文章编号:1000-5404(2012)13-1273-04

论著

破骨细胞钠氢转运蛋白关键位点研究

黄晓斌,仲蕾蕾 (400030 重庆,重庆大学农学及生命科学研究院)

[摘要] **目的** 在酿酒酵母中异源表达人破骨细胞分化成熟潜在因子钠氢转运蛋白2,对其关键氨基酸保守位点进行突变分析,鉴定其作为盐离子载体转运 Na^+ 的功能。**方法** 采用突变试剂盒依次把此蛋白的D278和D279 2个位点的天冬氨酸中1个氨基酸突变成半胱氨酸,得到2个不同位点突变的定点突变体;构建酵母双基因表达载体,通过电穿孔的方式转入到酵母菌株中;Western印迹检测2个定点突变基因在酵母菌株的表达;通过NaCl选择压力显示2个突变体在高盐环境中的相互作用,观察菌株的抗盐生长表型。**结果** 成功获得适合转化酵母的多个载体;在固体和液体培养基中,经半乳糖诱导后,各个载体均可使酵母异源表达钠氢转运蛋白2;生长曲线显示2个突变体可相互作用,部分恢复酵母菌株的抗盐能力。**结论** 钠氢转运蛋白2通过关键位点D278和D279 2,以形成二聚体的方式在细胞中发挥着钠离子转运功能。

[关键词] 破骨细胞;钠氢转运蛋白2;酿酒酵母
[中图法分类号] R329.26; R394-33; R394.2 [文献标志码] A

Key point of Na^+-H^+ antiporter to transport sodium in osteoclast

Huang Xiaobin, Zhong Leilei (Institute of Agriculture and Life Sciences, Chongqing University, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] Objective To express heterologously Na^+-H^+ antiporter 2 that potentially benefits the differentiation and maturation of the osteoclast in *Saccharomyces cerevisiae*, directly mutate the conservative key amino acid, and identify its function in transporting Na^+ as a salt transporter. Methods In turn mutating was carried out to make one of the two Asp of the antiporter into Cys by mutation kit. After two different mutants were achieved, two gene yeast vector was constructed to express them simultaneously in *Saccharomyces cerevisiae*. The obtained vectors were electroporated into yeast. The express of the two antiporter mutants in the strain was detected by Western blotting. Their interaction of the two mutants was observed by the growth curve of BW31a in high salty concentration medium. Results Several vectors which can be transformed into yeast was successfully constructed. Each vector expressed the Na^+-H^+ antiporter 2 in the yeast after induction by galactose in the solid or liquid medium. The growth curve revealed that the two mutants interacted to partly rescue the ability of yeast growing into high salt concentration medium. Conclusion The D278 and D279 sites are the key point for Na^+-H^+ antiporter 2, which transports sodium possibly through forming dimmer in cells to maintain their regular growth.

[**Key words**] osteoclast; Na^+-H^+ antiporter 2; *Saccharomyces cerevisiae*

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100029) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB1097). Corresponding author: Huang Xiaobin, E-mail: bmwzzhsh@gmail.com

pH值依赖的阳离子/质子载体(CPA)系统是催化单价阳离子的转运的离子系统,包括 Na^+、H^+、K^+、NH_4^+ 等。CPA家族包括CPA1、CPA2家族[1] NHA2(Na^+-H^+ Antiporter)是被最新认识到的离子载体,它属于CPA2家族中一个亚家族成员[2-4],其显著地表达于RANKL诱导的破骨细胞中[5]。NHA2主要负责 Li^+/Na^+ 的转运,但不能转运 K^+。研究证明NHA2可能与高血压、癌症等疾病有关[6]。人破骨细胞中的HsNHA2则可能与人的各种骨方面疾病有关。但目前

[基金项目] 国家自然科学基金(31100029);重庆市自然科学基金(CSTC2011BB1097)
[通信作者] 黄晓斌,E-mail: bmwzzhsh@gmail.com

我们对 NHA2 的作用机制还知之甚少[7]。通过对 NHA2 的关键作用位点研究,可以帮助我们更清楚地认识到 NHA2 的作用机制,也为我们今后的临床应用做理论基础。NhaA 是细菌中强 pH 值依赖的一个 $2H^+/1Na^+$ 钠盐离子载体,与 NHA2 同属于 CPA2 家族,已经被广泛研究。NhaA 在细胞膜中是以一个二聚体的形式来发挥作用的[8]。虽然细菌与哺乳动物遗传上距离很远,但 NhaA 与 NHA2 却有着高度的序列相似性,说明 NHA2 也可能有类似的构建结构。

本实验就是把 HsNHA2 2 个关键保守位点 D278 和 D279 的天冬氨酸突变成半胱氨酸,观察突变体在 BW31a 酵母系统中的盐载体能力。假设遗传上对 NhaA 载体功能、pH 调节非常重要的保守氨基酸对 HsNHA2 也同样重要,这些氨基酸的突变会影响整个 HsNHA2 在酵母中的盐转运能力,并且 HsNHA2 也同样有类似的二聚体。为了验证此假设,我们在酵母 BW31a 菌株中表达了突变的 HsNHA2,以此来评估所表达突变株对盐敏感表型救治作用。这 2 个保守氨基酸位点突变可能影响蛋白的二聚化作用,从而影响 HsNHA2 转运 Na^+ 功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 盐敏感型酿酒酵母菌株 BW31a (ena1-4Δ, nha1Δ);TOP10 感受态大肠杆菌购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 质粒 pCMV6-XL5-HsNHA2 购自 Origene 公司;pESC-URA Vector 酵母双表达载体够自 PHENIX Research 公司。

1.1.3 主要生化试剂 *Taq* DNA 聚合酶(Invitrogen);Apa (NEB);*Xba* Ⅰ (NEB);*Hind* Ⅲ (NEB);高保真 PCR 试剂盒(Invitrogen);质粒提取试剂盒(QIAGEN);突变试剂盒(NEB Phusion Site-directed Mutagenesis Kit); Anti-myc antibody (mouse)(Invitrogen);Anti-FLAG antibody (mouse)(Invitrogen); Rabbit Anti-mouse IgG HRP(Invitrogen)。

1.1.4 引物 HsNHA2:上游:5′-GCCATGGGGGATGAAGATAAAAG-3′,下游:5′-AACTTGCACAGAAGTCTCTCC-3′;D278C 单突变引物:上游:5′Phos-TGCATTCTGGCCATCACTGGCTTC-3′,下游: 5′Phos-ATCGAAGCTGCCAGCTGCCATGAG-3′;D279C 单突变引物:上游:5′Phos-GACATTCTGGCCATCACTGGCTTC-3′,下游:5′Phos-ACAGAAGCTGCCAGCTGCCATGAG-3′; D278 D279-C278 C279 双突变引物:上游: 5′Phos-TGCATTCTGGCCATCACTGGCTTC-3′,下游: 5′Phos-ACAGAAGCTGCCAGCTGCCATGAG-3′。

1.2 方法

1.2.1 构建质粒 构建 HsNHA2 质粒载体:设计引物把 HsNHA2 从 pCMV6-XL5-HsNHA2 扩增出来,设定好 PCR 程序:94 ℃ 2 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 45 s ;68 ℃ 延伸 4 min,30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。把 PCR 产物与 pESC-URA Vector 空载体连接,转化 TOP10 感受态大肠杆菌细胞,提取 pESC-HsNHA2 野生型质粒。

构建 HsNHA2′突变质粒:用 1 ng pCMV6-XL5-HsNHA2 作为模板,用突变引物进行扩增,具体操作步骤参照 NEB Phusion Site-directed Mutagenesis Kit 说明书。得到 pCMV6-HsNHAD278′和 pCMV6-HsNHAD279′突变质粒后,用 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ双酶切 HsNHA2′和 pESC-URA Vector 空载体,然后把 HsNHA278′或 HsNHA279′连接进入 pESC MCS2 克隆位点,转化后提取突变质粒:pESC-D278C′D279HsNHA2 和 pESC-D278D279C′HsNHA2。

构建双表达载体 pESC-D278C′D279-HsNHA-D278D279C′HsNHA:用 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ分别双酶切 pCMV6-HsNHAD278′和 pESC, 把 HsNHA278′连接进入 pESC MCS2 克隆位点;用 *Not* Ⅰ酶切 pCMV6-HsNHAD279′ 和 pESC-HsNHA278′, 然后把 HsNHA279′突变连接进入 pESC MCS1 克隆位点。转化 TOP10 感受态大肠杆菌细胞后,提取双表达载体质粒:pESC-D278C′D279-HsNHA2-D278D279C′HsNHA2。

1.2.2 质粒提取及酶切分析 质粒初步构建后用 QIAGEN mini Plasmid 试剂盒根据操作指南小量提取质粒,先供酶切分析,然后送测序单位测序。在酶切、测序确认后,做好 glycerol stock 菌种保存。同时用 QIAGEN® Plasmid Midi Kit 中量提取纯化质粒,以供后续转化之用。

1.2.3 制酵母感受态细胞 把 BW31a 接种到 50 ml YPD (添加 Adenine), 30 ℃ 200 r/min 培养过夜;取出培养过夜的 50 ml YPD 菌液,1 500 r/min 4 ℃离心 5 min,然后放在冰上;然后分别用 40、20、5 ml 冰冷的 1 mol/L Sorbitol 洗细胞,1 500 r/min 4 ℃离心 5 min,最后把细胞重新悬浮于 200 μl 冰冷的 Sorbitol,分装成 40 μl 每管待用。本实验室每次用的感受态细胞均为新鲜制备。

1.2.4 电转染酵母细胞 向 40 μl 制好的酵母感受态细胞中加入 1 μl (约 0.5 μg) 质粒 DNA。混匀后加入到电转小管,冰上放置 5 min;设置电转仪电压为 1.5 kV。电转完后,立刻加入 200 μl 1 mol/L Sorbitol;取 100 μl 电转完酵母细胞涂到 2% glucose YNB 板,然后 30 ℃培养;48 h 后,酵母克隆慢慢长出。

1.2.5 Western 检测 HsNHA2 及其突变体正常表达 单基因表达:电穿孔转化成功后,挑取克隆,用 2% Galactose YNB 溶液培养过夜,充分诱导 HsNHA2 表达。收集好细胞后用 Tris-Glycine SDS Sample Buffer(2×)处理;95 ℃ 加热 5 min,使蛋白变性;然后上样跑胶,转膜后用鼠抗 Anti-myc(1∶1000)作为第一抗体;4 ℃封闭过夜;用兔抗鼠 IgG HRP(1∶500)作为第二抗体。孵育、洗膜后,加入显影液,然后在 X-RAY 中曝光。

双基因表达:用鼠抗 Anti-FLAG 抗体(1∶1000)作为第一抗体,兔抗鼠 IgG HRP(1∶500)作为第二抗体,检测 279c 突变连接进入 pESC MCS1 位置后形成的 279C-HsNHA2-FLAG 复合蛋白;用鼠抗 Anti-myc 抗体(1∶1 000)作为第一抗体,兔抗鼠 IgG HRP(1∶500)作为第二抗体,检测 278c 突变连接进入 pESC

MCS2 位置后形成的 HsNHA2-myc 复合蛋白。其他步骤同上。

1.2.6 酵母生长表型鉴定 固体培养基上生长:在电转 HsNHA2 及其突变体后,把 BW31a 在固体培养板上接菌生长,观察其克隆抗盐生长表型异同。按如下步骤操作:配制不同浓度 NaCl 的 2% 半乳糖 YNB 琼脂板;用 YPD 培养过夜后,低速离心,重悬于 2% 半乳糖 YNB 中,调其浓度,使其浓度处于相同状态[D(600)值约 1.8];然后每突变克隆滴 6 孔,按 10 倍稀释倍数每孔滴加 3 μl,滴加完待板干后,放于 30 ℃培养,大概 4 d 后能对比出抗盐生长差异。

液体培养基上生长曲线的测定:对 HsNHA2 及其突变体电转后的 BW31a 菌在不同盐浓度 YNB 中进行生长曲线的测定。在用 YPD 培养过夜后,低速离心,重悬于 YNB 中,测其 D(600)值,分别加入到 10 ml 不同盐浓度的 2% 半乳糖 YNB 中,使其初始浓度处于相同状态[D(600)值约 0.05],然后每 12 小时测其 D(600)值 1 次,整个历程 72 h,根据所测 D(600)值做生长曲线。

2 结果

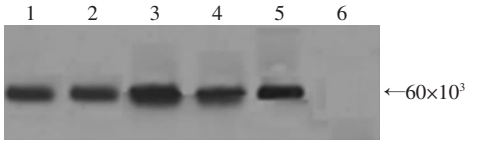
2.1 成功获得适合转化酵母的各个载体

pCMV6-XL5-HsNHA2 启动子只适合在哺乳动物中表达,因此从 PHENIX Research 公司购得适合酵母做宿主细胞的空质粒 pESC-URA Vector,根据这个质粒和 HsNHA2 基因序列,经过 PCR 和连接转化后得到 pESC-HsNHA2 野生型质粒。继而以 pCMV6-XL5-HsNHA2 作为模板,用 D278 和 D279 突变引物和突变试剂盒得到 pCMV6-HsNHA2′突变质粒后,双酶切 HsNHA2′和 pESC-URA Vector 空载体,连接转化后,分别得到突变质粒:pESC-D278C′ D279HsNHA 和 pESC-D278D279C′ HsNHA2。最后通过酶切连接后得到双表达载体:pESC-D278C′ D279-HsNHA-D278D279C′HsNHA2,最终结果经 PCR、酶切初步验证后,送测序公司测序验证。

2.2 经半乳糖诱导后,各个基因载体均可使 BW31a 异源表达 HsNHA2

首先把野生型 HsNHA2 克隆进入 pESC-URA Vector 酵母质粒载体 MCS2 位置,在 GAL1 启动子的控制下,经半乳糖诱导后,HsNHA2 基因可以被 GAL1 表达,表达出来的蛋白产物是 NHA2 与 myc 标签的融合蛋白,用抗 myc 的抗体就能检测 NHA2 的表达情况,这个表达的蛋白与 myc 融合之后在 60 × 10^3左右。用 pNHA1-985 GFP(表达酵母自身的 NHA1 载体蛋白)作为对照;所有构建好的质粒载体通过电转染的方法转入对盐敏感的 BW31a (ena1-4Δ nha1Δ)酵母菌株,此菌株缺少离子载体(Ena1-4 Na^+-ATPases and Nha1 Na^+/H^+ antiporter)。

为了证明 2 个不同突变的 HsNHA2 转入 pESC 的不同位置后,均能正常表达出来,以将来互相作用行使其转盐功能,分别用了不同的抗体来识别各自不同的蛋白标签做 Western 检测不同的融合蛋白。用鼠抗 Anti-FLAG 抗体检测 HsNHA2-279c′-FLAG 复合蛋白;用鼠抗 Anti-myc 抗体检测 278c′-HsNHA2-myc 复合蛋白,结果如图 1 所示。

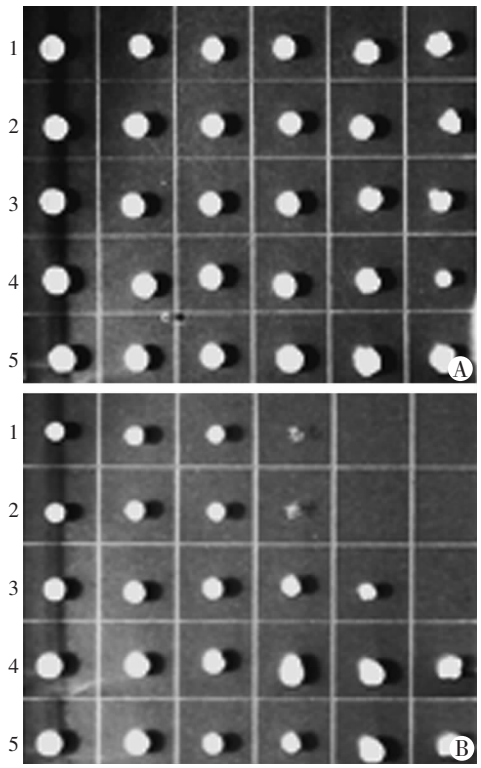


1:pESC-D278′ D279HsNHA2 突变质粒(Anti-myc);2:pESC-D278D279′HsNHA2 突变质粒(Anti-myc);3:pESC-D278′ D279 HsNHA2-D278D279′ HsNHA2-1 (Anti-myc);4:pESC-D278′ D279 HsNHA2-D278D279′HsNHA2-2(Anti-myc);5:野生型 HsNHA2(Anti-myc);6:对照 pNHA-985(Anti-myc)

图 1 野生型 HsNHA2 与突变 HsNHA2 在 BW32a 中的表达

2.3 HsNHA2 及其突变体在 YNB 培养基中的生长表型

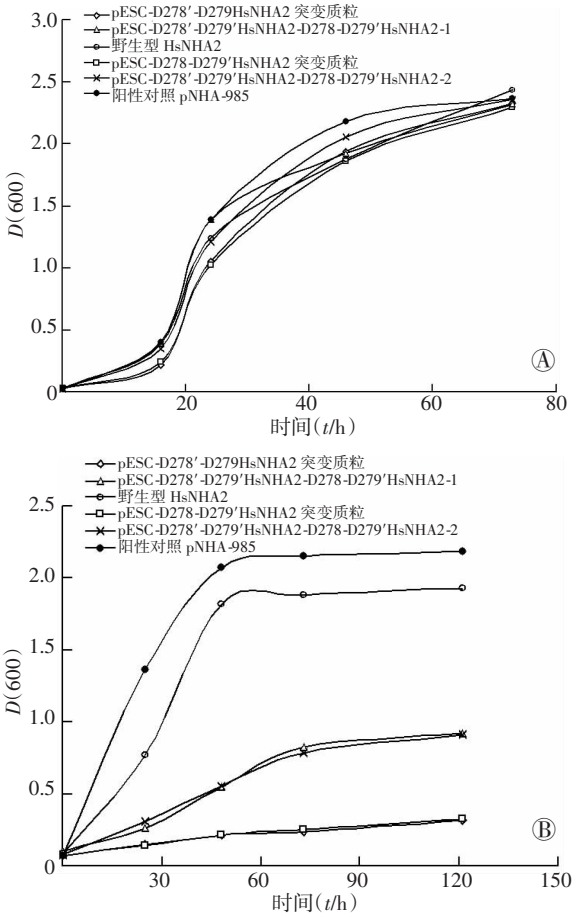
细菌 NhaA 已经被报道是作为一个二聚体发挥作用的,因此我们推测 HsNHA2 也可能是以二聚体的形式发挥作用。为了验证这个假设,我们把 2 个单基因质粒和双基因质粒及野生型 HsNHA2 BW31a 菌株分别在固体 YNB 培养基和液体 YNB 培养基中生长,观察其生长表型。因为 pESC 质粒包括 GAL1 和 GAL10 2 个作用方向相反的酵母启动子,这样就允许同时表达 2 个基因。结果表明 D278 和 D279 2 个位点对 HsNHA2 非常重要,突变后不能在 0.4 mol/L NaCl 培养基中耐盐生长;但在 0.2 mol/L NaCl 固体培养基中,双基因表达可使 BW31a 部分恢复野生型抗盐功能,如图 2 所示。在 0.4 mol/L NaCl YNB 液体培养基中,D278C 和 D279C 突变也能通过相互作用后能部分地恢复抗盐功能表型,如图 3 所示。这些结果说明 HsNHA2 与 NhaA 一样可以形成二聚体发挥作用。



A:0 mol/L NaCl;B:0.2 mol/L NaCl

1:pESC-D278′D279HsNHA2 突变质粒;2:pESC-D278D279′HsNHA2 突变质粒;3:pESC-D278′D279 HsNHA2-D278D279′HsNHA2 双基因的两个重复;4:野生型 HsNHA2;5:阳性对照 pNHA-985

图 2 野生型 HsNHA2 与突变 HsNHA2 酵母在固体 YNB 中生长表型



A:野生型 HsNHA2;B:突变 HsNHA2

图3 野生型 HsNHA2 与突变 HsNHA2 酵母在液体 YNB 中生长

3 讨论

CPA1 家族中的 Na^+-H^+ 交换泵(Na^+/H^+ exchanger,NHE)是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白。已经有 10 个 NHE 亚型被鉴定。NHE 的功能障碍会引起高血压、癫痫、心律不齐、腹泻、青光眼以及胃肠道病和肾脏以及各种肿瘤等方面的疾病[9]。以此家族基因作为靶点在基因治疗中有着重大的潜力和意义,目前已展开多方面的研究[10]。但大多数真核生物中的 CPA2 家族成员还不为我们所知。研究发现在哺乳动物中,普遍存在着与真菌 NHA 和细菌 Nha 高度同源的 NHA2 基因,他们都属于 CPA2 家族成员,钠-氢转运体(NHA)已经被报道在破骨细胞里面可以通过影响质子浓度来调节骨吸收作用,从而调节细胞盐离子水平,进一步调节与离子浓度有关的生理代谢。

经过序列比对,发现 NhaA、HsNHA2 及其他同源物中,许多氨基酸残基序列是相当保守的。细菌 NhaA 的两个相邻天冬氨酸残基对其载体功能非常重要,通过本实验,我们发现此两保守位点同样在其同源类似物 HsNHA2 中,也是一样起着非常重要的作用,当突变后就不能在高盐溶液中生长。

虽然到目前为止,我们对 CPA2 家族的 NHA2 还知之甚少,因此我们对 HsNHA2 的研究,将为某些疾病的治疗探索新途径和提供新思路,具有重要的理论意义和实践意义。但 HsNHA2 的作用机制仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] Slepkov E R, Rainey J K, Sykes B D, *et al*. Structural and functional analysis of the Na^+/H^+ exchanger[J]. Biochem J, 2007, 401(3): 623 – 633.

[2] Lee S H, Kim T, Park E S, *et al*. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na^+/H^+ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected] Biochem Biophys Res Commun. 2008; 369(2): 320 – 326.

[3] Rheault M R, Okech B A, Keen S B, *et al*. Molecular cloning, phylogeny and localization of AgNHA1: the first Na^+/H^+ antiporter (NHA) from a metazoan, Anopheles gambiae[J]. J Exp Biol, 2007, 210(Pt 21): 3848 – 3861.

[4] Xiang M, Feng M, Muend S, *et al*. A human Na^+/H^+ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(47): 18677 – 18681.

[5] Battaglino R A, Pham L, Morse L R, *et al*. NHA-oc/NHA2: a mitochondrial cation-proton antiporter selectively expressed in osteoclasts [J]. Bone, 2008, 42(1): 180 – 192.

[6] Schushan M, Xiang M, Bogomiakov P, *et al*. Model-guided mutagenesis drives functional studies of human NHA2, implicated in hypertension[J]. J Mol Biol, 2010, 396(5): 1181 – 1196.

[7] Xiang M A, Linser P J, Price D A, *et al*. Localization of two Na^+-or K^+-H^+ antiporters, AgNHA1 and AgNHA2, in Anopheles gambiae larval Malpighian tubules and the functional expression of AgNHA2 in yeast[J]. J Insect Physiol, 2012, 58(4): 570 – 579.

[8] Rimon A, Tzubery T, Padan E. Monomers of the NhaA Na^+/H^+ antiporter of Escherichia coli are fully functional yet dimers are beneficial under extreme stress conditions at alkaline pH in the presence of Na^+ or Li^+[J]. J Biol Chem, 2007, 282(37): 26810 – 26821.

[9] Zachos N C, Tse M, Donowitz M. Molecular physiology of intestinal Na^+/H^+ exchange[J]. Annu Rev Physiol, 2005, 67: 411 – 443.

[10] 滕小春, 刘海峰, 房殿春, 等. NHE-1 反义基因对胃癌细胞的酸化作用及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3): 240 – 242.

(**收稿**:2011-12-14;**修回**:2012-01-16)

(编辑 张 维)