

技术与方法

大鼠谷氨酰胺转运蛋白SNAT2-EGFP融合蛋白
的表达与鉴定

孟雯 王函 董晓云 李洋 张舟*

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要 谷氨酰胺转运蛋白是中枢神经系统中一种重要的中性氨基酸转运蛋白, 对谷氨酰胺的跨膜转运十分重要。为了更好地研究大鼠谷氨酰胺转运蛋白2 (SNAT2)在细胞膜上的表达与定位, 利用亚克隆技术将增强型绿色荧光蛋白(EGFP)构建于SNAT2的C端, 通过菌液PCR、酶切和DNA测序鉴定重组真核表达质粒; 将测序正确的重组质粒瞬时转染人胚胎肾细胞(HEK293T cells), 用Western blot和激光共聚焦电子显微镜荧光检测技术鉴定SNAT2-EGFP的表达与亚细胞定位。结果表明, SNAT2-EGFP融合蛋白重组质粒在细胞中表达并正确定位于细胞膜上。SNAT2-EGFP融合蛋白重组质粒的成功构建为今后深入研究SNAT2的结构和功能提供了一个有效的工具。

关键词 谷氨酰胺转运蛋白; 增强型绿色荧光蛋白; 融合蛋白; 表达

丙氨酸、谷氨酰胺等小的脂肪族类中性氨基酸是人体重要的氮源来源, 其中谷氨酰胺是中枢神经系统中最重要的氨基酸之一, 其直接参与了神经元中谷氨酸—谷氨酰胺相互转变的过程, 是刺激性神经递质—谷氨酸合成的底物^[1-4]。因此这些氨基酸的跨膜转运对物质代谢十分重要。谷氨酰胺等中性氨基酸的跨膜转运由谷氨酰胺转运蛋白(sodium-coupled neutral amino acid transporter, SNAT)负责, 其功能紊乱可以引起神经退行性疾病, 如老年痴呆症、帕金森综合征等^[5-8]。

谷氨酰胺转运蛋白属于SLC38家族(solute carrier 38), 共有5个亚型: SNAT1、SNAT2和SNAT4以丙氨酸(alanine)为最佳转运底物, 归于System A; 而SNAT3和SNAT5以含N侧链的中性氨基酸为转运底物, 归为System N。SNAT2是家族中在哺乳动物中分布最为广泛的谷氨酰胺转运蛋白, 甚至在心脏中也能检测出其mRNA, 因此目前被广泛研究^[6,9-12]。SNAT2被预测含有11个跨膜区域, 其N端在细胞内, C端在细胞外^[13]。SNAT2在跨膜转运一个中性氨基酸的同时协同转运1个Na⁺进入细胞, 因此转运过程生成1个正电荷而产生电流^[9,14]。SNAT2能介导阴离子渗漏电流; 跨膜区域1 (TMD1)的天冬酰胺N82和TMD8的苏氨酸T384与Na⁺的结合有关, 其C端通过电压依赖性过程调节氨基酸的转运^[15-17]。由于

SNAT2是一个内在膜蛋白, 其分离纯化结晶过程既复杂又有难度, 目前还没有关于SNAT2晶体结构解析的报道。

由于检测膜蛋白的有效抗体制备比较困难, 现在越来越多的科学家将膜蛋白与一些标签蛋白如绿色荧光蛋白(GFP)、HA等构建在一起作为融合蛋白共同表达, 取得了很好的效果。在SNAT2的N末端加上GFP蛋白, 用以检测谷氨酰胺转运蛋白2的表达及定位^[17]; 在人胆固醇酰基转移酶1 (ACAT1)的C末端加上HA标签, 通过抗HA抗体间接地定性和定量测定人胆固醇酰基转移酶1的表达^[18]; 在人质子依赖的氨基酸转运蛋白1 (PAT1)的N末端加上HA标签, 用以检测质子依赖的氨基酸转运蛋白1的表达^[19]; 在人多巴胺转运蛋白(hDAT)的N末端加上FLAG标签, 用以检测多巴胺转运蛋白的表达^[20]。

商业化的SNAT2抗体比较昂贵, 效果并不理想, 基于此, 我们在真核细胞表达载体pBK-CMV-SNAT2的C端加入了增强型绿色荧光蛋白(EGFP)构成融合蛋白共同表达。结果表明, SNAT2-EGFP在内质网中正

收稿日期: 2011-07-26 接受日期: 2011-08-11

国家自然科学基金(No.30870560)、上海市科学技术委员会(No.10540503400)、上海市教育委员会科研创新项目(No.09ZZ139)、上海市重点学科建设项目(No.S30406)和上海师范大学细胞生物学重点学科建设项目(No.DZL808)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-64321069, E-mail: zzhang@shnu.edu.cn

常表达,并正确定位于细胞膜上,为以后研究SNAT2的结构功能及其突变体在细胞膜上的定位提供了一种有效工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株 pBK-CMV(Δ [1 098-1 300])-SNAT2-myc(以下简称为pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc)和pMD-19T-EGFP载体质粒为上海师范大学动物细胞与分子生物学实验室保存;人胚胎肾细胞(HEK293T/17, ATCC number CRL 11268)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 工具酶和生化试剂 限制性内切酶*Xba* I、*Blp* I、*Not* I、T4 DNA连接酶购自美国NEB公司;2 \times Taq MasterMix购自北京康为世纪生物科技有限公司;回收试剂盒和大肠杆菌DH5 α 感受态细胞购自天根生物;LipofectamineTM2000 Reagent购自Invitrogen公司;DMEM、胎牛血清购自美国Gibco公司;兔源抗GFP标签多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(H+L)抗体购自中科英沐公司;Pierce BCA Protein Assay Kit、ECL化学发光试剂盒购自美国Pierce公司;常用的化学试剂为国产分析纯。本研究所用引物由上海生工生物工程有限公司合成,杰李测序公司完成测序。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增EGFP基因和SNAT2基因 应用Taq MasterMix分别以pMD-19T-EGFP、pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc质粒为模板,利用Primer Premier 5.0设计普通PCR引物(表1),通过PCR扩增EGFP和SNAT2基因。扩增产物在1%琼脂糖凝胶(0.5 μ g/mL 溴化乙锭)中电泳检测。

1.2.2 pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP重组体的构建与转化 分别回收纯化PCR产物EGFP和SNAT2。SNAT2进行*Xba* I和*Blp* I双酶切反应;EGFP进行*Blp* I和*Not* I双酶切反应;pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc载体质粒进行*Xba* I和*Not* I双酶切反应。将酶切回收好的SNAT2、EGFP与pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc载体大片按照摩尔比为3:3:1在16 $^{\circ}$ C下T4 DNA连接酶连接15 h后,转化到DH5 α 感受态细胞中,铺含Kan(50 μ g/mL)的1.5%琼脂平板,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养12~16 h,长出菌落即可。

1.2.3 pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP重组体的鉴定 挑取转化平板上的大肠杆菌单克隆菌斑,加入含Kan(50 μ g/mL)的LB培养基中37 $^{\circ}$ C培养12~16 h后进行菌液PCR初步鉴定(所用引物见表1);提取质粒DNA后进行酶切、测序鉴定。

1.2.4 用Western blot检测重组体的表达 将pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP质粒DNA以脂质体转染的方法瞬时转染人胚胎肾细胞(HEK293T/17)。转染前12 h常规培养HEK293T细胞(DMEM+10% FBS, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。转染时细胞密度以80%~90%为宜,质粒DNA与脂质体LipofectamineTM2000的比例为1:3,具体转染见脂质体转染说明书。分别收集pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc和pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP质粒DNA转染36 h的HEK293T细胞,用反复冻融法裂解细胞后,于4 $^{\circ}$ C, 1 000 r/min,离心15 min,取上清液,即总蛋白。将上清液于4 $^{\circ}$ C, 35 000 r/min,离心30 min,弃上清,溶解沉淀即为膜蛋白。取蛋白10 μ g用10% SDS-PAGE电泳分离,将凝胶中蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。分别用兔源抗GFP标签多克隆抗体(1:6 500)和羊抗兔IgG二抗(1:5 500)孵育1 h,放射自显影。

表1 扩增EGFP和SNAT2基因片段的引物序列

Table 1 Primers for amplifying EGFP and SNAT2 gene fragments

基因片段 Fragments	引物(5'-3') Primers (5'-3')	退火温度($^{\circ}$ C) T _m ($^{\circ}$ C)
EGFP	EF: CAT GGG <u>CTTA GCT</u> GGA GGA GGA ATG GTG	67.87
	ER: AAG GAA AAG <u>CGG CCG CTT</u> ACT TGT ACA GCT CGTC	69.30
SNAT2	SF: <u>GCT CTA GAG</u> ATC CCT CGA CCT CGA G	66.90
	SR: ATG AGT <u>GCT AAG CCA</u> TGT CCG CCT GCA GAG GCA TC	71.44

划线部分为限制性内切酶识别序列,灰色部分为连接SNAT2与EGFP的3个甘氨酸碱基序列。EF和ER分别为扩增EGFP基因片段的上下游引物,SF和SR分别为扩增SNAT2基因片段的上下游引物。

The underscores were the sites for restriction digestion, the grey-lighted sequence were three glycines linking SNAT2 and EGFP. EF and ER were used as primers for amplifying EGFP gene fragment, SF and SR were used as primers for amplifying SNAT2 gene fragment.

1.2.5 用激光共聚焦显微镜检测重组体的表达

将pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc和pBK-CMN- Δ -SNAT2-EGFP瞬间转染HEK293T细胞, 转染24 h后, 利用激光共聚焦显微镜观察荧光并拍照。

2 结果

2.1 重组质粒pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP的构建

重组表达质粒pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP构建图谱见图1, CMV启动子启动转录, SNAT2和EGFP基因融合表达, 在EGFP基因之前有编码3个甘氨酸铰链的基因。分别以pMD-19T-EGFP和pBK-CMV- Δ -SNAT2-

myc质粒为模板, 用表1中的引物进行PCR, 获得EGFP和SNAT2基因片段, 经电泳证实其大小正确, 分别为750 bp (图2A)和1 870 bp (图2B), 阴性对照未见任何条带。对pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc质粒进行Xba I和Not I-HF双酶切, 获得一个大片段为4 358 bp和一个小片段为3 360 bp, 电泳鉴定与预期大小符合(图2C)。

将相应酶切后的质粒大片段、SNAT2、EGFP三个DNA片段连接转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 我们获得了转化菌落。经过用不同引物(表1)进行菌液PCR, 分别获得了750, 1 870, 2 600 bp左右的片段, 分别与EGFP、SNAT2、SNAT2-EGFP长度符合

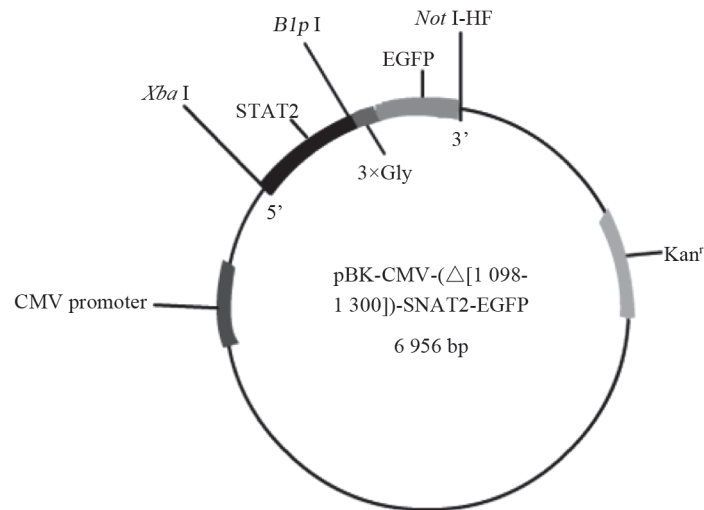
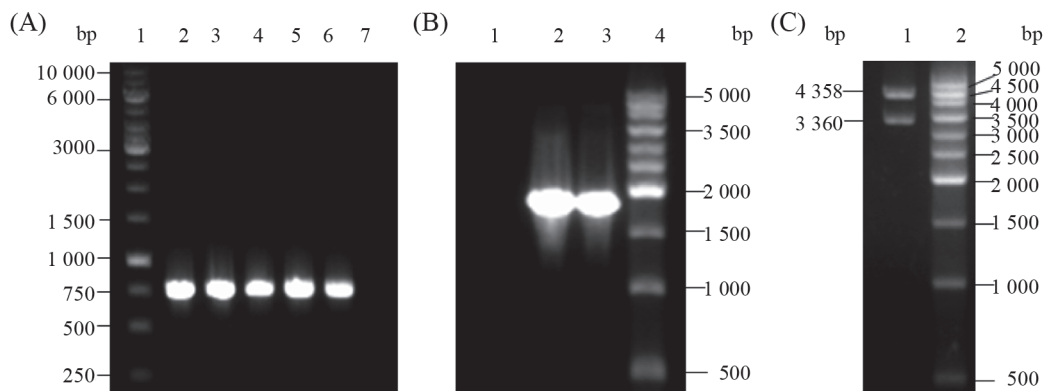


图1 pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP重组质粒图谱

Fig.1 Map of recombinant plasmid pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP



A: 1: DL 10 000 DNA分子量标准; 2-6: EGFP基因; 7: 阴性对照; B: 1: 阴性对照; 2-3: SNAT2基因; 4: DL 5 000 DNA分子量标准; C: 1: pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc大片段(4 358 bp)和小片段(3 360 bp); 2: DL 5 000 DNA分子量标准。

A: 1: DL 10 000 DNA marker; 2-6: EGFP gene; 7: negative control; B: 1: negative control; 2-3: SNAT2 gene; 4: DL 5 000 DNA marker; C: 1: the big fragment (4 358 bp) and the small fragment (3 360 bp) of pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc; 2: DL 5 000 DNA marker.

图2 EGFP和SNAT2基因的扩增与pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc质粒的酶切鉴定

Fig.2 Amplification of EGFP and SNAT2 genes and identification of enzyme digestion of plasmid pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc

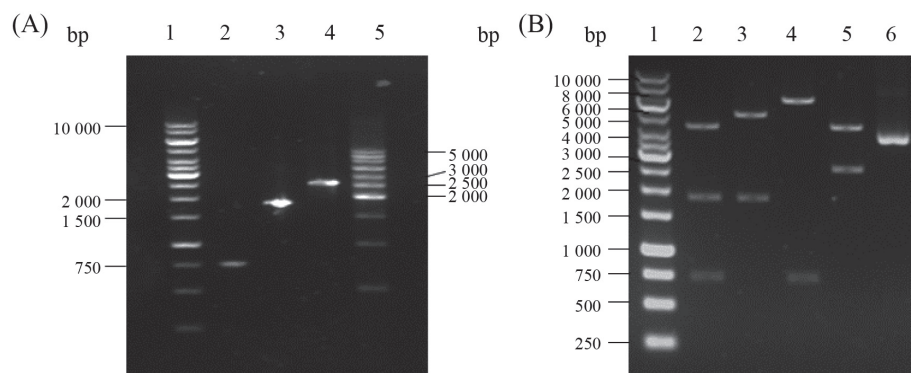
(图3A, 显示了一个菌落的PCR结果)。这个结果表明SNAT2、EGFP片段已经连接到了pBK-CMV载体上。

用酶切的方法进一步鉴定pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP构建成功, 通过电泳检测出预期大小的条带(图3B): (1) 三酶切得到三个片段, 长度分别与载体大片段(4 358 bp)、SNAT2 (1 875 bp)、EGFP (758 bp) 相符合(图3B泳道2); (2) 三次不同的双酶切分别得

到约1 850 bp (图3B泳道3)、750 bp (图3B泳道4)、2 600 bp (图3B泳道5)的片段, 与SNAT2、EGFP、SNAT2-EGFP基因长度相符合。泳道6显示了酶切前的重组质粒pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP。

在经过菌落PCR和酶切鉴定后, 所获得的pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP经过DNA测序, 证明所有序列正确。

2.2 SNAT2-EGFP融合蛋白的表达和鉴定



A: 1: DL 10 000 DNA分子量标准; 2: PCR扩增片段(引物EF, 引物ER); 3: PCR扩增片段(引物SF, 引物SR); 4: PCR扩增片段(引物SF, 引物ER); 5: DL 5 000 DNA分子量标准; B: 1: DL 10 000 DNA分子量标准; 2: *Xba* I/*Bln* I/*Not* I三酶切pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP; 3: *Xba* I/*Bln* I双酶切pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP; 4: *Bln* I/*Not* I双酶切pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP; 5: *Xba* I/*Not* I双酶切pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP; 6: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP。

A: 1: DL 10 000 DNA Marker; 2: PCR fragment (primer EF and ER); 3: PCR fragment (primer SF and SR); 4: PCR fragment (primer SF and ER); 5: DL 5 000 DNA marker; B: 1: DL 10 000 DNA marker; 2: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP digested with *Xba* I and *Bln* I and *Not* I; 3: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP digested with *Xba* I and *Bln* I; 4: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP digested with *Bln* I and *Not* I; 5: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP digested with *Xba* I and *Not* I; 6: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP。

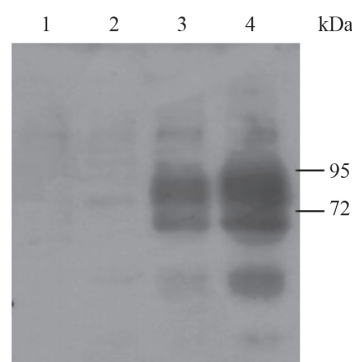
图3 pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP阳性克隆的菌液PCR与酶切鉴定

Fig.3 Identification of pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP positive clones by bacterium fluid PCR and enzyme digestion

2.2.1 用Western blot检测重组体的表达 SNAT2和EGFP蛋白融合表达, 融合蛋白分子量大小为81 kDa。收集pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP质粒DNA转染36 h的HEK293T细胞, 提取总蛋白和膜蛋白, 用Western blot检测EGFP蛋白标签的表达, 结果见图4。可以看出检测到的EGFP蛋白分子量在80 kDa左右, 和SNAT2-EGFP融合蛋白预期分子量大小相符, 而在pBK-CMV-Δ-SNAT2-myc瞬时转染的HEK293T细胞中未见任何特异性条带。由此可以说明SNAT2-EGFP融合蛋白在细胞内已经表达(图4泳道3)且定位到细胞膜上(图4泳道4)。

2.2.2 用激光共聚焦显微镜检测重组体的表达

用原始质粒pBK-CMV-Δ-SNAT2-myc和重组质粒pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP瞬时转染HEK293T细胞, 24 h后用激光共聚焦显微镜观察荧光, 发现绿色荧光分布于内质网和细胞膜上(图5B)。可以说明, 重

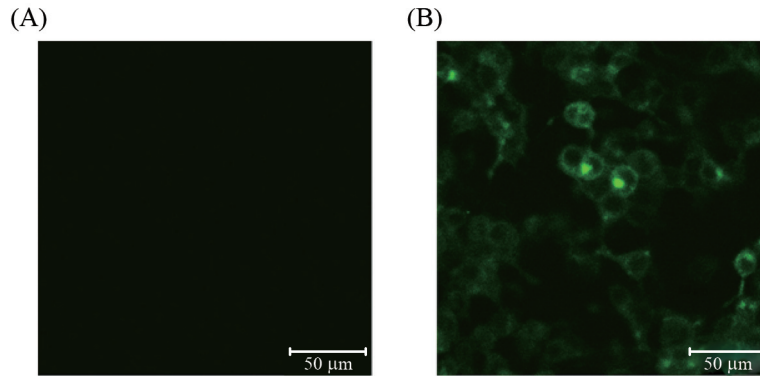


1: 对照, pBK-CMV-Δ-SNAT2-myc转染HEK293T细胞的总蛋白; 2: 对照, pBK-CMV-Δ-SNAT2-myc转染HEK293T细胞的膜蛋白; 3: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP转染HEK293T细胞的总蛋白; 4: pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP转染HEK293T细胞的膜蛋白。

1: control, total protein of pBK-CMV-Δ-SNAT2-myc-transfected HEK293T cells; 2: control, membranes protein of pBK-CMV-Δ-SNAT2-myc-transfected HEK293T cells; 3: total protein of pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP-transfected HEK293T cells; 4: membranes protein of pBK-CMV-Δ-SNAT2-EGFP-transfected HEK293T cells.

图4 SNAT2-EGFP在HEK293T细胞中的表达检测

Fig.4 Detection of SNAT2-EGFP expression in HEK293T cells



A: 对照: pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc 转染的HEK293T细胞; B: pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP转染的HEK293T细胞。

A: control: HEK293T cells transfected by pBK-CMV- Δ -SNAT2-myc; B: HEK293T cells transfected by pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP.

图5 SNAT2-EGFP在HEK293T细胞中表达与定位的荧光图像

Fig.5 Laser scanning confocal microscope images for testing cellular expression and localization in HEK293T cells

组质粒pBK-CMV- Δ -SNAT2-EGFP构建成功, 并可以证明SNAT2-EGFP融合蛋白定位于细胞膜上。

3 讨论

目前, 还没有商业化的有效SNAT2特异性抗体, 极大的阻碍了对SNAT2结构与功能的研究。EGFP是一种增强型的绿色荧光蛋白, 与GFP相比, 具有更强的荧光信号。应用商业化的GFP单克隆或多克隆抗体可以很好地检测EGFP的表达, 目前已有很多报道将膜蛋白和EGFP构建在一起检测目的蛋白的表达和定位。Zhang等^[17]将SNAT2的N端与AcGFP (*Aequorea coerulea* GFP)的C端连到一起, 构建了pAcGFP-SNAT2表达载体。运用定点突变技术删除SNAT2的C端后转染HEK293T细胞, 用激光共聚焦显微镜检测GFP-SNAT2的表达, 发现在细胞内质网和细胞膜上的绿色荧光与野生型没有区别, 表明SNAT2的C端对SNAT2在细胞膜上的正常表达和定位并不重要, 预示着SNAT2的N端可能与SNAT2在细胞膜上的表达与定位有关。

与已报道的将GFP连接到SNAT2的N端(GFP-SNAT2)不同, 本研究采用三片段连接方法将EGFP连接到SNAT2的C端(SNAT2-EGFP), 并克隆到真核生物表达载体pBK-CMV(Δ [1 098-1 300])中。SNAT2-EGFP融合蛋白表达质粒的成功构建为深入研究SNAT2位于细胞内的N-端在SNAT2于细胞膜上的定位中的作用及为通过定点突变技术研究SNAT2

的结构和功能提供了一个有效的工具。

参考文献 (References)

- 1 Haussinger D. Nitrogen metabolism in liver: Structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J* 1990; 267(2): 281-90.
- 2 Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 2000; 130(4S Suppl): 1026S-31S.
- 3 Young VR, Ajami AM. Glutamine: The emperor or his clothes? *J Nutr* 2001; 131(9 Suppl): 2449S-59S.
- 4 Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Shulman RG. *In vivo* NMR studies of the neurotransmitter flux and neuroenergetics: Implications for brain function. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 401-27.
- 5 Bode BP. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr* 2001; 131(9 Suppl): 2475S-85S.
- 6 Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Eur J Physiol* 2004; 447(5): 784-95.
- 7 Sidoryk-Wegrzynowicz M, Lee ES, Albrecht J, Aschner M. Manganese disrupts astrocyte glutamine transporter expression and function. *J Neurochem* 2009; 110(3): 822-30.
- 8 张舟, 章骏, 孙传文. 膜片钳全细胞记录法在研究谷氨酰胺转运蛋白分子机制中的应用. *上海师范大学学报: 自然科学版* 2009; 38(4): 337-41.
- 9 Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediqer MA, et al. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem* 2000; 275(30): 22790-7.
- 10 Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Huang W, Ganapathy ME, Leibach FH, et al. Cloning of an amino acid transporter with functional characteristics and tissue expression pattern identical to that of system A. *J Biol Chem* 2000; 275(22): 16473-7.

- 11 Hatanaka T, Huang W, Wang H, Suqawara M, Prasad PD, Leibach FH, *et al.* Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1467(1): 1-6.
- 12 Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem* 2000; 275(6): 4049-54.
- 13 Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM, Hundal HS. Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *J Biol Chem* 2007; 282(27): 19788-98.
- 14 Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, *et al.* Glutamine uptake by neurons: Interaction of protons with system A transporters. *J Neurosci* 2002; 22(1): 62-72.
- 15 Zhang Z, Grewer C. The sodium-coupled neutral amino acid transporter SNAT2 mediates an anion leak conductance that is differentially inhibited by transported substrates. *Biophys J* 2007; 92(7): 2621-32.
- 16 Zhang Z, Gameiro A, Grewer C. Highly conserved asparagine 82 controls the interaction of Na⁺ with the sodium-coupled neutral amino acid transporter SNAT2. *J Biol Chem* 2008; 283(18): 12284-92.
- 17 Zhang Z, Zander CB, Grewer C. The C-terminal domain of the neutral amino acid transporter SNAT2 regulates transport activity through voltage-dependent processes. *Biochem J* 2011; 434(2): 287-96.
- 18 Guo ZY, Chang CC, Lu X, Chen J, Li BL, Chang TY. The disulfide linkage and the free sulfhydryl accessibility of acyl-coenzyme A: A cholesterol acyltransferase 1 as studied by using mPEG5000-maleimide. *Biochemistry* 2005; 44(17): 6537-46.
- 19 Dorn M, Weiwad M, Markwardt F, Lauq L, Rudolph R, Brandsch M, *et al.* Identification of a disulfide bridge essential for transport function of the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1. *J Biol Chem* 2009; 284(33): 22123-32.
- 20 Saunders C, Ferrer JV, Shi L, Chen J, Merrill G, Lamb ME, *et al.* Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: An internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(12): 6850-5.

Expression and Identification of Rats Glutamine Transporters SNAT2-EGFP Fusion Protein

Meng Wen, Wang Han, Dong Xiaoyun, Li Yang, Zhang Zhou*

(College of Life and Environmental Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract Sodium-coupled neutral amino acid transporters (SNATs) in the central neural system played an important role in transporting small, neutral amino acids, such as glutamine and alanine, across cellular membranes. In order to detect expression and localization of SNAT2 on cell membranes conveniently, an EGFP protein sequence was subcloned into SNAT2's C-Terminus in the eukaryotic expression vector pBK-CMV-(Δ [1 098-1 300])-SNAT2-myc. After pBK-CMV-(Δ [1 098-1 300])-SNAT2-EGFP was transiently transfected into HEK293T cells, expression of SNAT2-EGFP was detected by laser scanning confocal microscope and Western blot using anti-GFP antibody. The results showed that SNAT2-EGFP was successfully expressed and localized on cell membranes. The eukaryotic expression plasmid pBK-CMV-(Δ [1 098-1 300])-SNAT2-EGFP constructed successfully is an effective tool for studying structure and function of SNAT2 in the future.

Key words sodium-coupled neutral amino acid transporter2 (SNAT2); enhanced green fluorescence protein (EGFP); fusion protein; expression

Received: July 26, 2011 Accepted: August 11, 2011

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (No.30870560), Shanghai Scientific and Technological Committee (No.10540503400), Shanghai Education Committee Scientific Research Innovation (No.09ZZ139), Shanghai Key Discipline Construction Project (No.S30406) and Shanghai Normal University Cell Biology Key Discipline Construction Project (No.DZL808)

*Corresponding author. Tel: 86-21-64321069, E-mail: zzhang@shnu.edu.cn