrays. The verification showed high concordance between the two methods.

Keywords: gene microarrays, glycosyltransferase, glycosidase, sulphotransferase, SMMC-7721 liver cancer cell line, Chang's liver cell line