

人 HCN2 真核表达载体的构建及在 HEK293 细胞中的表达

左广锋¹ 陈绍良^{1△} 徐 艳² 肖 杭²

(1 南京医科大学附属南京市第一医院心内科 江苏 南京 210006 2 南京医科大学江苏省医药动物实验基地 江苏 南京 210029)

摘要 目的 构建含有人 HCN2 基因的真核表达载体,并观察在人胚胎肾细胞(HEK293)中的表达情况。方法 对人 HCN2 基因全序列进行分析,进行 oligo 设计,通过 PCR,扩增 HCN2 全长 cDNA,通过双酶切(XhoI 和 BamHI)装入真核表达载体 pIRES2-EGFP 中,脂质体法转染入 HEK293 细胞中,利用真核表达载体中带有绿色荧光蛋白 GFP 报告基因,对转染效率进行监测,采用反转录-聚合酶链反应检测 HCN2 mRNA 表达,全细胞膜片钳技术检测 HCN2 通道电流。结果 测序及酶切结果表明 HCN2 基因正确,荧光显微镜下,转染细胞观察到绿色荧光,反转录-聚合酶链反应检测到 HCN2 mRNA 表达,膜片钳检测到 hHCN2 基因编码的通道电流。结论 成功地构建了 HCN2 真核表达载体并进行了起搏通道 HCN2 基因的异源性表达。

关键词 HCN4 基因;真核表达载体;转染;异源性表达

中图分类号 R54 Q75 Q78 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)06-1068-04

Construction of eukaryotic expressing vector of human HCN2 gene and its expression in HEK293

ZUO Guang-feng¹, CHEN Shao-liang^{1△}, XU Yan², XIAO Hang²

(1 Nanjing First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China; 2 Jiangsu Animal Experimental Center for Medical and Pharmaceutical Research, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

ABSTRACT Objective: To construct the eukaryon expression vector of human HCN2 gene and to investigate its expression in human embryonic kidney cells (HEK293). **Methods:** HCN2 gene entire sequence was analysed and designed by oligo. cDNA encoding human HCN2 gene was amplified by polymerase chain reaction, and digested by the restriction endonucleases XhoI and BamHI, then inserted into eukaryotic expressing vector pIRES2-EGFP. pIRES2- HCN2-EGFP was transfected into HEK293 cells by Lipofactamine2000. The transfection rate of target gene was determined by the green fluorescent protein (GFP) expression in the eukaryotic expressing vector and the mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Whole-cell patch clamp was used to detect whether the hHCN2 gene was transfected into HEK293 cells. **Results:** The HCN2 gene was completely accurate, GFP was observed in the transfected 293 cells under a fluorescent microscope, HCN2 mRNA expression was confirmed by RT-PCR. Whole cell patch clamp recorded ionic currents of transfected hHCN2. **Conclusion:** The pIRES-HCN2-EGFP eukaryon expression vector was successfully constructed, and pacemaker channel HCN2 gene heterologous expression was acquired.

Key words: HCN2 gene; Eukaryon expression vector; Transfection; Heterologous expression

Chinese Library Classification(CLC): R54, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1068-04

前言

心脏节律的形成依赖于起搏细胞动作电位的 4 相缓慢自动除极化,而产生这一过程需要多个离子电流参与,其中 If 电流的作用日益受到重视。目前认为,If 电流由超极化激活的环核苷酸门控通道(HCN 通道)开放产生,是一个电压和时间依赖性的、非选择性的内向阳离子流,并受 cAMP 和 cGMP 的直接调节^[1]。编码 HCN 通道的基因有四个亚型,分别是 HCN1-HCN4,在成年动物心室肌细胞中,HCN2 是最主要的亚型^[2-3]。以往研究离子通道的方法是直接从心脏组织中提取离子通道的 mRNA,然后将其逆转录为 cDNA,经过扩增、提取、转染,使其在表达系统表达通道蛋白,最后记录该通道电流。本实

验参考人 HCN2 基因的全长序列 NM_001194.3,应用全基因合成技术,合成了人 HCN2 全长序列,并应用脂质体法成功地将该基因导入了人胚肾细胞(HEK293),建立一种研究心肌离子通道的有效模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞株 pIRES-EGFP 质粒(Invitrogen),大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(Invitrogen),HEK293 细胞为本研究所保存。

1.1.2 试剂 DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒 (AXYGEN); 无内毒素质粒大提试剂盒 (TIANGEN); DNA marker (Invitrogen)、Platinum Pfx DNA 聚合酶、Taq Polymerase、dNTP、MgSO₄ (Invitrogen); 限制性内切酶 XhoI、EcoRI、T4 DNA 连接酶(NEB); pMD-18T 载体(Takara);胎牛血清及高糖 DMEM 培养基(Hyclone); Lipofactamine 2000(Invitrogen); Trizol (Invitrogen); 反转录-聚合酶链反应试剂盒

作者简介 左广锋(1984-)男,硕士研究生,从事心血管电生理研究

△通讯作者 陈绍良,主任医师,教授,博士生导师,

电话 025-52208048 E-mail xhmengx@126.com

(收稿日期 2010-11-06 接受日期 2010-11-30)

(Takara) ,PCR 试剂盒(博彩) ;上样缓冲液(碧云天) ;胰化蛋白胨、酵母提取物(Oxoid) ;琼脂糖凝胶(上海 YIYO) ;其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 超净工作台(南京), 冷冻离心机(Eppendorf) , PCR 仪(Bio-Rad) ,膜片钳仪(Axonpatch 200B, USA) ,数 - 模转换器(DIGIDA-TA ,1200series Interface,USA);Olympus 倒置显微镜(Japan) ,微电极拉制仪(Narishige PP-2830, Japan)。

1.1.4 液体 电极外液(mmol/L): 135 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4.用 KOH 调 pH 至 7.4. 电极内液(mmol/L): 130 KCl, 10 NaCl, 0.5 MgCl₂, 1 EGTA, 5 HEPES, pH 7.4.用 KOH 调 pH 至 7.4。

1.2 方法

1.2.1 寡聚单链 DNA 引物的设计与合成 参考人 HCN2 基因的全长序列 NM_001194.3 检查基因内部有无特别复杂二级结构和重复序列 根据基因序列分析结果 对 HCN2 基因进行单链 oligo 的设计,在目的基因序列的两端分别添加 XhoI 位点、BamHI 酶切位点,交与上海英骏公司合成寡聚单链 DNA 引物。

1.2.2 HCN2 基因小片段扩增 寡聚单链 DNA 引物进行两轮 PCR 扩增,并进行鉴定,第一轮 PCR 反应体系为 50 ul: 10*buffer,5 ul;MgSO₄(50 mM),1 ul; dNTP(10 mM) ,1 ul ;引物 mix 1 ul ;Platinum Pfx polymerase,0.5 ul; ddH₂O ,41.5 ul ;反应条件 95℃ 3 min 1 cycle 95℃ 20 sec,55℃ 20 sec,68℃ 1 min 25 cycles 68℃ 5 min 1 cycle。第二轮 PCR 反应体系 50 ul: 10*buffer,5 ul ;MgSO₄(50 mM) ,1 ul dNTP(10 mM) ,小片段首尾引物 1 ul ;第一轮 PCR 扩增产物 5 ul ;Platinum Pfx polymerase ,0.5 ul ;ddH₂O ,36. 5 ul ;反应条件 95℃ 3 min 1 cycle ; 95℃ 20 sec, 60℃ 20 sec,68℃ 1 min 25 cycles 68℃ 5 min 1 cycle。获得目的基因小片段,用 1 %的琼脂糖凝胶电泳,割胶回收纯化 PCR 产物。

1.2.3 克隆测序及拼接完整的 HCN2 基因 将回收纯化的 PCR 产物与 pMD-18T 载体连接,16℃ ,1 h 转化 DH5a 大肠杆菌 经氨苄青霉素筛选平板培养过夜后,挑取细菌单克隆接种于氨苄青霉素 LB 培养基中,37℃ 摇菌过夜,提取质粒,测序鉴定,插入片段序列与目的 DNA 序列一致。应用重叠 PCR 拼接成完整的目的基因并进行扩增,反应体系为 50 ul :10*Buffer 5 ul ; MgSO₄(50 mM) ,1 ul dNTP(10 mM) ,1 ul ;全长首尾引物 各 0.5 ul ;正确片段 各 2 ul ;Platinum Pfx polymerase ,0.5 ul ;ddH₂O ,补至总体积 50 ul ;反应条件 95℃ 3 min 1 cycle 95℃ 40 sec ,60℃ 40 sec ,68℃ 3 min 40 sec 25 cycles 68℃ 10 min 1 cycle。获得完整的 HCN2 基因,再次用 1 %的琼脂糖凝胶电泳,割胶回收纯化 PCR 产物。

1.2.4 pIRES2-HCN2-EGFP 重组体构建 XhoI 和 BamHI 双酶切带有酶切位点的目的 HCN4 基因片段(37℃ 1 h) ,同时双酶切 pIRES2-EGFP 载体 (37℃ 2 h) ,回收 HCN₂ 片段和线性 pIRES2-EGFP ,用 T4 DNA 连接酶连接 HCN₂ 片段和线性 pIRES2-EGFP ,连接体系和条件 HCN₂ 片段 5 ul ,线性 pIRES2-EGFP 3 ul,10xLigase Buffer 1 ul, T4 DNA 连接酶 0.5 ul,

ddH₂O 0.5 ul。连接过夜,将重组 pIRES2-HCN2-EGFP 转化 DH5a 感受态细胞 经卡那霉素筛选平板培养过夜后,挑取细菌单克隆接种于卡那霉素 LB 培养基中,37℃ 摇菌过夜,小提质粒双酶切、菌落 PCR 和测序鉴定,以确认 pIRES2-HCN2-EGFP 质粒构建成功。大量扩增该质粒以备用。

1.2.5 HCN2 基因瞬时转染 HEK293 细胞 HEK293 细胞培养用高糖 DMEM 培养基,含 10 %胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素,种植在直径 35 mm 培养皿中,置于 37℃、5 % CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养至对数期。转染前 24 h,用 0.25 % 胰蛋白酶消化 3~5 min ,将约 2× 10⁵ HEK293 细胞 2 mL 接种于 35 mm 培养皿中,培养至细胞汇合度 80 %~90 %时做瞬时转染。将 2 u g pIRES2-HCN2-EGFP 质粒和 5 ul Lipofacta mine 2000 分别加入 100 ul 无血清的 DMEM 培养基中轻轻振荡,使得两种溶液充分混匀,室温静置 15min ,并在此间隔中,用 2 mL 完全 DMEM 培养基给 HEK293 细胞换液,待 15min 结束,再将质粒、Lipofacta mine 2000 及无血清的 DMEM 培养基的混合物加入 35 mm 培养皿中,24 h 后用荧光倒置显微镜观察转染效果,以未转染 hHCN4 的细胞和转染空载质粒(pIRES2-EGFP)的细胞作为对照。

1.2.6 转染细胞 HCN2 mRNA 表达 收集 HEK293 细胞,加入 1mL Trizol 裂解液,按说明书提取总 RNA ,采用 RT-PCR 检测 HCN2 mRNA 的表达。上游引物 5-CGCCTGATCCGCTA-CATCCAT-3 下游引物 5-AGTGCGAAGGAG-TACAGTTCACT-3。PCR 反应体系 20ul,反应条件 95℃ 5 min ,1 cycle 95℃ 35 sec,59℃ 45 sec,72℃ 45 sec 30 cycles ; 72℃ 10 min 1 cycle^[4]。扩增出的 HCN2 片段,用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳进行分析,观察其与预期 DNA 片段大小是否一致。

1.2.7 离子电流的记录 HCN2 转染 48 h 后,运用全细胞膜片钳技术记录单细胞离子电流,保持电压固定于 - 40 mV,阶跃电压 10 mV,指令电位的步阶范围由 - 50 mV 至 -130mV,持续时间为 3 s,测定 HCN2 通道电流。所用微电极选用硬质玻璃毛胚(内径 1.6± 0.1 mm ,壁厚 0.2 mm) ,两步拉制仪拉制,电极尖端约 1~2 μ m ,将微电极连于膜片钳仪的探头上,采用微电极操纵器将电极缓慢推向细胞,给予 0.5 ml 正压,入液后电极电阻值在 3~6 MΩ ,当电极贴住细胞膜后轻加负压,吸引数秒钟后,给予钳制电压。等待电阻上升,当电极尖端与细胞膜表面形成 1 GΩ 以上的高阻封接时,补偿电极电容,之后给电极施以负压,吸破细胞膜,最后再补偿电极电阻和细胞膜电容,进行克隆 hHCN2 通道的生理记录。实验过程由计算机软件 pCLAMP6. 0 控制,利用数 - 模转换器完成刺激信号的产生、反馈信号的采集以及数据分析,实验在室温(20~25℃) 下进行。

2 结果

2.1 HCN2 基因扩增

经重叠 PCR 拼接成完整的 HCN2 基因,扩增带有酶切位点的 HCN2 cDNA ,XhoI 和 BamHI 双酶切,1 %的琼脂糖凝胶电泳,110V,15 min ,凝胶电泳显示出一条约 2700 bp 的条带,与目的基因大小 2670 bp 相符(图 1)。

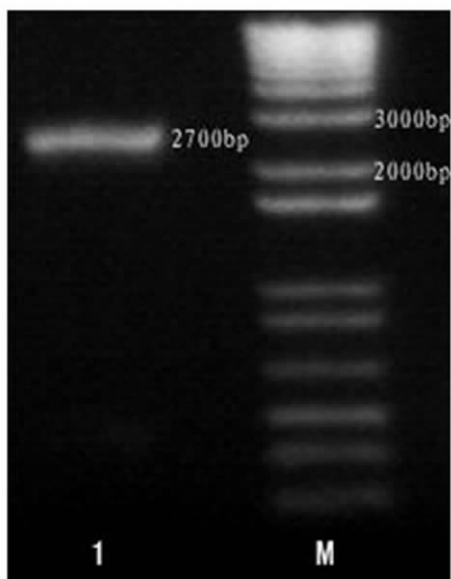


图1 扩增带有酶切位点的 HCN2 基因(1: HCN2 基因 M: DNA Marker)

Figure1 Amplification HCN2 gene with restriction sites (1: HCN2 gene M: DNA Maker)

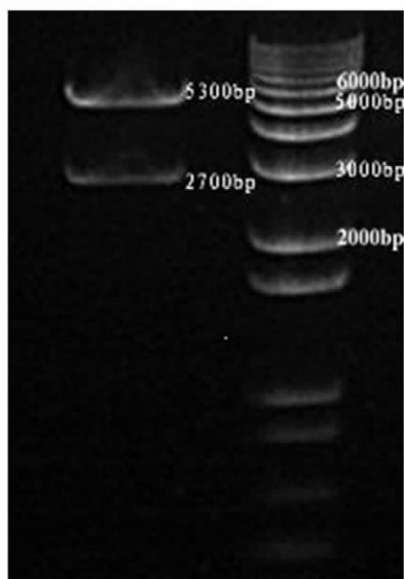


图2 XhoI 和 BamHI 双酶切重组质粒 pIRES2-HCN2-EGFP

Figure 2 Enzyme digestive detection results of pIRES2-HCN2-EGFP recombinant plasmids

2.2 XhoI 和 BamHI 双酶切重组质粒 pIRES2-HCN2-EGFP

质粒用 Xho I 和 BamHI 酶切鉴定,电泳显示重组质粒被切成载体(5.3 Kb)和 2.7 kb 的 DNA 片段,表明质粒构建正确(图 2)。

2.3 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒的测序鉴定

经测序,结果应用 Pubmed blast 比对,序列完全一致,序列号为 NM_001194.3。

2.4 转染细胞绿色荧光蛋白检测结果

在荧光倒置显微镜下,观察到转染 pIRES2-HCN2-EGFP 质粒和转染空载质粒(pIRES2-EGFP)的 HEK293 细胞均有绿

色荧光表达,且荧光强度相近(图 3),未转染 HCN2 的 HEK293 细胞未见绿色荧光表达。

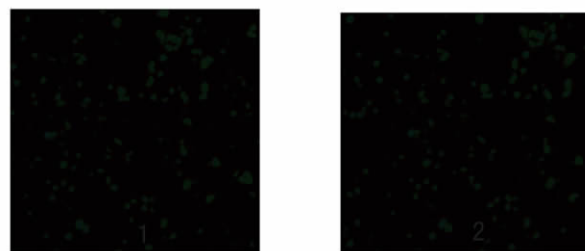


图3 转染细胞绿色荧光表达:1、pIRES2-HCN2-EGFP 2、pIRES2-EGFP

Figure 3 Expression of green fluorescent protein after 48 hours of transfection of human embryonic kidney cells with pIRES-HCN2-EGFP recombinant plasmids under a fluorescence microscope

2.5 转染细胞 HCN2 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示,采用上述特异性引物可从转染 pIRES2-HCN2-EGFP 质粒的 HEK293 细胞中扩增出大约 230 bp 的目的片段,而转染空载质粒(pIRES2-EGFP)和未转染质粒的 HEK293 细胞无相应特异性片段呈现。这表明导入的外源性人 HCN2 基因已整合到 HEK293 细胞基因组中,并能很好地转录成相应的 mRNA(图 4)。

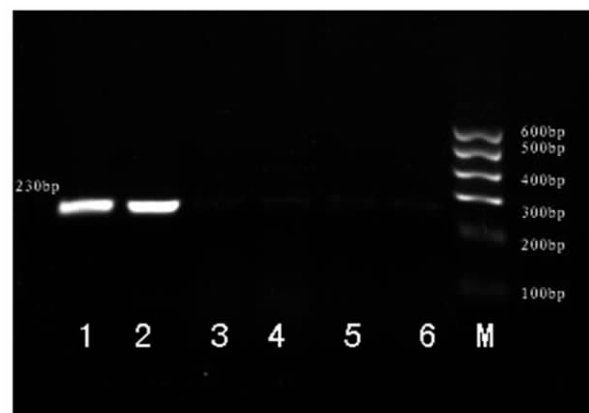


图4 RT-PCR 检测 HCN2 在转基因细胞中的转录:1-2:HCN2 cDNA 3-4:Control 5-6:EGFP vector M:DNA Marker

Figure 4 Polymerase chain reaction (PCR) results of Pacemaker current gene HCN2

2.6 hHCN2 通道电流的记录

HEK293 细胞在转染 48 h 后,在电压钳模式下记录到超极化激活内向电流,呈电压依赖性,证明转染成功。未转染的 HEK293 细胞及对照组均无电流。

3 讨论

HCN2 通道在心脏中广泛表达,尤其在心房肌和心室肌细胞中,HCN2 是最主要的亚型^[2-3]。HCN2 通道对维持正常的心脏节律具有重要的作用,HCN2 基因敲除小鼠模型实验显示,敲除小鼠 HCN2 基因,心电图上显示 P-P 间期延长的窦性心律失常^[5]。此外,由于 HCN2 通道激活较快,对 cAMP 较敏感^[1],已有

研究者将该基因用于构建生物起搏器^[6]。鉴于 HCN2 通道在心脏中的广泛表达及其生理学特性, HCN2 通道越来越成为人们研究的热点。

目前, 研究 HCN2 通道的方法是从心脏组织中获取该通道的 mRNA, 然后将其逆转录为 cDNA, 经过扩增、提取、转染, 使其在表达系统表达通道蛋白, 最后记录该通道电流^[4,7]。本实验没有直接从心脏组织中提取 HCN2 通道的 mRNA, 而是参考 HCN2 基因的全长序列 NM_001194.3, 应用全基因合成技术, 合成了人 HCN2 基因全长序列并将其克隆至 pIRES2-EGFP 质粒中。pIRES2-EGFP 质粒为真核双顺反子表达载体, 适用于双基因的同步表达, 在两个蛋白编码序列之间插入内部核糖体进入位点(IRES), 经同一启动子转录后, 两个基因在同一条 mRNA 上, 实现两个基因的同时表达^[8]。绿色荧光蛋白(GFP)是从一种能自体发光的水母中分离出来的蛋白质, 它能够在紫外线的激发下发出明亮的绿色荧光。增强型绿色荧光蛋白(EGFP)是一种优化的突变型绿色荧光蛋白, 产生的荧光比野生型绿色荧光蛋白强 35 倍, 通常作为报告基因来追踪待检测蛋白的表达。我们应用脂质体法将重组的 pIRES2-HCN2-EGFP 质粒转染人胚肾细胞(HEK293), 在荧光显微镜下观察到高亮度的绿色荧光, 证明了增强型绿色荧光蛋白(EGFP)表达, 由此报告了 HCN2 在蛋白水平的表达^[9-10]。

综上所述, 实验结果证实构建的 pIRES-HCN2-EGFP 真核表达载体能够有效地将含有起搏通道 HCN2 cDNA 转染人胚胎肾细胞, 为今后更深入地研究 HCN2 通道电生理特性奠定了基础, 也为在异源性表达 HCN2 通道的模型上开发抗心律失常药物提供了理论根据。

参考文献(References)

[1] Martin B, Christian WS, Stylianos M, et al. Hyperpolarization-Activated

Cation Channels: From Genes to Function [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89 (3): 847-885

[2] Shi W, Wymore R, Yu H, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues[J]. *Circ Res*, 1999, 85(1): e1-6

[3] Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, et al. Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45 (2): 289-299

[4] Andreas L, Zong X, Juliane S, et al. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics [J]. *EMBO J*, 1999, 18 (9): 2323-2329

[5] Ludwig A, Budde T, Stieber J, et al. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2 [J]. *EMBO J*, 2003, 22(2): 216-224

[6] Irina P, Alexei P, Lu ZJ, et al. Human Mesenchymal Stem Cells as a Gene Delivery System to Create Cardiac Pacemakers [J]. *Circ. Res*, 2004, 94(7): 952-959

[7] Juliane S, Georg S, Stefan H, et al. Functional expression of the human HCN3 channel[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(41): 34635-34643

[8] Mountford PS, Smith AG. Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis [J]. *Trends Genet*, 1995, 11 (5): 179-184

[9] Li C, Guo JH, Li JW, et al. Electrophysiology of hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated cation channel 2 and hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated cation channel 4 expressed in HEK293 cells [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(22): 2039-2041

[10] Varghese A, Tenbroek EM, Coles JJ, et al. Endogenous channels HEK cells potential roles in HCN ionic current measurements. *Biophys Molecular Biol*, 2006, 90: 26-27

(上接第 1042 页)

[22] Huiming Lu, GuanJun Gao, Guangzhi Xu, et al. Deinococcus radiodurans Ppr1 Switches on DNA Damage Response and Cellular Survival Networks after Radiation Damage [J]. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 8: 481-494

[23] Gaur, NK, Oppenheim J, Smith I. The Bacillus subtilis sin gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a

DNA-binding protein [J]. *J. Bacteriol*, 1991, 173: 678-686

[24] Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond[J]. *FEMS Microbiology Rev*, 2005, 29(2): 231-262

[25] Aravind L, and Eugene V. Koonin. DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27: 4658-4670