

· 基础医学 ·

文章编号: 1002-0217(2016) 06-0511-05

人 HCN4 基因真核表达质粒构建及在 HEK293 细胞中的表达

谢向荣^{1,2} 左广锋³ 程浪² 汪茗² 曹蘅¹ 汪和贵¹ 蔚有权¹ 杨浩¹ 芮世宝¹ 杨玉雯¹, 汤圣兴¹

(1.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 心内科 安徽 芜湖 241001; 2.皖南医学院 活性生物大分子研究安徽省重点实验室 安徽 芜湖 241002; 3.南京医科大学附属南京医院 心内科 江苏 南京 210006)

【摘要】目的: 构建人 HCN4 基因的真核表达质粒并转染人胚胎肾细胞, 建立异源性表达 HCN4 通道模型。方法: 通过聚合酶链反应扩增人 HCN4 基因全长核苷酸序列, 双酶切(*XhoI* 和 *EcoRI*) 后插入真核表达质粒 pIRES2-EGFP 中, 构建重组真核表达质粒 pIRES2-HCN4-EGFP。应用脂质体法将重组质粒 pIRES2-HCN4-EGFP 转染入 HEK293 细胞中进行表达。全细胞膜片钳技术检测 HCN4 通道电流。结果: 酶切及测序的结果显示 pIRES2-HCN4-EGFP 构建成功, 倒置荧光显微镜能观察到 EGFP 绿色荧光, 反转录-聚合酶链反应检测到 HCN4 mRNA 表达, 膜片钳检测到 HCN4 基因编码的通道电流。结论: 成功建立异源性表达 HCN4 通道模型, 为进一步研究 HCN4 通道电生理特性提供了实验基础。

【关键词】HCN4 基因; 转染; 异源性表达; HEK293 细胞

【中图分类号】R 541.2 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.001

Construction of human HCN4 gene eukaryon expression vector and its expression in HEK293 cells

XIE Xiangrong, ZUO Guangfeng, CHENG Lang, WANG Ming, CAO Heng, WANG Hegui, YU Youquan, YANG Hao, RUI Shibao, YANG Yuwen, TANG Shengxing

Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To construct eukaryon expression vector of human HCN4 gene and transfect it into human embryonic kidney cells (HEK293).

Methods: cDNA encoding human HCN4 gene was amplified by polymerase chain reaction, then digested with the restriction endonucleases *XhoI* and *EcoRI* and inserted into eukaryotic expressing vector pIRES2-EGFP that was transfected into HEK293 cells by Fugene HD. Whole-cell patch clamp indicated that hHCN4 gene was transfected into HEK293 cells. **Results:** Double enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the HCN4 gene was completely accurate. GFP was observed in the transfected 293 cells under a fluorescent microscope. HCN4 mRNA expression was confirmed by RT-PCR. Whole-cell patch clamp recorded ionic currents of transfected HCN4. **Conclusion:** The pIRES-HCN4-EGFP eukaryon expression vector was successfully constructed, and pacemaker channel HCN4 gene heterologous expression was established.

【Key words】 HCN4 gene; transfection; heterologous expression; HEK293 cell

正常心脏节律的产生取决于起搏细胞 4 相自动除极化, 而 If 电流在此除极化过程中起着重要作用^[1]。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, 该通道由 HCN 基因编码, 其电生理特性是超极化时被激活, 呈电压和时间依赖性, 为非选择性的内向阳离子通道^[2]。目前已知 HCN 基因共有四个亚型, 分别为 HCN1 ~ HCN4, 这四个基因亚型分别编码具有不同电生理特性及不同

组织分布的 HCN1 ~ HCN4 通道。心脏中的起搏细胞主要表达 HCN4, 该通道占总 HCN mRNA 的 80% 以上^[3-4], 主要调节心率^[5]。最近研究发现, 严重的缓慢性心动过缓与 HCN4 基因某些位点突变相关^[6-8]。通过基因工程构建生物起搏器来根治严重的缓慢性心动过缓, 理想的基因表达载体不可或缺。因此, HCN4 基因表达载体的构建成为重要的研究手段。本研究通过构建人 HCN4 基因的重组真核表

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2013Z340; KJ2016A728); 活性生物大分子研究安徽省重点实验室自主研究课题(LAB201403, LAB201401); 安徽省大学生创新训练计划项目(AH201410368150)

收稿日期: 2016-06-16

作者简介: 谢向荣(1981-), 男, 主治医师, 讲师(电话) 13966032437 (电子信箱) xxr200611@ sina.com;

汤圣兴, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师(电子信箱) tsx2229@ 163.com 通信作者。

达载体 pIRES2-HCN4-EGFP ,应用分子生物学及膜片钳技术检测 pIRES2-HCN4-EGFP 在 HEK293 细胞中的表达 ,以期建立异源性表达 HCN4 通道模型 ,为该通道的功能研究及缓慢性心律失常疾病的基因治疗等提供了实验基础 ,同时也为该通道的药物干预研究提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 HEK293 细胞(中国科学院上海细胞库);无内毒素质粒大量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒(QianGEN);反转录-聚合酶链反应试剂盒、pMD-18T 载体(Takara);PCR 试剂盒、DNA 上样缓冲液及琼脂糖凝胶(南京凯基);胰化蛋白胨、酵母提取物(Oxoid);限制性内切酶 *XhoI*、*EcoRI* ,T4 DNA 连接酶(NEB);胎牛血清及高糖 DMEM 培养基(Gibco);Fugene HD 转染试剂(Roche);pIRES-EGFP 质粒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、DNA marker、Platinum Pfx DNA 聚合酶、Taq Polymerase、dNTP、MgSO $_4$ 、Trizol 均为 Invitrogen 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 HCN4 基因的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 扩增 根据 GenBank 报道的人 HCN4 基因的全长序列(NM_005477.2) 设计单链 oligo 引物 ,并在正向引物和反向引物中分别添加 *EcoRI*、*XhoI* 两个酶切位点 ,引物由 Invitrogen 公司合成。寡聚单链核苷酸进行两轮 PCR 扩增。其中第一轮 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min 1 cycle; 95 $^{\circ}$ C 20 s ,55 $^{\circ}$ C 20 s ,68 $^{\circ}$ C 1 min 25 cycles; 68 $^{\circ}$ C 5 min 1 cycle。第二轮 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min 1 cycle; 95 $^{\circ}$ C 20 s ,60 $^{\circ}$ C 20 s ,68 $^{\circ}$ C 1 min 25 cycles; 68 $^{\circ}$ C 5 min 1 cycle。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行回收纯化。

1.2.2 测序及 HCN4 基因拼接 将连接 pMD-18T 载体与回收纯化的 PCR 产物 转化 DH5 α 感受态细胞 采用含氨苄青霉素的平板进行筛选 ,次日挑单克隆后摇菌 ,最后提取质粒并测序 鉴定插入片段的序列与目的序列是否一致。应用重叠 PCR 技术将插入片段拼接成完整的 HCN4 基因 ,并进行扩增。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min 1 cycle; 95 $^{\circ}$ C 40 s ,60 $^{\circ}$ C 40 s ,68 $^{\circ}$ C 3 min 40 s 25 cycles; 68 $^{\circ}$ C 10 min 1 cycle。扩增产物再次采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收纯化。

1.2.3 重组质粒 pIRES2-HCN4-EGFP 的构建 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切带有相应酶切位点的 HCN4 基因和 pIRES2-EGFP 载体 ,回收 HCN4 片段和线性 pIRES2-EGFP ,用 T4 DNA 连接酶连接 HCN4 和

pIRES2-EGFP。连接体系为: 双酶切 HCN4 基因 5 μ L 双酶切 pIRES2-EGFP 载体 3 μ L ,10X 连接酶缓冲液 1 μ L ,连接酶 0.5 μ L ,双蒸水 0.5 μ L。构建的 pIRES2-HCN4-EGFP 重组质粒采用双酶切、PCR、测序等方法进行验证 确定构建成功后扩增备用。

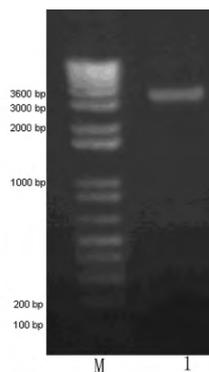
1.2.4 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒的瞬时转染 HEK293 细胞采用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$ 饱和湿度的细胞培养箱中培养。倒置显微镜下观察细胞生长情况 2~3 d 传代 1 次 ,消化时采用 0.25% 的胰酶-EDTA 消化液。质粒转染参考既往文献^[9] 中的方法进行 ,48 h 后采用倒置荧光显微镜观察转染细胞的 EGFP 绿色荧光 确定转染效率。

1.2.5 HCN4 基因转录水平的检测 参考既往文献^[9] 中的方法收集 HEK293 细胞 提取总 RNA ,进行逆转录、基因扩增 ,最后用 1.5% 琼脂糖 110 V ,15 min 凝胶电泳进行分析。hHCN4 上游引物: 5'-CCCGCCTCATTTCGATATATTCAC-3' ,hHCN4 下游引物: 5'-GAGCGCGTAGGAGTACTGCTTC-3'。

1.2.6 电生理实验 HEK293 细胞转染 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒 48 h 后 ,采用全细胞膜片钳技术记录单细胞的 HCN4 通道电流。所有电生理操作均在室温(20~25 $^{\circ}$ C) 下进行 按照文献^[10] 中的方法进行数据采集及分析。

2 结果

2.1 HCN4 基因扩增及 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒测序 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切 pIRES2-HCN4-EGFP 重组质粒 ,采用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳(电压 110 V ,时间 15 min) ,凝胶成像后可见一条与目的基因(3612bp) 位置相符的条带(如图 1 所示)。测序结果经 NCBI blast 比对后 ,序列一致 ,其中序列号为 NM_005477.2(如图 2 所示)。



M: DNA Marker; 1: HCN4 基因。

图 1 扩增带有酶切位点的 HCN4 基因

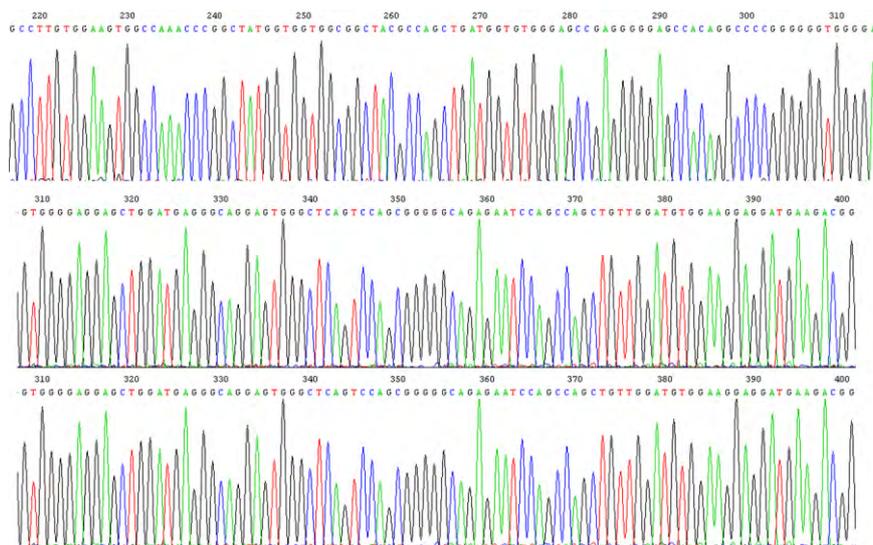
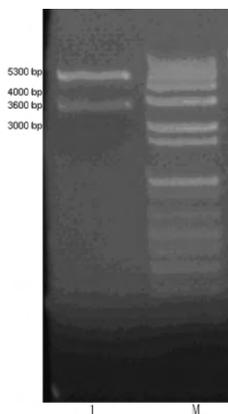


图 2 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒基因测序结果

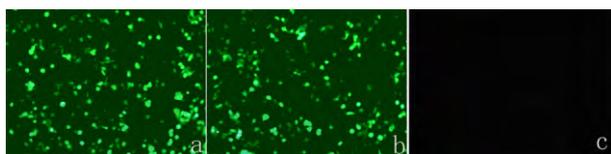
2.2 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定结果可知 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒被切成长度为 5.3 kb 的载体和 3.6 kb 的 DNA 片段,提示质粒构建的完全正确(如图 3 所示)。



1: 重组质粒被切成载体(5.3 kb)和 3.6 kb 的 DNA 片段; M: DNA Marker。

图 3 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切重组质粒 pIRES2-HCN4-EGFP

2.3 EGFP 表达检测 通过倒置荧光显微镜观察,转染携带有 EGFP 质粒的 HEK293 细胞均可见绿色荧光,提示转染成功。而未转染质粒的 HEK293 细胞则未见绿色荧光(如图 4 所示)。

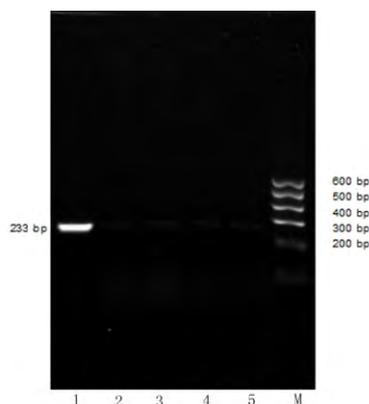


a. 转染 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒的 HEK293 细胞; b. 转染 pIRES2-EGFP 质粒的 HEK293 细胞; c. 未转染质粒的 HEK293 细胞。转染 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒和转染 pIRES2-EGFP 质粒的 HEK293 细胞均可见绿色荧光,未转染 HEK293 细胞未见绿色荧光表达。

图 4 转染及未转染的 HEK293 细胞荧光显微镜特点

2.4 转染细胞的 HCN4 mRNA 表达 应用 RT-PCR

方法 提取 HEK293 细胞总的 RNA,经逆转录后获取 cDNA 并进行扩增,凝胶电泳结果显示 pIRES2-HCN4-EGFP 组扩增出大约 233 bp 的目的片段,而 pIRES2-EGFP 组和未转质粒组则无相应条带,表明导入的异源性人 HCN4 基因(hHCN4)已转录出相应的 mRNA(如图 5 所示)。



1: pIRES2-HCN4-EGFP 组; 2、3: pIRES2-EGFP 组; 4、5: 未转质粒组; M: DNA Marker。

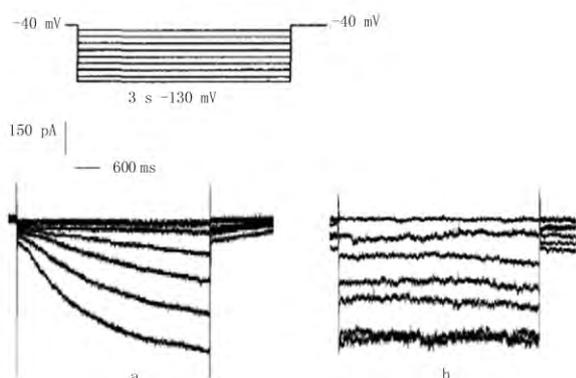
图 5 RT-PCR 检测 HCN4 在转基因细胞中的转录

2.5 异源性 hHCN4 通道电流的记录 转染 pIRES2-HCN4-EGFP 质粒的 HEK293 细胞 48 h 后均可记录到超极化激活的内向电流,并呈现出电压依赖性(见图 6),提示表达 hHCN4 通道蛋白,进一步证实了异源性 hHCN4 基因在 HEK293 细胞中的表达。pIRES2-EGFP 组和未转质粒组则未检测出电流。

3 讨论

目前,HCN 家族有 HCN1~HCN4 四个亚型,其在鼠及人等哺乳动物中已经被克隆且得到广泛的研究^[11-12] 这一家族各亚型在组织分布、电生理特性、

生理功能、不同动物种属中的表达均不相同。HCN4 是已知成年人窦房结中最主要的亚型,介导了在窦房结起搏活动中的关键因素 If 电流,因此相应的 HCN4 基因的突变也和严重的缓慢性心律失常密切相关^[13]。



a: 克隆 hHCN4 通道的 I/V 关系曲线; b: 对照组未引出电流。

图 6 膜片钳技术记录 hHCN4 通道电流

近年来很多研究显示了 HCN4 基因在形成心脏节律及控制心率中起着至关重要的作用: ①胚胎期 HCN4 基因敲除的大鼠心率减少 40% 缺少对 cAMP 的反应并最终死于子宫内^[14-15]; ②全 HCN4 基因敲除的成年小鼠可出现严重的心动过缓、房室传导阻滞,甚至在第 5 天左右出现心脏骤停及死亡^[16]; ③在研究遗传性窦房结功能障碍的患者中发现,严重的缓慢性心律失常与 HCN4 点突变(D553N 或 1613delC 位点)密切相关^[6-8]。

目前,治疗缓慢性心律失常的主要方法仍是在心脏中植入人工起搏器,虽然该方法具有很好的稳定性,但它存在使用寿命有限、费用昂贵、不受神经体液调节等缺点,因此,科研工作者开始探讨生物起搏治疗的可能。HCN4 基因是 HCN 家族参与心脏节律形成的最重要的亚型,因此可以作为基因治疗缓慢性心律失常的靶基因。但 HCN4 通道电生理特性及其对众多药物(尤其是抗心律失常药物)的干预反应仍未充分研究,故需构建异源性 HCN4 通道模型,在此模型上进行电生理及药物干预研究,为上述 HCN4 靶基因治疗缓慢性心律失常提供更多的理论依据及实验基础。国内外关于 HCN4 基因的构建及转染表达的研究多应用于实验动物细胞,由于 HCN4 基因在不同动物种属中的表达均不相同,因此本研究系构建人 HCN4 基因的真核表达质粒,并在人胚胎肾细胞中表达,对于人体的生物起搏治疗具有更高的医学研究价值。

本研究构建的 pIRES2-EGFP-HCN4 真核表达

载体能有效地将 hHCN4 导入 HEK293 细胞中,通过荧光显微镜观察绿色荧光可明确转染成功,并进一步通过 RT-PCR 方法和膜片钳技术分别检测了 hHCN4 的 mRNA 和通道蛋白的表达,表明成功建立了 hHCN4 基因异源性表达模型。该模型的建立为研究 hHCN4 通道的电生理特性及其对药物干预的反应提供了广阔的平台,也为今后起搏通道基因治疗窦房结功能障碍提供理论依据,并为后续的在体生物起搏器开发研究奠定了基础。

【参考文献】

[1] DARIO DIFRANCESCO.Funny channel gene mutations associated with arrhythmias[J].J Physiol 2013 ,591 (17) : 4117-4124.
 [2] MARTIN BIEL ,CHRISTIAN WAHL-SCHOTT ,STYLIANOS MICHALAKIS ,et al. Hyperpolarization - Activated Cation Channels: From Genes to Function[J].Physiol Rev 2009 ,89: 847-885.
 [3] SHI W ,WYMORE R ,YU H ,et al. Distribution and prevalence of HCN mRNA expression in cardiac tissue [J].Circ Res ,1999 ,85: e1 -6.
 [4] THOLLON C ,BEDUT S ,VILLENEUVE N ,et al. Use - dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity [J].Br J Pharmacol 2007 ,150: 37-46.
 [5] Pietro Scicchitano ,Santa Carbonara ,Gabiella Ricci ,et al. HCN Channels and Heart Rate [J].Molecules 2012 ,17: 4225-4235.
 [6] SCHULZE-BAHR E ,NEU A ,FRIEDERICH P ,et al. Pacemaker channel dysfunction in patient with sinus node disease [J].J Clin Invest 2003 ,111: 1537-1545.
 [7] MILANESI R ,BARUSCOTTI M ,GNECCHI-RUSCONE T ,et al. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel [J].N Engl J Med 2006 ,354: 151-157.
 [8] NOF E ,LURIA D ,BRASS D ,et al. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis ,trafficking ,and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia [J].Circulation 2007 ,116: 463-470.
 [9] 左广锋 陈绍良 徐艳,等.人 HCN2 真核表达载体的构建及在 HEK293 细胞中的表达.现代生物医学进展 ,2011 ,11(6) : 1068 -1071.
 [10] ZUO GF ,LI MH ,ZHANG JX ,et al. Capsazepine concentration dependently inhibits currents in HEK 293 cells mediated by human hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 and 4 channels [J].Exp Biol Med (Maywood) ,2013 ,238(9) : 1055-1061.
 [11] ISHII TM ,TAKANO M ,XIE LH. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node [J].J. Biol Chem ,1999 ,274: 12835-12839.
 [12] MOOSMANG S ,STIEBUTI J ,ZONG X ,et al. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker Channels in cardiac and neuronal tissues [J].Eur J Biochem 2001 ,268: 1646-1652.

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2016) 06-0515-04

超声辅助法在亚洲日月蛤多糖提取工艺优化中的应用

胡 伟^{1 2} 唐小牛^{1 2}

(皖南医学院 1.医学寄生虫学教研室; 2.活性生物大分子研究安徽省重点实验室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨超声辅助法对亚洲日月蛤多糖最佳提取工艺。方法: 分别用热水浸提法和超声辅助热水浸提法提取亚洲日月蛤多糖, 并比较两种方法的生物多糖得率。再分别以液固比、提取温度和提取时间为条件, 采用超声辅助法提取亚洲日月蛤多糖, 通过单因素正交实验确定多糖得率的最优提取条件。结果: 相同条件下, 热水浸提法提取出的亚洲日月蛤多糖得率为 1.05%, 而超声辅助热水浸提法的多糖得率为 1.71%。超声辅助热水法提取亚洲日月蛤多糖的最优条件是: 在超声功率 160 W 条件下, 液固比 40:1(mL/g)、温度为 90℃、时间 4 h, 在此条件下亚洲日月蛤多糖得率为 2.01%, 其中液固比($P<0.01$) 和提取温度($P<0.05$) 对多糖提取率影响较大。结论: 超声辅助法提取亚洲日月蛤多糖得率明显优于热水浸提法。

【关键词】超声; 亚洲日月蛤; 多糖; 优化

【中图分类号】R 284 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.002

Optimizing the ultrasound-assisted extraction technology in isolation of the polysaccharide from *Amusium pleuronectes*

HU Wei, TANG Xiaoniu

Department of Medical Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To optimize the ultrasound-assisted extraction technique in isolating the polysaccharide from *Amusium pleuronectes*. **Methods:** Isolation of polysaccharide from *Amusium pleuronectes* was performed with simple hot water extraction or ultrasound-assisted hot water extraction, and polysaccharide yield was compared pertaining to the two techniques. Then optimal polysaccharide extraction condition was determined by single factor and orthogonal test on water to material ratio, extraction temperature and extraction time basis. **Results:** Polysaccharide yield of *Amusium pleuronectes* was 1.05% by simple hot water extraction and 1.71% by ultrasound-assisted hot water isolation in the same condition. Optimal conditions for polysaccharide production by ultrasound assistance were as follows: ultrasound power at 160 W, water to material ratio by 40:1(mL/g), extraction temperature at 90℃ and extraction time for 4 hours. This condition resulted in polysaccharide yield from *Amusium pleuronectes* by 2.01%. In addition, the water-material ratio and extraction time had great impact on the recovery rate($P<0.01$; $P<0.05$, respectively). **Conclusion:** Ultrasound-assisted hot water extraction may lead to higher polysaccharide yield from *Amusium pleuronectes* than simple hot water isolation technique.

【Key words】ultrasound; *Amusium pleuronectes*; polysaccharide; optimization

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2014A270)

收稿日期: 2016-08-04

作者简介: 胡 伟(1987-), 男, 2014 级硕士研究生, (电话) 13145531616 (电子信箱) 412397487@ qq.com;

唐小牛, 男, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) txniu163.com, 通信作者。

[13] NANA DUHME, PATRICK A. SCHWEIZER, DIERK THOMAS, et al. Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation [J]. Eur Heart J, 2013, 34(35): 2768-2775.

[14] STIEBER J, HERRMANN S, FEIL S, et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 100(25): 15235-15240.

[15] HARZHEIM D, PFEIFFER KH, FABRITZ L, et al. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP [J]. Embo. J, 2008, 27: 692-703.

[16] MIRKO BARUSCOTTI, ANNALISA BUCCHI, CARLO VISCOMI, et al. Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4 [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108(4): 1705-1710.