

## pcDNA3.1-UDPGT1A9 表达质粒的构建及其转基因细胞系的建立

李旭梅, 李新\*, 陈枢青, 曾苏

(浙江大学药学院药物分析与药物代谢研究室, 浙江 杭州 310031)

**摘要:** 目的 为建立能稳定表达人葡萄糖醛酸转移酶 UDPGT1A9 蛋白的 CHL-UDPGT1A9 转基因细胞系, 并鉴定其对药物的葡萄糖醛酸缀合活性。方法 利用基因亚克隆技术, 将 UDPGT1A9 cDNA 从 pREP9-UDPGT1A9 构建到哺乳动物表达载体 pcDNA3.1 中, 形成真核细胞表达重组子 pcDNA3.1-UDPGT1A9, 再转染于中国仓鼠肺细胞(CHL 细胞)中, 通过 G418 筛选阳性克隆, 建立稳定表达 UDPGT1A9 的 CHL-UDPGT1A9 转基因细胞系, 并以山萘酚为底物, 采用 HPLC 方法对其代谢活性进行鉴定。结果 建立了 CHL-UDPGT1A9 转基因细胞系, 通过 HPLC 分析其对山萘酚代谢活性为  $(1.02 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白, 而对照 CHL 细胞对底物无明显代谢。结论 构建完成的转基因细胞系能稳定表达人体葡萄糖醛酸转移酶 UDPGT1A9, 并具有对山萘酚的代谢活性。**关键词:** 葡萄糖醛酸基转移酶; 转染, 细胞系; 色谱法, 高压液相; 山萘酚

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)02-0115-06

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸酰转移酶(uridine diphosphate glucuronosyltransferase, UDPGT)是人体重要的 II 相代谢酶, 它是一个超基因家族, 该酶能催化大量的外源性及内源性化学物质的葡萄糖醛酸缀合反应。葡萄糖醛酸化是一个重要的解毒途径, 对很多药物、毒物的分解、代谢和排出有深远的影响, 它能导致代谢

废物的失活、修改毒物的药理活性。对于 II 相酶的研究, 通常采用肝微粒体的方法, 但存在一些缺点。首先, 肝微粒体是多种药酶混合体系的复杂体系, 实验结果难以区分是哪一种同工酶的作用; 其次, 人肝微粒体不易获得, 有的亚族在肝中很少甚至没有而是存在于其他器官中; 第三, 用实验动物肝制备的微粒体与人肝不完全一致, 包括在代谢酶谱表达和诱导结果方面, 以及动物与人对应的同工酶也不完全一致; 还有, 要研究具体同工酶的代谢和调控机制, 必须获得单纯的酶蛋白。因此, 国际上人们已经广泛采用 DNA 重组技术, 将人 cDNA 导入哺乳动物细胞, 建立人 UDPGT 转基因细胞系来获得酶蛋白。例如, 人类 UDPGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15<sup>[1]</sup> 蛋白都已经在体外获得了异源表达。

采用转基因细胞系方面的药物代谢研究在国内还是一个崭新的领域。UDPGT1A9 是 UDPGT1A 亚族的一个同工酶, 主要催化羟基和平面型芳香胺葡萄糖醛酸结合反应<sup>[2]</sup>, 尤其对致癌的杂环胺的解毒起重要作用<sup>[3]</sup>, UDPGT1A9 催化的葡萄糖醛酸结合也是黄酮类代谢和吸收的一个主要途径, 尤其是多羟基黄酮如山萘酚(kaempferol, 结构如图 1)和槲皮素。本实验用 DNA 重组技术, 以 pcDNA3.1 为载体构建人葡萄糖醛酸转移酶 UDPGT1A9 的表达重组子, 建立了表达人葡萄糖醛酸转移酶 UDPGT1A9 蛋白的 CHL-

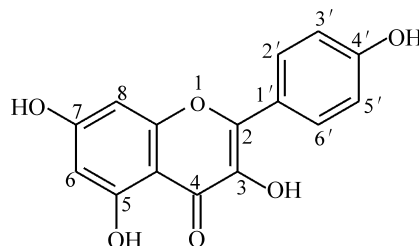


Fig 1. Chemical structure of kaempferol.

收稿日期: 2003-06-23 接受日期: 2003-09-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(C30100232); 国家自然科学基金资助项目(32025047); 浙江省自然科学基金资助项目(C300487)

作者简介: 李旭梅(1978-), 女, 浙江大学药物代谢硕士研究生。

\* 联系作者 E-mail: zjhsin@msn.com Tel and Fax: (0571)87217203

UDPGTIA9 转基因细胞系,显示了对黄酮类化合物山萘酚的代谢活性。本实验为建立体外研究葡萄糖醛酸代谢的细胞模型及进一步开展葡萄糖醛酸结合转移反应的研究打下了坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

TRIzol 试剂,随机引物, M-MuLV 逆转录酶(MBI Fermentas), *Hind* III (MBI Fermentas), *Not* I (TaKaRa), T4 DNA 连接酶(TaKaRa), dNTP(Sangon), Tag DNA 聚合酶(SANGON)均购自上海生物工程有限公司。T7, BGH 启动子序列引物, RT-PCR 引物皆由上海生物工程有限公司合成。MEM 培养基、小牛血清、G418、胰酶购自美国 Gibco 公司。*E. coli* DH 5 $\alpha$  菌株、pcDNA3.1 质粒、CHL 细胞株和含目的基因的载体 pREP9-UDPGTIA9 由本研究室保存。山萘酚由中国药品生物制品检验所提供。

### 1.2 pcDNA3.1-UDPGTIA9 重组子的建立

将本实验室已经构建的重组子 pREP9-UDPGTIA9 用 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切,经凝胶电泳分离和透析袋回收 UDPGTIA9 cDNA 片段,亚克隆入 pcDNA3.1 的 *Hind* III, *Not* I 位点之间,所获得的重组子转化 *E. coli* DH 5 $\alpha$  感受态细胞。所涉及的酶切、连接、转化、重组子筛选、质粒大量制备等方法按文献[4]进行。

### 1.3 细胞培养

CHL 细胞用 10% 热灭活小牛血清的 MEM 培养液(含 100 kU $\cdot$ L<sup>-1</sup>青霉素, 100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>链霉素, 3% 谷氨酰胺), 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度及 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。

### 1.4 细胞转染及其抗性克隆的筛选

将所获得的重组子 pcDNA3.1-UDPGTIA9 用改进的磷酸钙介导法转染 CHL 细胞<sup>[5]</sup>。以 G418 400 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 MEM 培养基筛选出抗性克隆, G418 200 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 维持浓度扩大培养, 冻存备用。

### 1.5 CHL-UDPGTIA9 转基因细胞系中 mRNA 转录的检测

细胞总 RNA 抽提按 Life Technologies 公司 TRIzol 试剂说明书方法进行, 经紫外分光光度计测定浓度和纯度<sup>[6]</sup>。然后参考文献<sup>[7]</sup>进行 RT-PCR 反应。取 10  $\mu$ L PCR 反应液进行电泳分析检查是否扩增出 DNA 片段, 预计扩增的 DNA 片段为 1063 bp。

### 1.6 CHL-UDPGTIA9 细胞 S9 的提取

在含 G418 200 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的培养基中生长的 CHL-UDPGTIA9 细胞, 弃去 MEM 培养液, 用磷酸盐缓冲液(PBS) 淋洗数遍后, 滴干残液, 加冰浴的 1.15% KCl(灭菌) 适量, 轻轻刮下细胞, 超声破碎后离心取上清(即 S9)<sup>[8]</sup>, 分装后在 -70 $^{\circ}$ C 保存。蛋白含量用 Lowry 等<sup>[9]</sup>法测定。

### 1.7 UDPGTIA9 的体外孵育反应

反应在 100  $\mu$ L 的孵育体系中进行, 在 1.5 mL 的 Eppendorf 管中依次加入 0.04% TritonX-100, 5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 葡萄糖醛结合物的水解抑制剂糖内酯(saccharolactone), 100 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris 缓冲液 pH 7.5 (含有 5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>), 微粒体适量(使孵育浓度为 1 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>), 底物山萘酚 200  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 加灭菌水补足体积至 90  $\mu$ L, 混匀。在 37 $^{\circ}$ C 预孵育 5 min 后立即加入 5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的尿嘧啶二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA) 启动反应。反应一定时间后, 加 0.1 mL 甲醇终止反应, 加入内标(0.1 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 桑色素甲醇溶液) 1  $\mu$ L 混匀, 然后在 4 $^{\circ}$ C, 10 000  $\times$  g 离心 5 min, 转移上清到另一管中取 20  $\mu$ L 进行 HPLC 分析。测定剩余底物浓度, 用底物浓度的减少来计算其酶活性。同时设立不加 UDPGA 的孵育体系和 CHL 细胞的 S9 为酶源的孵育体系两个对照组。

### 1.8 山萘酚的代谢-时间曲线

取 CHL-UDPGTIA9 和 CHL 细胞 S9 液适量, 按体外孵育项下方法, 使山萘酚终浓度为 200  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 于 37 $^{\circ}$ C 预孵育 5 min, 然后加入适量 UDPGA (5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 启动反应, 依次在孵育 15, 30, 60, 90 min 后取出 100  $\mu$ L 孵育液, 加 0.1 mL 甲醇终止反应, 从“加入内标”开始按照“体外孵育”项下操作, 测定经不同时间孵育后山萘酚剩余浓度, 以孵育时间对剩余底物浓度作图, 得到时间反应曲线。同时设立不加 UDPGA 的孵育体系和 CHL 细胞的 S9 为酶源的孵育体系两个对照组。取转基因后持续传代培养 2 和 3 个月的 CHL-UDPGTIA9 的 S9 液, 同法操作, 以分析 UDPGTIA9 蛋白表达的稳定性。

### 1.9 山萘酚的高效液相色谱分析

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪系统, SPD-10AVP 紫外检测器, HS2000 色谱处理软件, 分析柱: Platinum EPS-C18(4.6 mm $\times$ 250 mm, id, 5  $\mu$ m), 流动相: pH 2.0 磷酸水溶液(0.005 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)-四氢呋喃-甲醇-异丙醇(65:15:10:20), 流速 0.5 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>; 检测波长: 380 nm; 进样量: 20  $\mu$ L。

## 2 结果

### 2.1 pcDNA3.1-UDPGTIA9 重组子的构建

UDPGTIA9 DNA 片段插入真核表达载体 pcDNA3.1 的 *Hind* III/*Not* I 位点, 构建成 pcDNA3.1-UDPGTIA9 重组子(图 2), 重组子的筛选和鉴定用 *Hind* III/*Not* I 内切酶消化, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 可见清晰的载体 pcDNA3.1 5.4 kb 与 *UDPGTIA9* 1.5 kb 的两条带(图 3B)。重组子质粒 pcDNA3.1-UDPGTIA9 用 pcDNA3.1 载体上的 T7, 牛生长激素 (bovine growth hormone, BGH) 引物和重新设计的中间引物 5'-TGTCCATCAGATCACC-3', 5'-GCTGGCTAAG-TACCTGTC-3', 用 BigDye 标记的双脱氧链终止法进行全序列测定, 测定结果表明 *UDPGTIA9* cDNA 序列完整正确地正向插入 pcDNA3.1 多克隆位点之间。

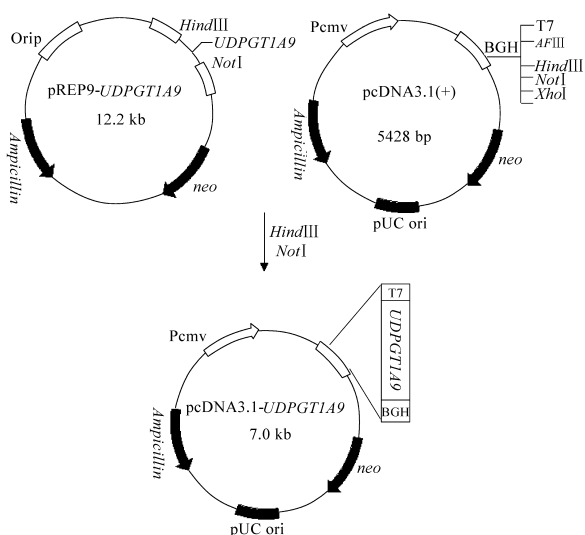


Fig 2. Construction of recombinant expression plasmid pcDNA3.1-UDPGTIA9

### 2.2 转基因细胞系 CHL-UDPGTIA9 的建立

用改进的磷酸钙介导法转染 CHL 细胞。结果显示克隆化基因的细胞转染及 G418 筛选效果良好。挑取单克隆 CHL-UDPGTIA9 细胞, 维持 G418 200 mg·L<sup>-1</sup> 扩大培养成系。RT-PCR 方法检测转基因细胞系中 *UDPGTIA9* mRNA 转录情况, 同时用 CHL 空白细胞做对照。从图 3A 可见, 在 CHL-UDPGTIA9 的细胞中可以用两条引物扩增出约 1 kb 的 DNA 片段, 而在 CHL 细胞中没有扩增出 DNA 片段。由此可以确定, CHL 细胞中没有 *UDPGTIA9* 的表达, 而所建立的 CHL-UDPGTIA9 中 *UDPGTIA9* 基因确实得到了转录。

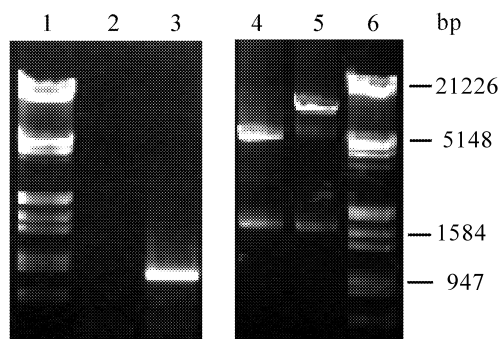


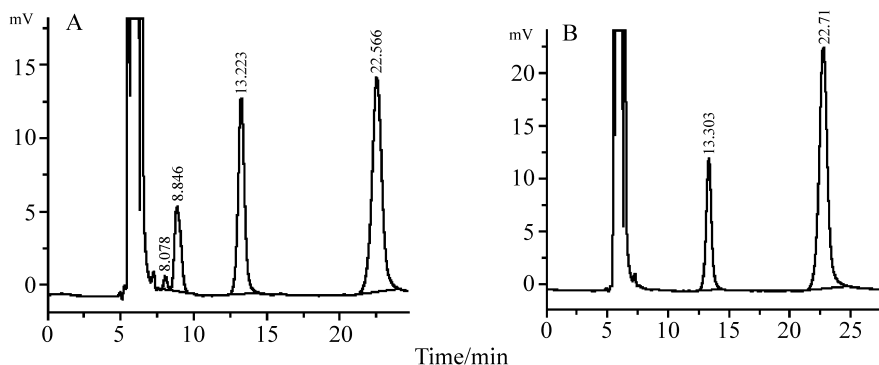
Fig 3. Electrophoresis identification of recombinants and polymerase chain reaction (PCR) products for CHL-UDPGTIA9 and CHL cell. Lanes 1, 6: Markers ( $\lambda$ DNA/*Eco*R I and *Hind* III); lane 2: PCR products for CHL cell; lane 3: PCR products for CHL-UDPGTIA9 cell; lane 4: pcDNA3.1-UDPGTIA9 cleaved by *Hind* III and *Not* I; lane 5: pREP9-UDPGTIA9 cleaved by *Hind* III and *Not* I.

### 2.3 转基因细胞系 CHL-UDPGTIA9 的代谢活性鉴定

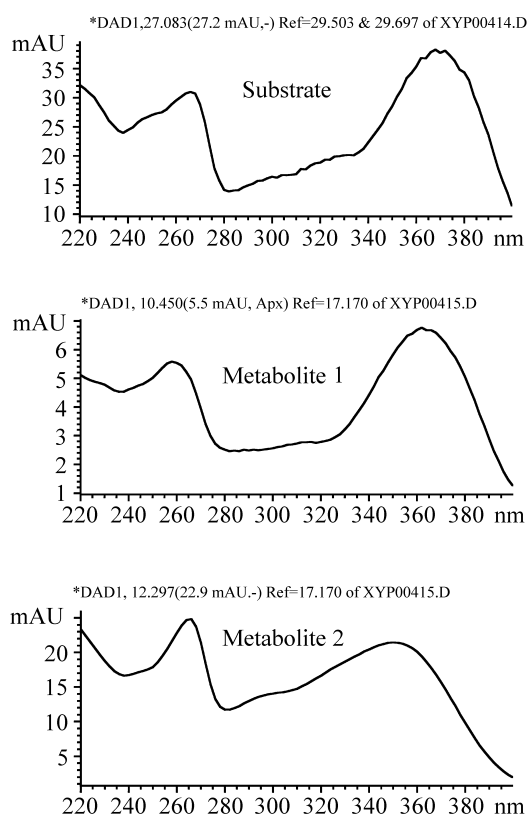
将重组子 pcDNA3.1-UDPGTIA9 导入哺乳动物细胞, 以 G418 400 mg·L<sup>-1</sup> 筛选克隆, 扩大培养成为细胞系 CHL-UDPGTIA9。收获细胞, 提取 S9 液作为活性分析的酶源。用山萘酚作为底物, 对细胞系进行活性鉴定。图 4 是山萘酚和 S9 液孵育后典型的色谱图。采用二极管阵列检测器检测, 比较代谢物与底物的紫外吸收光谱图(图 5)。代谢物 I 与底物均在 370 nm 波长附近有最大吸收, 而代谢物 II 在 350 nm 附近有最大吸收, 吸收光谱曲线大致相近。CHL-UDPGTIA9 转基因细胞系 S9 和未经转染的 CHL 细胞 S9 与山萘酚的孵育时间曲线如图 6 所示。从时间反应曲线可见, 用 CHL 细胞 S9 孵育时, 底物无明显减少。经测定, CHL-UDPGTIA9 代谢山萘酚的酶活性为  $(1.02 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白,  $K_m$  值为  $(73 \pm 4) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过酶的代谢反应, 可见作者构建的转基因细胞系中 *UDPGTIA9* 已获得了有效表达。

### 2.4 转基因细胞系的稳定性分析

转基因后将 CHL-UDPGTIA9 细胞持续传代培养 2 和 3 个月。可见 CHL-UDPGTIA9 细胞生长良好, 同法提取 S9, 按 1.8, 1.9 项下操作。以首批培养的 CHL-UDPGTIA9 细胞的代谢活性为对照, 进行 *UDPGTIA9* 蛋白表达的稳定性分析。如图 7 所示,

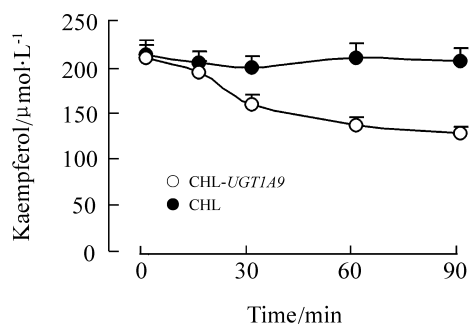


**Fig 4. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of kaempferol metabolized by S9 of CHL-UDPGT1A9 (A) and metabolized by S9 of CHL-UDPGT1A9 without UDPGA (B).** The mobile phase consisted of a mixed solution of pH 2 phosphate solution-tetrahydrofuran-methanol-isopropanol (65 : 15 : 10 : 20) kaempferol :  $t_R = 22.7$  min, internal standard:  $t_R = 13.3$  min, metabolite 1:  $t_R = 8.0$  min, metabolite 2:  $t_R = 8.8$  min.

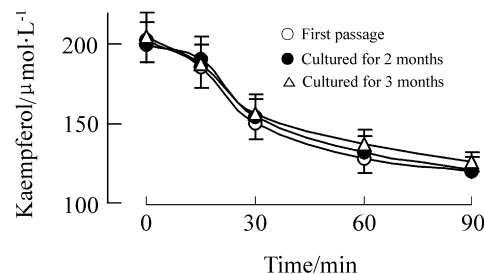


**Fig 5. Spectrum of kaempferol and metabolites.**

山萘酚代谢 90 min 后, 与首代的 CHL-UDPGT1A9 比较, 培养 2 和 3 个月的转基因细胞对山萘酚的代谢经统计性检验无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。此结果从代谢的活性水平表明 UDPGT1A9 在 CHL 细胞中获得了长期、稳定的表达。



**Fig 6. Time course of kaempferol incubated with S9 prepared from CHL-UDPGT1A9 cells and CHL cells.**  $\bar{x} \pm s, n = 3$ .



**Fig 7. The metabolism of kaempferol with S9 prepared from CHL-UDPGT1A9 cells of different passages.**  $\bar{x} \pm s, n = 3$ . The catalytic activity on kaempferol between them were no difference ( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

目前, 包括不同种属的 19 种 UDPGT 已经获得了体外表达<sup>[12]</sup>。在未经转染的 BHK, CHO 和 V79 细

胞中都能检测到极少量的内源性 UDPGT 蛋白,而稳定表达 UDPGT1A9 蛋白的 V79-UDPGT1A9 细胞系催化 entacapone 的活性为  $(1.00 \pm 0.02) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白<sup>[13]</sup>;转染人淋巴母细胞后得到的 UDPGT1A9 重组蛋白催化山萘酚的  $V_{\text{max}}$  为  $(1083 \pm 3) \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白<sup>[10]</sup>。II 相代谢同工酶底物特异性不强,从山萘酚的分子结构看具有形成葡醛酸缀合反应的羟基,UDPGT1A9 可催化其葡醛酸代谢反应。并且文献报道黄酮山萘酚是广泛被 UDPGT1A9 代谢的底物<sup>[10,11]</sup>。因此选用山萘酚作为底物,进行了活性鉴定。本实验室除 UDPGT1A9 外,还正在克隆并在 CHL 细胞中表达了 UDPGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 2B7, 这些 UDPGT 转基因细胞系的建立,为建立广泛的体外研究葡糖醛酸代谢的细胞模型打下基础,也将进一步推动不同 UDPGT 同工酶代谢功能,尤其对致癌芳杂环胺的解毒作用的研究。

目前,关于山萘酚与糖苷配基结合的羟基取代位置方面尚无研究报道。但根据保留时间的不同,可确定至少有两个取代羟基发生了结合反应。这与文献报道相一致<sup>[10,11]</sup>。由于羟基所处的化学环境对其葡醛酸结合作用具有选择性影响,很可能葡醛酸主要与游离的 3-羟基结合,因为 3-OH 较其他位置取代的羟基酸性强,因此在稀酸性溶液中容易离子化,与葡醛酸结合生成 3-O-葡醛酸苷。另外,对于广泛含酚羟基的化合物,UDPGT1A9 还表现出一定的空间立体结构选择性<sup>[14]</sup>。UDPGT1A9 催化葡糖醛酸结合的构效关系还有待于进一步的研究。

UDPGT1A9 的表达受到许多核受体的调节,后者在体内外物质的作用下被激活而影响基因的转录和表达。最新研究发现,UDPGT1A9 可受核受体过氧化体增殖物激活受体( peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR 包括 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  两种)的调节。在 UDPGT1A9 启动子的 -719 到 -706 碱基存在 PPAR 的响应因子,PPAR 的激动剂如过氧化物酶体增生物、脂肪酸等能诱导 UDPGT1A9 的表达及其活性。研究表明,用 PPAR 和 PPAR 作用人体肝细胞、巨噬菌体、鼠脂肪细胞、能促进 UDPGT1A9 的表达及其对内源性化合物如儿茶酚雌激素( catecholestrogens)、外源物如氯贝丁酯( clofibrate)和曲格列酮( troglitazone)等的活性<sup>[15]</sup>。可见,UDPGT1A9 在体内的表达存在着复杂的调控机制,它对底物的代谢也存在着复杂性,意味着它的生理功能还具有迄今仍未了解的特殊作用。因此,利用基因重组技术、实

现 UDPGT1A9 蛋白的体外有效表达、对于研究其对各种药物的代谢作用具有重要的意义。

#### 4 参考文献:

- [1] Ethell BT, Beaumont K, Rance DJ, Burchell B. Use of cloned and expressed human UDP-glucuronosyltransferases for the assessment of human drug conjugation and identification of potential drug interactions[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, **1**(29):48-53.
- [2] Orzechowski A, Schrenk D, Bock-Henning BS, Bock KW. Glucuronidation of carcinogenic arylamines and their *N*-hydroxy derivatives by rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferase of the UDPGT1 gene complex[J]. *Carcinogenesis*, 1994, **15**(8):1549-1553.
- [3] Malfatti MA, Felton JS. *N*-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*] pyridine(PhIP) and *N*-hydroxy-PhIP by UDP-glucuronosyltransferase[J]. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(7):1087-1093.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 42-55.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 792-793.
- [6] Chang WT, Lauzon RJ. Isolation of biologically functional RNA during programmed death of a colonial ascidian[J]. *Biol Bull*, 1995, **188**(1):23-31.
- [7] Li X, Yu YN, Zhu GJ, Qian YL. Cloning of UDPGT1A9 cDNA from liver tissues and its expression in CHL cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, **7**(5):841-845.
- [8] Soars MG, Ring BJ, Wrighton SA. The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of UDP-glucuronosyltransferases[J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, **31**(6):762-767.
- [9] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265-267.
- [10] Oliveira EJ, Watson DG. *In vitro* glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UDPGT-1A9 microsomes[J]. *FEBS Lett*, 2000, **471**(1):1-6.
- [11] Oliveira EJ, Watson DG, Grant MH. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma[J]. *Xenobiotica*, 2002, **32**(4):279-287.
- [12] Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, et al. The UDP glycosyltransferase gene

- superfamily: recommended nomenclature based on evolutionary divergence[J]. *Pharmacogenetics*, 1997, **7**(4):255 – 269.
- [13] Forsman T, Lautala P, Lundstrom K, Monastyrskaia K, Ouzzine M, Burchell B, *et al.* Production of human UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A9 using the Semliki Forest virus expression system[J]. *Life Sci*, 2000, **67**(20):2473 – 2484.
- [14] Ethell BT, Ekins S, Wang J, Burchell B. Quantitative structure activity relationships for the glucuronidation of simple phenols by expressed human *UDPGT1A6* and *UDPGT1A9*[J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, **30**(6):734 – 738.
- [15] Barbier O, Villeneuve L, Bocher V, Fontaine C, Torra IP, Duhem C, *et al.* The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma target gene[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(16): 13975 – 13983.

## Construction of pcDNA3.1-*UDPGT1A9* expression plasmid and establishment of its transgenic cell line

LI Xu-Mei, LI Xin\*, CHEN Shu-Qing, ZENG Su

(Department of Drug Metabolism, College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract:** **AIM** To establish a cell line CHL-UDP-glucuronosyltransferase gene (*UDPGT1A9*) which will stably express human *UDPGT1A9* protein and determine the activity of expressed *UDPGT1A9* in drug glucuronidation. **METHODS** Complimentary DNA (cDNA) of human *UDPGT1A9* was subcloned from pREP9-*UDPGT1A9* into the mammalian expression vector pcDNA3.1 with DNA subclone techniques. Recombinant expression plasmid pcDNA3.1-*UDPGT1A9* was constructed and transfected into Chinese hamster lung (CHL) cells. G418 was used to select transfected clones. The activity and kinetic parameters of expressed *UDPGT1A9* were measured using kaempferol as substrate by HPLC. **RESULTS** The CHL-*UDPGT1A9* transgenic cell line was established. With kaempferol as the

substrate, the enzyme activity of *UDPGT1A9* expressed in CHL-*UDPGT1A9* transgenic cell line was  $(1.02 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  protein, whereas the native *UDPGT1A9* activity was not detectable in control CHL cells. **CONCLUSION** The CHL-*UDPGT1A9* transgenic cell line established in this study expressed human *UDPGT1A9* protein and had metabolic activity to kaempferol. **Key words:** glucuronosyltransferase; transgenic, cell line; chromatography, high pressure liquid; kaempferol

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China(C30100232); and by National Natural Science Foundation of China(32025047); and by Natural Science Foundation of Zhejiang Province(C300487)

\* Corresponding author.

(本文编辑 石涛)