

人 $\beta 4\text{GalT II}$ 基因在哺乳动物细胞株中的表达与定位

徐雪琴, 潘林鑫, 耿慧武, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 运用基因克隆技术构建人源 $\beta 1,4$ -半乳糖转移酶 II ($\beta 4\text{GalT II}$) 真核表达质粒, 并将其转染到 COS7 细胞中, 观察蛋白在细胞内的定位, 同时转染到 HEK 293T 细胞中检测其表达。方法 分别设计带 FLAG 标签和 GFP 标签的 $\beta 4\text{GalT II}$ 基因的特异性引物, 以含人 $\beta 4\text{GalT II}$ 全长 cDNA 序列为模板, 定向构建到 pcDNA3.1(+) 及 pCDGFP 真核表达载体中, 构建重组表达质粒。通过酶切和测序鉴定阳性重组质粒, 利用 Lipofectamine 2000 分别转染 COS7、HEK 293T 细胞, 免疫荧光显微镜观察重组蛋白在细胞内的定位, Western blot 法鉴定重组蛋白的表达。结果 成功构建 pcDNA3.1- $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和 pCDGFP- $\beta 4\text{GalT II}$ 重组表达载体, 定位实验表明: $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和 GFP- $\beta 4\text{GalT II}$ 二者在 COS7 细胞中均主要定位在细胞核周围, 并有明显的块状染色, 胞核中未见明显分布; Western blot 法检测显示重组 $\beta 4\text{GalT II}$ 蛋白在 HEK 293T 细胞中稳定表达。结论 获得了人 $\beta 4\text{GalT II}$ 的真核表达质粒, 并能在 COS7 和 HEK 293T 细胞中表达, 为进一步研究 $\beta 4\text{GalT II}$ 的功能及其与其他蛋白的相互作用奠定了一定基础。

关键词 $\beta 4\text{GalT II}$; 转染; 细胞定位; 蛋白表达

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)11-1610-05

$\beta 1,4$ -半乳糖转移酶 II ($\beta 1,4$ -galactosyltrans-

ferase II, $\beta 4\text{GalT II}$) 是 $\beta 1,4$ -半乳糖转移酶家族的一员, Raquel 利用 EST 数据库独立发现的, 其与家族中首个被发现的 $\beta 4\text{GalT I}$ 有高达 55% 的序列同源性, 在胎脑中表达较高, 在心脏、骨骼肌、胰腺、睾丸、前列腺、卵巢、小肠中也均有表达^[1-3]。人 $\beta 4\text{GalT II}$ 基因定位于 1p34-p33, 包含 10 个外显子, 基因全长 111 970 bp, mRNA 全长 2 209 bp, 编码含 372 个氨基酸残基的约 42 ku 的 $\beta 4\text{GalT II}$ 蛋白^[1,4]。 $\beta 4\text{GalT II}$ 与大多数的糖基转移酶有着相似的结构域, 主要包括短的胞质区 N-末端肽段、跨膜结构域以及催化结构域, 其跨膜结构域可能对其在高尔基复合体上的定位是至关重要的^[5]。该研究通过在 pcDNA3.1(+) 载体及 pCDGFP 载体的多克隆位点插入 $\beta 4\text{GalT II}$ 的 cDNA 片段, 分别构建了带 FLAG 标签的真核表达质粒 pcDNA3.1- $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和带 GFP 标签的真核表达质粒 pCDGFP- $\beta 4\text{GalT II}$, 并将其转染进 COS7 和 HEK 293T 细胞中, 初步观察 $\beta 4\text{GalT II}$ 在哺乳动物细胞内的定位及表达情况, 为后续探究该蛋白的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞 含人 $\beta 4\text{GalT II}$ 全长 cDNA 序列的模板由安徽医科大学李俊教授提供; 质粒 pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司; pCDGFP 质粒、TG1 菌株、COS7 及 HEK 293T 细胞株均由安徽医科大学生物实验室保存。

1.2 主要试剂 PCR 引物合成和测序均由上海英

2015-07-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 徐雪琴, 女, 硕士研究生;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn

liver tissues and progressively down-regulated as liver fibrosis progressed. The expression of PICK1 was down-regulated in activated LX-2 induced by TGF- $\beta 1$. The hepatic stellate cell transfected with PICK1-plasmid showed remarkably decreased TGF- $\beta 1$ -induced α -SMA and Col1a1 expression and obviously declined phosphorylation levels of Smad2 and Smad3. **Conclusion** The expression of PICK1 decreases in fibrotic livers and activated hepatic stellate cell. Over-expression of PICK1 can suppress the activation of hepatic stellate cell induced by TGF- $\beta 1$, and probably because of the inhibitory effect on TGF- β /Smad pathway, which provides new ideas and targets for the prevention and treatment of liver fibrosis.

Key words PICK1; Liver Fibrosis; hepatic stellate cell

潍捷基生物工程有限公司完成; PrimerSTAR[®] HS DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司; EcoR I、BamH I、Xho I 限制性核酸内切酶、小牛肠碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶及 Lambda DNA Marker 购自 Fermentas 公司; DNA 胶回收试剂盒和质粒小量抽提试剂盒购自 Axygen 公司; 蛋白 Marker 购自 BioRad 公司; DMEM 完全培养基、胎牛血清分别购自 Hyclone 公司和 Gibco 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000、Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司; 细胞裂解液和一抗稀释液购自上海碧云天公司; Flag 一抗购自 Sigma 公司; GFP 一抗购自 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 与罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司; 荧光封片胶购自 Dako 公司; 显色试剂盒购自 Pierce 公司; 其他试剂均为国产分析纯或符合实验要求。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 以含人 $\beta 4\text{GalT II}$ 全长 cDNA 序列为模板, 设计 2 对引物, 使用 PrimerSTAR[®] HS DNA Polymerase 进行 PCR, 分别扩增出 $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和 $\beta 4\text{GalT II}$ 引物序列见表 1。将 PCR 所得产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 按照胶回收试剂盒方法进行纯化回收。纯化回收的 $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和 pcDNA3.1(+) 载体分别用 Xho I 和 EcoR I 进行双酶切; 纯化回收的 $\beta 4\text{GalT II}$ 和 pCDGFP 载体分别用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切。酶切后的片段和载体经 DNA 凝胶纯化后分别连接, 得到 pcDNA3.1- $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和 pCDGFP- $\beta 4\text{GalT II}$ 。重组质粒转化 TG1 感受态细胞, 挑取单克隆进行液体震荡培养后抽提质粒, 酶切鉴定正确的重组质粒送上海英潍捷基生物工程有限公司测序。测序结果登录 NCBI 与 $\beta 4\text{GalT II}$ 序列作 BLAST 分析。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
$\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG-S1m	5'-CCGGAATTCGGGGCCACCATGAGCAGACTGCT-3'
$\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG-A1m	5'-CCGCTCGAGCGGTCACTTGTCTCATCTCTTTG TAGTCGCCCCGAGGGGCCA-3'
GFP- $\beta 4\text{GalT II}$ -S1m	5'-CCGGGATCCGCGAGCCACCATGAGCAGACTGCT-3'
GFP- $\beta 4\text{GalT II}$ -A1m	5'-CCGGAATTCGGGGCCCGAGGGGCCA-3'

1.3.2 细胞培养 COS7 细胞和 HEK 293T 细胞使用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 的青、链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中进行培养。当细胞铺满培养皿底部时传代。

选用对数生长期细胞进行实验。

1.3.3 细胞转染 转染前 24 h, 用胰酶消化细胞, 以 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于 60 mm 培养皿, 用于免疫荧光实验的培养皿中预先放入经多聚赖氨酸包被的盖玻片, 用无抗生素的完全培养基 37 °C、5% CO₂ 恒温培养至次日对数生长期, 使细胞达到 90% 以上的汇合度(转染到 COS7 细胞中观察荧光定位的细胞汇合度只需要达到 30% ~ 40% 的汇合度)。转染实验根据 Lipofectamine 2000 试剂说明书进行。转染后 4 ~ 6 h 换新鲜的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。转染 24 h 后进行免疫荧光制片, 用荧光显微镜观察蛋白的荧光定位或者 48 h 后收集细胞, 从 HEK 293T 细胞中提取蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳以及 Western blot 检测。

1.3.4 $\beta 4\text{GalT II}$ 蛋白的表达和定位 取转染后 24 h 左右的细胞培养皿, 弃培养基, 预冷的 PBS 清洗 3 次, 弃去 PBS; -20 °C 预冷的甲醇固定 5 min, 吸弃甲醇; 70% 的乙醇溶液固定 5 min, 弃乙醇; PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 弃 PBS(若为 GFP 标签就直接行 DAPI 染核); 含 1% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 30 min, 弃封闭液; FLAG 一抗(1:100 比例用封闭液稀释)室温下孵育 2 h, 弃一抗; 封闭液清洗 3 次, 每次 5 min; 将 TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:100)室温下孵育 1 h, 弃二抗; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DAPI 溶液 100 μl 室温染核 2 min, 弃 DAPI; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用滤纸吸尽盖玻片上的残液, 用荧光封片胶(Dako)将盖玻片封于洁净的载玻片上; 4 °C 避光储存, 次日在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.5 Western blot 检测 转染 48 h 后, 收集 HEK 293T 细胞以提取总蛋白。加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 冰上裂解 30 min; 4 °C、14 000 r/min 离心 15 min; 取适量上清液加入等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min 后冰浴冷却; 经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 100 V 恒压电转 1 h 至 PVDF 膜上; 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h; 加入 FLAG 一抗或 GFP 一抗(1:500 稀释), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜后, 用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗或山羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释)室温孵育 1.5 h; TBST 洗膜后, 暗室 ECL 显影。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 $\beta 4\text{GalT II}$ PCR 扩增产物的鉴定及重组表达

质粒的酶切鉴定 抽提的重组质粒 pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG 使用 EcoR I、Xho I 双酶切, pCDGFP- β 4GalT II 则使用 EcoR I、BamH I 双酶切, 经与 DNA Marker 比对, 一条位于酶切空载体 pcDNA3.1 (5 400 bp)、pCDGFP (6 100 bp) 处, 另一条目的条带位于 1 119 bp 处, 表明连接成功, 见图 1。

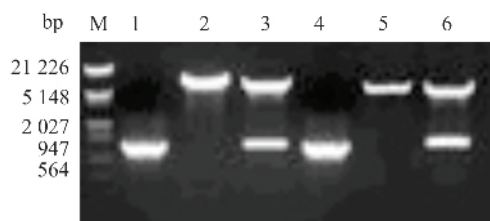


图1 重组质粒 pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG、pCDGFP- β 4GalT II 的酶切鉴定

M: λ DNA/EcoR I + Hind III Marker; 1: GFP 标签的 β 4GalT II PCR 产物; 2: 酶切载体 pCDGFP; 3: 酶切重组质粒 pCDGFP- β 4GalT II; 4: FLAG 标签的 β 4GalT II PCR 产物; 5: 酶切载体 pcDNA3.1 (+); 6: 酶切重组质粒 pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG

2.2 测序结果的比对 将酶切鉴定正确的两种不同标签的质粒测序结果与 NCBI 上公布的 β 4GalT II 进行核酸序列和蛋白质序列比对, 核苷酸序列均与 β 4GalT II 相同, 且氨基酸编码正确。质粒测序结果证实插入片段的测序结果与 β 4GalT II 全长序列完全一致, 说明重组表达质粒 pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG、pCDGFP- β 4GalT II 构建正确, 见图 2。

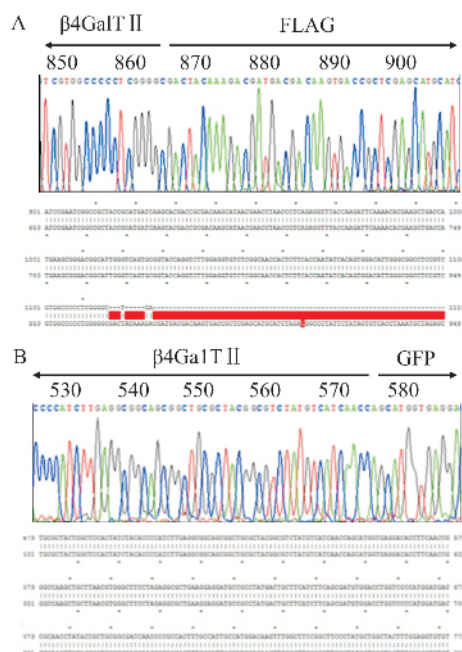


图2 pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG、pCDGFP- β 4GalT II 测序鉴定
A: pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG 测序图及序列比对图; B: pCDGFP- β 4GalT II 测序图及序列比对图

2.3 β 4GALT II 蛋白在 COS7 细胞内的定位 GFP 蛋白在 COS7 细胞中的表达弥散分布在整个细胞中, 但两种不同标签的 β 4GALT II 蛋白均在 COS7 细胞中表达在细胞核周围, 并有明显的块状染色, 胞核中未见明显分布, 见图 3。

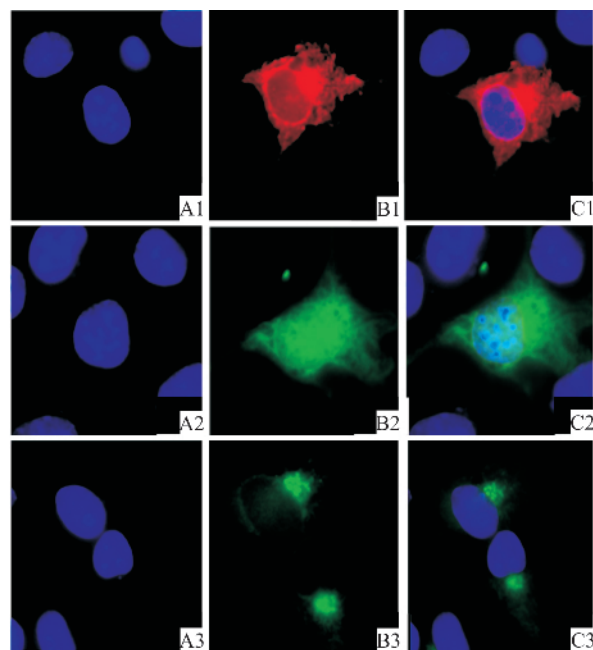


图3 β 4GALT II 在 COS7 细胞中的定位 $\times 1\ 000$

A1、A2、A3: DAPI 染色(蓝色)示细胞核; B1: TRITC 染色(红色)示 β 4GalT II-FLAG 在 COS7 细胞中的定位; B2: (绿色)示意 GFP 蛋白在 COS7 细胞中的定位; B3: (绿色)示意 GFP- β 4GalT II 在 COS7 细胞中的定位; C1、C2、C3: 分别表示 A1 与 B1、A2 与 B2 及 A3 与 B3 叠加的图像

2.4 β 4GALT II 蛋白在 HEK 293T 细胞中的表达

经过 Western blot 检测, 在转染 pcDNA3.1 (+) 空载体的 HEK 293T 细胞裂解液泳道内未出现泳带, 而转染 pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG 的 HEK 293T 细胞裂解液中检测到一条约 42 ku 的条带, 这与 β 4GalT II-FLAG 表达的蛋白分子量大小一致; 与此相对应的是, 在转染 pCDGFP 空载体的 HEK 293T 细胞裂解液中出现一条约 27 ku 的条带, 转染 pCDGFP- β 4GalT II 的 HEK 293T 细胞裂解液中检测到一条约 70 ku 的条带, 这与 GFP 绿色荧光蛋白及 GFP- β 4GalT II 融合蛋白的大小也完全一致。结果表明 β 4GalT II 蛋白在 HEK 293T 细胞中能够有效表达, 见图 4。

3 讨论

本研究将 β 4GalT II 分别与 pcDNA3.1 (+) 和

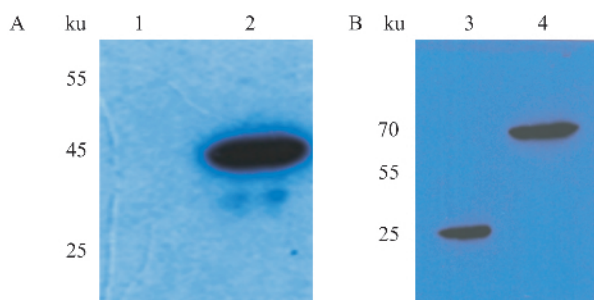


图4 Western blot 检测 $\beta 4$ GALT II 蛋白表达

A: α -FLAG; 1: 转染 pcDNA3.1 空载体的 HEK 293T 细胞裂解液; 2: 转染 pcDNA3.1- $\beta 4$ GALT II-FLAG 的 HEK 293T 细胞裂解液; B: α -GFP; 3: 转染 pCDGFP 空载体的 HEK 293T 细胞裂解液; 4: 转染 pCDGFP- $\beta 4$ GALT II 的 HEK 293T 细胞裂解液

pCDGFP 空载体融合,首次选用贴壁牢固、铺展较开的 COS7 细胞,并且运用免疫荧光显微镜成功地观察到 $\beta 4$ GALT II 蛋白在该细胞内的定位情况。加之结合 DAPI 染核技术,细胞核显示出蓝色荧光,能够清楚地展示细胞核及其周边情况,从而有效地保证了定位的准确性。由于蛋白标签的引入可能会对蛋白的定位产生干扰,为了更为直观地展示出 $\beta 4$ GALT II 蛋白的定位情况,在构建 FLAG 标签的 $\beta 4$ GALT II 真核表达载体进行荧光定位的同时,又构建了 GFP 标签的 $\beta 4$ GALT II 真核表达载体同步进行荧光定位对比。同时辅以 GFP 空白对照作为报告基因共同研究该蛋白的亚细胞定位,避免假象干扰实验,得出错误结论。结果由图 3 可知: GFP 蛋白在 COS7 细胞中的表达弥散分布在整個细胞中,但两种不同标签的 $\beta 4$ GALT II 蛋白在 COS7 细胞中均表达在细胞核周围,并有明显的块状染色,荧光强度远超过胞质其他部位,胞核中未见明显分布,定位没有因标签改变而发生明显变化,这些结果表明,标签融合到主体蛋白 $\beta 4$ GALT II 中进行靶向标记并未造成其分子结构的空間位阻,导致荧光蛋白的互补结合失败,因而便于笔者后续研究中通过互换标签方式,正反向检测与之结合的蛋白分子间的相互作用。

HEK 293T 细胞作为一种表达 SV40 病毒 T 抗原的细胞系,增殖速度快,转染效率高,蛋白表达水平高,较易检测,非常适用于外源基因的过表达分析。本研究首次选用 HEK 293T 细胞探究 $\beta 4$ GALT II 蛋白的表达,图 4 显示两种标签的 $\beta 4$ GALT II 蛋白均可在 HEK 293T 细胞稳定表达,这为该基因在 HEK 293T 细胞内进行功能研究的转染表达实验提供了依据。

$\beta 1-4$ -半乳糖转移酶($\beta 4$ GalTase)家族迄今为止已知含有 7 个家族成员($\beta 4$ GalT I-VII)。据氨基酸序列比对和系统发育学分析, $\beta 4$ GalTase 家族又可分为 4 个亚族,属于 II 型膜蛋白^[16]。近年来对 $\beta 4$ GalT I 结构和功能的研究较为广泛,但对与其同源性最高的 $\beta 4$ GalT II 的研究还不多。有研究^[3,7-8]显示 $\beta 4$ GalT II 和 $\beta 4$ GalT I、 $\beta 4$ GalT IV 共同参与哺乳动物体内大多数 N-寡糖链的生物合成,其作用是以催化从 UDP-半乳糖苷转移到 N-多糖复合物末端的 N-乙酰氨基葡萄糖上,形成 $\beta-1,4$ 糖苷键,以对蛋白质进行糖链修饰,从而参与糖复合物的形成。也有研究^[5,7]表明, $\beta 4$ GalT II 依赖其高尔基复合体定位发挥促凋亡作用,同时,该机制的调节是因为 $\beta 4$ GalT II 可能作为 p53 转录因子的靶基因参与了 p53 介导的由 DNA 损伤剂诱导的 Hela 细胞凋亡。同时,Kouno et al^[9]的研究认为 $\beta 4$ GalT II 能与葡萄糖醛酸转移酶(GlcAT-P)形成复合物,参与 HNK-1 聚糖的合成,从而间接地参与突触可塑性及树突的成熟。还有研究^[10]显示 $\beta 4$ GalT II 可作为参与聚糖合成的主要调节因子,参与神经发育中糖链的合成。既往研究^[4-6,9]报道 $\beta 4$ GalT II 蛋白在人类白血病细胞(K562、K562/ADR、HL60、HL60/ADR、NB4、NB4/ADR、U937、U937/ADR)及骨髓单核细胞(BMMC)、增殖表皮癌细胞(Hela)、昆虫细胞(Sf-9)、小鼠神经母细胞瘤细胞(N2a)等多种细胞中均可表达且发挥不同的作用。即使如此,人们对 $\beta 4$ GalT II 的生理功能尚知之不多,仍在进一步探索中。

笔者所在的研究组在早期的酵母双杂交文库筛选工作中利用诱饵蛋白筛选到 $\beta 4$ GalT II 基因的蓝色克隆,因而本研究运用基因克隆技术构建两种不同标签的 $\beta 4$ GalT II 真核表达载体,并首次报道了 $\beta 4$ GalT II 转染进 COS7 的定位情况,鉴于该蛋白在核周围明显的块状染色情况,提示其可能定位于某个细胞器上,关于其精确的亚细胞定位尚需 $\beta 4$ GalT II 与可能的细胞器特异标记分子的共定位实验进行证实。同时也将 $\beta 4$ GalT II 蛋白首次转染进 HEK 293T 细胞内,初步探索了人 $\beta 4$ GalT II 在哺乳动物细胞内的表达情况。本研究为课题组进一步研究 $\beta 4$ GalT II 的分子功能及其与从人类 Hela 细胞的 cDNA 基因文库中筛选出该蛋白的诱饵蛋白之间的相互作用及其作用机制奠定了非常重要的基础,后续实验将对此做更深入的研究。

参考文献

- [1] Lo N W, Shaper J H, Pevsner J, et al. The expanding β 4-galactosyltransferase gene family: messages from the databanks[J]. *Glycobiology*, 1998, 8(5): 517–26.
- [2] Almeida R, Amado M, David L, et al. A family of human β 4-galactosyltransferases cloning and expression of two novel UDP-galactose: β -N-acetylglucosamine β 1-4-galactosyltransferases, β 4Gal-T2 and β 4Gal-T3 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(51): 31979–91.
- [3] Furukawa K, Sato T. Beta-1-4-Galactosylation of N-glycans is a complex process[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473(1): 54–66.
- [4] Zhou H, Ma H, Wei W, et al. B4GALT family mediates the multi-drug resistance of human leukemia cells by regulating the hedgehog pathway and the expression of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e654.
- [5] Jiang J, Zhou J, Wei Y, et al. β 4GalT-II increases cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells depending on its Golgi localization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(1): 41–6.
- [6] Guo S C, Sato T, Shirane K, et al. Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human β -1-4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells [J]. *Glycobiology*, 2001, 11(10): 813–20.
- [7] Zhou J, Wei Y, Liu D, et al. Identification of β 1-4GalTII as a target gene of p53-mediated HeLa cell apoptosis [J]. *J Biochem*, 2008, 143(1): 547–54.
- [8] Huang Q, Shur B D, Begovac P C. Overexpressing cell surface β 1-4-galactosyltransferase in PC12 cells increases neurite outgrowth on laminin [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(2): 839–47.
- [9] Kouno T, Kizuka Y, Nakagawa N, et al. Specific enzyme complex of β -1-4-galactosyltransferase-II and glucuronyltransferase-P facilitates biosynthesis of N-linked human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate [J]. *J Bio Chem*, 2011, 286(36): 31337–46.
- [10] Sasaki N, Manya H, Okubo R, et al. β 4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(1): 131–7.

The expression and localization of β 4GalT II in mammalian cell lines

Xu Xueqin, Pan Linxin, Geng Huiwu, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the eukaryotic expression plasmids tagged FLAG or GFP of β 4GalT II gene by PCR, then the plasmids were transfected into COS7 cells respectively to investigate the localization of recombinant proteins. They were also transfected into HEK 293T cells to define their expression. **Methods** Specific primers with FLAG or GFP tag were designed for β 4GalT II gene. The gene encoding β 4GalT II was amplified directly by PCR using cDNA fragment as template. Then the amplified products were ligated into the eukaryotic expression vectors pcDNA3.1(+) and pCDGFP to construct recombinant plasmids. Both of the plasmids were confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The plasmids were transfected into COS7 and HEK 293T cells respectively via Lipofectamine 2000 Reagent. The localization and expression of the recombinant proteins in cells were examined by the fluorescence microscopy or Western blot. **Results** The pcDNA3.1- β 4GalT II-FLAG and pCDGFP- β 4GalT II recombinant expression vectors were successfully constructed and expressed in eukaryotic cells. The results which observed by the fluorescence microscope demonstrated that both β 4GalT II-FLAG and GFP- β 4GalT II proteins were predominantly detected in the perinuclear spot and showed obvious signs of massive dying, and they were not distributed in the nucleus evidently. Western blot identified that both of the β 4GalT II tagged FLAG and GFP could express stably in HEK 293T cells. **Conclusion** Construction of eukaryotic expression recombinant plasmids of β 4GalT II gene provides some basis for further function studies of β 4GalT II in cells and their interaction with other proteins.

Key words β 4GalT II; transfection; cellular localization; protein expression