

钠钾泵 $\beta 2$ 亚基 C 末端编码区酵母双杂交载体的构建与表达^{*}

李 谋^{1,2}, 王春丽², 刘小林¹, 张成岗²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 军事医学科学院 放射医学研究所, 北京 100850)

[摘 要] 以人胎儿脑 cDNA 文库为模板克隆了钠钾泵 $\beta 2$ 亚基 C 末端编码区(NKA $\beta 2_{ct}$), 构建了表达载体 pGBKT7-NKA $\beta 2_{ct}$, 并对其进行了表达, 对表达产物进行了检测。结果表明, NKA $\beta 2_{ct}$ 长 690 bp, pGBKT7-NKA $\beta 2_{ct}$ 酵母表达载体构建成功, 在酵母中表达良好, 可用于后续的酵母双杂交文库筛选工作。

[关键词] 钠钾泵 $\beta 2$ 亚基; 载体构建; 酵母表达

[中图分类号] Q 782

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0001-04

钠钾泵(Na^+ , K^+ -ATPase)是由 Skou 于 1957 年发现的^[1], 其广泛地分布于多种细胞的细胞膜上, 是体内重要的膜电位离子通道, 不仅参与细胞内外离子平衡、膜兴奋传导、递质释放、蛋白质转运, 而且在胚胎发育、神经导向和细胞形态维持等方面发挥着重要作用。临床研究^[2-3]表明, 钠钾泵可能与脑损伤、糖尿病、神经性疾病等相关。作为细胞内离子调节的重要分子及药理学研究的重要靶点, 钠钾泵已成为国内外学者关注的热点。钠钾泵由 3 个亚基(α , β , γ)组成, 其中 α 亚基(包括 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$)为钠钾泵的催化亚基, 与阳离子结合、阳离子转运 ATP 水解及磷酸化密切相关; β 亚基(包括 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$)是钠钾泵的调节亚基, 是钠钾泵结构和功能必不可少的, 可与 α 亚基形成 α/β 二聚体调节钠钾泵的活性, 也可独立于 α 亚基单独发挥作用; γ 亚基为钠钾泵的非必需亚基, 必须与 α/β 亚基结合才能稳定表达^[4]。

钠钾泵 $\beta 2$ 亚基(NKA $\beta 2$)分布于中枢神经细胞、光感受细胞、神经胶质细胞中, 可与具有缺氧保护功能的携氧珠蛋白 NGB 相互作用^[5]。此外 NKA $\beta 2$ 还与脑的发育和神经损伤的修复等重要生命活动相关^[6-7], 然而在这些过程中 NKA $\beta 2$ 究竟如何发挥作用, 是否需要其他分子的参与, 是否还具有其他未知的功能, 目前尚不清楚。为了进一步明确其功能, 探讨其作用机制, 本试验构建了钠钾泵 $\beta 2$ 亚

基 C 末端编码区酵母双杂交表达载体, 以期为进一步用酵母双杂交筛选其相互作用蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及试剂 大肠杆菌 DH5 α 由军事医学科学院放射与辐射医学研究所提供; 限制性内切酶(Nde I 和 BamH I)、LA Taq 聚合酶、T4DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 人胎儿脑 cDNA 文库、酵母菌株 AH109、酵母表达载体 pGBKT7、酵母用培养基(SD-Tip, YPD)、酵母转化试剂盒、myc 抗体均购自 Clontech 公司; 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、半硫酸腺嘌呤均购自 Sigma 公司。

1.1.2 钠钾泵 $\beta 2$ 亚基 C 末端编码区扩增的引物 为构建钠钾泵 $\beta 2$ 亚基 C 末端编码区(62~290 氨基酸, NKA $\beta 2_{ct}$), 分别设计上游引物 pU-HsNKA $\beta 2$ -pGBKT7 和 pD-HsNKA $\beta 2$ -pGBKT7。pU-HsNKA $\beta 2$ -pGBKT7 序列为 5'-GCT CATATG CTG CAG ACT GTC TCC-3'; pD-HsNKA $\beta 2$ -pGBKT7 序列为 5'-CGG GGA TCC TCA GGT TTT GTT GAT GCG-3'。上游引物分别设有 Nde I 和 BamH I 酶切位点(下划线碱基)。引物由上海博亚公司合成, 预期扩增片段长度

* [收稿日期] 2005-09-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(90208017); 军事医学科学院科技创新启动基金项目(0402013)

[作者简介] 李 谋(1980-), 女, 陕西临潼人, 在读硕士, 主要从事分子遗传学研究。

[通讯作者] 刘小林(1961-), 男, 陕西城固人, 教授, 博士生导师, 主要从事遗传育种研究。E-mail: xiaolinliu2000@sina.com

为 690 bp, 工作浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 方法

1.2.1 NKA β_{ct} cDNA 的 PCR 扩增 以人胎儿脑 cDNA 文库为模板, 用 LA *Taq* 聚合酶扩增 NKA β_{ct} cDNA 序列。PCR 反应体系为: ddH₂O 33.5 μL , dNTP 4 μL , 上、下游引物各 1 μL , 模板 1 μL , 聚合酶 LA *Taq* 0.5 μL 。PCR 扩增条件为: 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s, 58 退火 30 s, 72 延伸 90 s, 循环 30 次; 72 延伸 10 min。对扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 表达载体 pGBKT7-NKA β_{ct} 的构建与鉴定 用凝胶回收试剂盒回收 1.2.1 PCR 产物, 将其与 pGBKT7 载体按照摩尔比 10 : 1 混合, 于 16 条件下连接 16~20 h 后, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 利用含有 5×10^{-8} g/L 卡那霉素 (Kan⁺) 的 LB 培养基筛选阳性克隆。挑选阳性克隆, 提取质粒 DNA 进行 *Nde*I 和 *Bam*H I 双酶切及测序鉴定, 利用生物信息学软件对测序结果进行分析。大肠杆菌感受态的制备、阳性克隆的筛选及酶切鉴定参照《分子克隆实验指南》^[8] 中的方法进行。

1.2.3 pGBKT7-NKA β_{ct} 的表达 采用醋酸锂法转化, 将 pGBKT7-NKA β_{ct} 及阳性对照 pGBKT7-53 转化入酵母菌株 AH109, 涂布于 SD/-Trp 培养

基进行筛选。挑取生长良好的菌落接种于 SD/-Trp 液体培养基中培养过夜, 同时将阴性对照空菌 AH109 接种于 YPD 液体培养基中培养过夜, 提取上述表达产物酵母总蛋白。酵母感受态的制备、转化、蛋白样品的提取均参照 ClonTech 公司操作手册进行。

1.2.4 表达产物的分离纯化与鉴定 采用 125 g/L 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按常规方法对 1.2.3 中表达产物进行分离纯化, 用 myc 抗体对纯化的表达产物进行 Western blot 检测。

2 结果与分析

2.1 NKA β_{ct} 基因的扩增

由图 1 可知, NKA β_{ct} 基因的扩增片段长度为 690 bp, 与预期结果相符, 且未出现非特异扩增现象。

2.2 重组载体 pGBKT7-NKA β_{ct} 的鉴定

2.2.1 双酶切鉴定 重组产物 pGBKT7-NKA β_{ct} 采用 *Nde*I 和 *Bam*H I 进行双酶切, 酶切后分别得到约为 7 300 bp 和 690 bp 的片段 (图 2), 与预期结果相符。

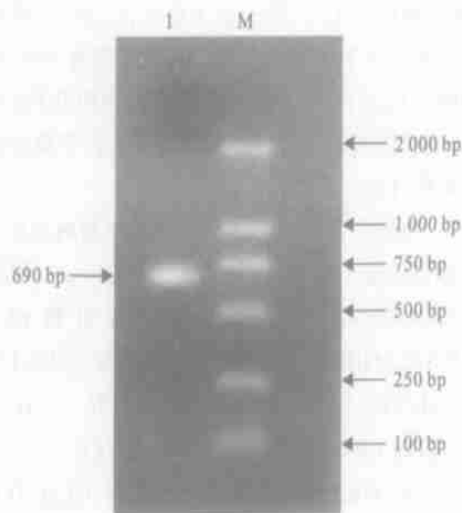


图 1 NKA β_{ct} 扩增产物的电泳结果

1 NKA β_{ct} 扩增产物; M: DNA 标准

Fig 1 Amplified products of NKA β_{ct} coding region

1 Amplified products of NKA β_{ct} ; M: Standard marker of DNA

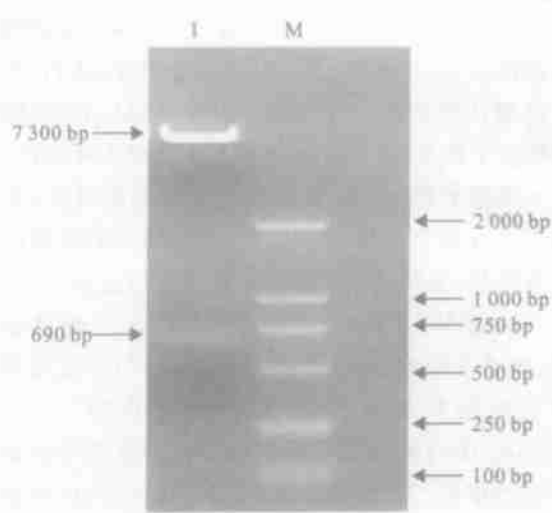


图 2 pGBKT7-NKA β_{ct} 的双酶切电泳图谱

1 pGBKT7-NKA β_{ct} *Nde*I + *Bam*H I 双酶切

产物电泳条带; M: DNA 标准

Fig 2 Fingerprint cut by *Nde*I and *Bam*H I

1 pGBKT7-NKA β_{ct} cut by *Nde*I and

*Bam*H I; M: Standard Marker of DNA

2.2.2 测序鉴定 通过序列比对分析发现, 目的基因片段 NKA β_{ct} 与 GenBank 中已发表的基因序列

(NM-134268) 完全一致^[2], 且开放阅读框架正确 (图 3), 表明酵母表达载体 pGBKT7-NKA β_{ct} 构建成功。

ATGNATGNATGNNTCANTCANTCAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGCTGCAGACTGTCTCCGACCATACCCCAAG
 x M x x S x x Q Q K L I S E E D L H M L Q T V S D H T P K
 TACCAGGACCGACTGGCCACACCGGGCTTGATGATTCCGCCCCAAGACTGAGAACCTTGATGTTCATTGTCAATGTGACAGACTGAAGC
 Y Q D R L A T P G L M I R P K T E N L D V I V N V S D T E S
 TGGGACCAGCATGTTCAGAAGCTCAACAAGTTCTTGGAGCCTTACAACGACTCTATCCAAGCCCAAAAGAATGATGTCTGCCGCCCTGGG
 W D Q H V Q K L N K F L E P Y N D S I Q A Q K N D V C R P G
 CGCTATTACGAACAGCCAGATAATGGAGTCTCAACTACCCCAAAAGTGCCTGCCAATTCAACCGGACCCAGCTGGGCAACTGCTCCGGC
 R Y Y E Q P D N G V L N Y P K R A C Q F N R T Q L G N C S G
 ATTGGGGACTCCACCCACTATGGTTACAGCACTGGGCAGCCCTGTGTCTTCATCAAGATGAACCCGGTCATCAACTTCTATGCAGGAGCA
 I G D S T H Y G Y S T G Q P C V F I K M N R V I N F Y A G A
 AACCAGAGCATGAATGTTACCTGTGCTGGGAAGCGAGATGAAGATGCTGAGAATCTCGGCAACTTCGTTCATGTTCCCGCCAAACGGCAAC
 N Q S M N V T C A G K R D E D A E N L G N F V M F P A N G N

图3 pGBKT7-NKA β ct 测序结果及推导的氨基酸序列

Fig. 3 Sequence of amino acid corresponding gene sequence of pGBKT7-NKA β ct

2.3 pGBKT7-NKA β ct 表达产物的检测

对1、2、3中表达产物总蛋白进行SDS-PAGE和Western blot分析,结果(图4)显示,阴性对照无表达,而转化了pGBKT7-NKA β ct的酵母提取物有明显条带,且大小与预期融合蛋白相符,说明pGBKT7-NKA β ct表达成功。

散^[10],同时与脑发育和脑缺氧密切的关系^[11],可能参与复杂的相互作用分子网络。但目前国内外还未见到NKA β 作用机制的相关报道,所以筛选其相互作用蛋白,进一步探讨相互作用机制的十分必要。而筛选NKA β 相互作用蛋白的首要任务就是构建合适的表达载体,且能成功表达。本试验构建了NKA β ct酵母双杂交表达载体,并在酵母菌株AH109中成功表达。

作为一种成熟的技术,酵母双杂交因其具有较高的敏感性和特异性,而被广泛地应用于蛋白质组学、功能基因组学相关领域的研究,成为检测蛋白质相互作用,发现新的作用蛋白,分析蛋白质结构和功能的有力工具。但酵母双杂交并非对所有蛋白质都适用,其要求所分析的融合蛋白必须定位于核内,才能激活报告基因。细胞膜蛋白由于不能被转运至细胞核内,因而其不适用此方法。而NKA β 由7个外显子组成,其中跨膜区为1个外显子,胞内包含6个外显子,所以本试验去掉跨膜区,构建了NKA β 亚基C末端编码区表达载体。

本研究从人胎儿脑cDNA文库中克隆得到NKA β 亚基去除跨膜区(即NKA β 亚基C末端编码区)690个碱基,首次将其定向克隆到酵母表达载体pGBKT7中,成功构建了NKA β 酵母表达载体pGBKT7-NKA β ct,并在酵母菌株AH109中获得表达,这为利用酵母双杂交筛选NKA β 相互作用分子鉴定了重要基础,为NKA β 亚基作用机制的探索提供了重要线索。

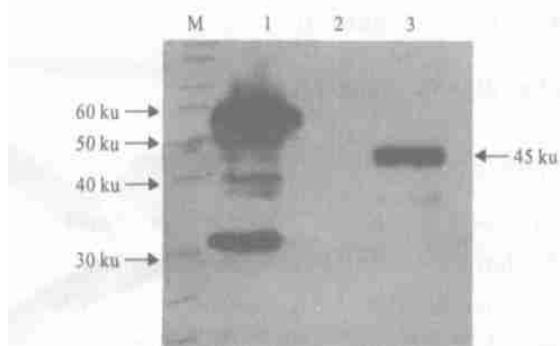


图4 pGBKT7-NKA β ct 表达产物的Western blot 检测

M. 蛋白分子量; 1. 阳性对照pGBKT7-53 载体;
 2. 阴性对照AH109 空菌; 3. pGBKT7-NKA β ct 载体

Fig. 4 Expression of pGBKT7-NKA β ct measured by Western blot

M. Protein marker; 1. Positive control pGBKT7-53 vector;
 2. Negative control AH109; 3. pGBKT7-NKA β ct vector

3 讨论

NKA β 具有广泛的生理作用,其不仅作为钠钾泵的调节亚基发挥作用,而且还作为 Ca^{2+} 依赖的神经胶质黏附分子在神经元与胶质细胞的相互作用中发挥重要作用^[9],可负向调控神经胶质瘤的扩

[参考文献]

- [1] Skou J C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1957, 23(2): 394-401.
- [2] Franzon R, Chiarani F, Mendes R H, et al Dietary soy prevents brain Na^+ , $\text{K}^{(+)}$ -ATPase reduction in streptozotocin diabetic rats[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2005, 69(2): 107-112.
- [3] Arteaga M F, Gutierrez R, Avila J, et al Regeneration influences expression of the Na^+ , K^+ -ATPase subunit isoforms in the rat peripheral nervous system [J]. *Neuroscience*, 2004, 129(3): 691-702.
- [4] 徐文琳, 钱令嘉, 张成岗, 等 Na^+ , K^+ -ATPase 研究进展[J]. *国外医学·生理·病理科学与临床分册*, 2003, 23(5): 531-534.
- [5] 徐文琳, 王春丽, 张永亮, 等 脑红蛋白与 Na^+ , K^+ ATP 酶 β 亚基的相互作用及作用位点的鉴定[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(9): 823-828.
- [6] Kawai H, Yasuda H, Terada M. et al Axonal contact regulates expression of α 2 and β 2 isoforms of Na^+ , K^+ -ATPase in Schwann cells: adhesion molecules and nerve regeneration[J]. *J Neurochem*, 1997, 69(1): 330-339.
- [7] Mobasher A, Oukrif D, Dawodu S P, et al Isoforms of Na^+ , K^+ -ATPase in human prostate: specificity of expression and apical membrane polarization[J]. *Histol Histopathol*, 2001, 16(1): 141-154.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Gloor S, Antonicek H, Sweadner K J, et al The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na^+ , K^+ -ATPase[J]. *J Cell Biol*, 1990, 110(1): 165-174.
- [10] Senner V, Schmidt peter S, Braune S, et al AMOG/ β 2 and glioma invasion: does loss of AMOG make tumour cells run amok? [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2003, 29(4): 370-377.
- [11] Magyar J P, Bartsch U, Wang Z Q, et al Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on Glia, the beta 2 subunit of murine Na, K-ATPase[J]. *J Cell Biol*, 1994, 127(3): 835-845.

Cloning and expression of Na^+ , K^+ -ATPase gene in yeast

L IMou^{1,2}, WANG Chun-li², L IU Xiao-lin¹, ZHANG Cheng-gang²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: The C-terminal of coding region of Na^+ , K^+ -ATPase β 2 subunit (NKA β 2ct) was cloned, and a recombinant plasmid allowing the expression in yeast for further study of the function was constructed. The coding region of NKA β 2ct was amplified at first from human brain cDNA library by using PCR technique and inserted into the yeast expression vector pGBKT7 followed with Western blotting technique. Results showed that NKA β 2ct yeast expression was successfully cloned for the two-hybrid system analysis, which would advance the functional study of NKA β 2.

Key words: NKA β 2; vector construction; yeast expression