

耐辐射球菌转录因子 DdrO 的基因克隆与生物信息学分析 *

杜 邱^{1,2} 何淑雅^{1,2,△} 马 云² 李斌元² 孙晓宇² 廖端芳³

(1 南华大学公共卫生学院 湖南 衡阳 420001 2 南华大学生物化学与分子生物学研究所 湖南 衡阳 420001 ;

3 南华大学药理教研室 湖南 衡阳 420001)

摘要 目的 克隆耐辐射球菌 ddrO 基因,并对其进行生物信息学分析,预测其功能。方法 根据耐辐射球菌 ddrO 基因序列,由 Primer Premier 5 设计一对引物,以提取的耐辐射球菌基因组为模板,PCR 扩增获得耐辐射球菌 ddrO 基因,序列测定并利用生物信息学软件对 ddrO 基因的理化性质、高级结构及生物学功能等进行分析与预测。结果 成功获得了 ddrO 基因。生物信息学分析发现,ddrO 基因核苷酸序列长度为 396bp,编码一个 131aa 组成的相对分子质量为 14.993kD 的预测的 DdrO 转录因子。核酸同源性搜索及比较分析仅在与耐辐射球菌同属的 *Deinococcus geothermalis* 和 *Deinococcus deserti* 中发现高度相似的序列;蛋白同源性搜索发现一些与 DdrO 显著同源的蛋白,如 Deide_20570 (95%),Dgeo_0336 (90%),Deide_3p02170 (82%)等 结构域分析发现 DdrO 含有 HTH (helix-turn-helix) DNA 结合结构域。结论:根据生物信息学结果预测 DdrO 蛋白可能具有转录调控作用,参与 DNA 修复和复制,在耐辐射球菌的 DNA 损伤修复过程中发挥一定作用。

关键词 耐辐射球菌; ddrO 基因; 基因克隆; 生物信息学

中图分类号 Q937,Q75,Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 06-1037-06

Cloning and Bioinformatics Analysis of Transcription Factor DdrO
in *Deinococcus Radiodurans**DU Qiu^{1,2}, HE Shu-ya^{1,2,△}, MA Yun², LI Bin-yuan², SUN Xiao-yu², LIAO Duan-fang³

(1 School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China;

2 Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang 421001, China;

3 Department of Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Objective: To clone the *Deinococcus radiodurans* ddrO gene, and predict its function by bioinformatics analysis. **Methods:** According to the published ddrO gene sequence of *Deinococcus radiodurans*, by using the software of Primer Premier 5, a pair of primers were designed and synthesized. By using the genomic DNA isolated from *Deinococcus radiodurans* as templates for polymerase chain reaction (PCR), and *Deinococcus radiodurans* ddrO gene were gained. Sequenced and various bioinformatics softwares were employed to analyze and predict its physicochemical properties, advanced structure and biological function. **Results:** The ddrO gene was successfully obtained. Bioinformatics analysis revealed that ddrO nucleotide sequence length was 396bp and encoded a transcription factor DdrO containing 131 amino acid with a molecular weight of 14.993 KD. Nucleic acid homology search and comparative analysis showed that highly similar sequences were found only belong to *Deinococcus geothermalis* and *Deinococcus deserti*, which are the same genus with DR; some significant homology of the DdrO protein were found by Protein homology search, such as Deide_20570 (95%), Dgeo_0336 (90%), Deide_3p02170 (82%), etc.; and domain analysis showed that DdrO containing a HTH (helix-turn-helix) DNA-binding domain. **Conclusion:** Based on the results of bioinformatics, we predict that DdrO protein may have transcriptional regulatory function, possibly through a mechanism involved in the DNA repair and replication in *Deinococcus radiodurans* and played an important role in the process of DNA damage repair.

Key words: *Deinococcus radiodurans*; ddrO; Gene cloning; Bioinformatics

Chinese Library Classification(CLC): Q937,Q75,Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1037-06

前言

耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR)是 1956 年由美国科学家 Anderson^[1]等在经 γ 射线辐照灭菌后仍然变质的马肉罐头中首次发现的,是至今地球上发现的最能抵抗辐射的物种之一^[2]。另外,DR 对紫外线、过氧化氢、干燥和其它能够导致 DNA 损伤的物理化学因子等也表现很强的抗性^[3-7]。虽然 DR 具有细菌典型的 DNA 修复系统,但却没有大基因组细菌的修复系统那么复杂和变化多端。研究表明,在一定的辐射剂量下,DR 的 DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)数目与

* 基金项目 国家自然科学基金(30770647),湖南省自然科学基金(08JJ3033)和湖南省科技厅科技计划项目(2010SK3036)

作者简介 杜邱(1985-),男,硕士研究生,研究方向 环境化学与辐射分子毒理。E-mail:dqvictory@126.com

△通讯作者 何淑雅,电话 0734-8281620, E-mail: skyhe2000@hotmail.com

(收稿日期 2010-11-03 接受日期 2010-12-13)

PCR 扩增。扩增产物回收后与 pGEM-T Easy Vector 进行连接,并转化至大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性克隆酶切鉴定后进行测序验证。

1.2.4 ddrO 基因的生物信息学分析 DR ddrO (DR_2574)基因在耐辐射球菌染色体上的位置和上下游基因序列的关系由 NCBI 基因组数据库^[14]来分析;基因的基本特性分析由 TIGR 数据库^[15]来获得;ddrO (DR_2574)的基因和蛋白序列从 NCBI 核酸和蛋白数据库中分别获得;序列同源性分析由 BLASTN 和 BLASTP 程序^[16]搜索获得;多序列比对用 Bio Edit 软件分析。对蛋白质的初级结构、二级结构和三级结构主要运用 Bio Edit 软件和 Swiss-Prot^[17]在线工具进行分析;对蛋白质结构域或 motif 搜索综合运用在线网站 SSDB^[18]、CDD^[19]和 SMART^[20]分析。

2 结果与分析

2.1 ddrO 基因的克隆

因为我们后续实验选用的穿梭表达载体 pRADZ3(南华大学城建学院谢水波教授馈赠)不含蛋白标签,为便于检测 ddrO 的表达,我们设计引物时在终止密码子前面加入了 18 bp 的组氨酸标签序列。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,可见一条约为 423bp 的 DNA 条带,扩增片段大小与预期大小相符(图 2);克隆载体 pGT-ddrO 经 NdeI 和 SpeI 双酶切得到 423bp 与 2980bp 两条片段,与预期相符(图 2)进一步测序分析,结果显示扩增的基因片段与预期相符,说明成功获得 ddrO 基因。

2.2 ddrO 基因及其蛋白产物 DdrO 的生物信息学分析

2.2.1 DR ddrO 基因在其基因组中的位置和基本特性 DR ddrO (DR2574)基因定位于其一号染色体上。它在 NCBI 数据库中的基因编号(GeneID)为 1798752。DR ddrO (DR2574)基因的上游邻近基因为与它反向的 DR2573 基因,下游邻近基因为与之同向的 DR2575 基因。图 3 为耐辐射球菌 ddrO(DR2574)基因的具体位置图。

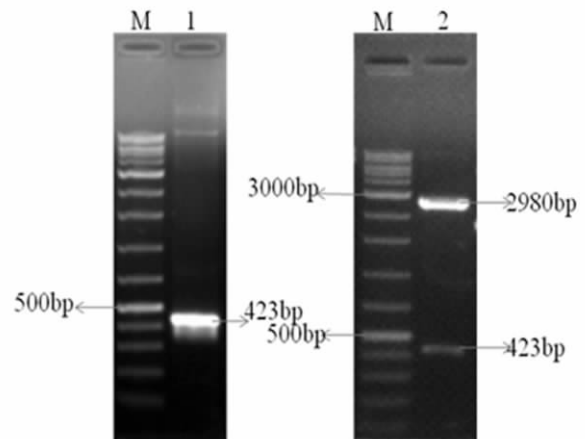


图 2 DR ddrO 基因的 PCR 扩增结果和酶切鉴定结果

Fig.2 PCR products of ddrO gene from DR and the results of enzyme digestion M: DNA Marker I; 1: PCR Products, 2: PGT-ddrO/NdeI+SpeI

chromosome: 1;



图 3 ddrO 基因(DR2574)在耐辐射球菌染色体上的位置

Fig.3 Regional view of DR2574 in the Mega plasmid of DR

从 NCBI 和 TIGR 数据库可知,DR ddrO(DR2574)基因序列全长为 396bp,编码的 DdrO 蛋白序列全长 131aa(氨基酸),该蛋白预测分子量大小为 14993.08Da(道尔顿),等电点(PI)为 6.2705,GC 含量 64.63%。

2.2.2 DR ddrO (DR2574) 的同源性检索 基于整体核苷酸序列的搜索,在其它生物基因组数据库中并没有找到 DR ddrO (DR2574) 显著的类似物,仅在与 DR 同属的Deinococcus deserti 和 Deinococcus geothermalis 中发现与 ddrO (DR2574) 基因高度相似的序列,并且序列存在显著的特征,描述为 "transcriptional regulator, XRE(Xenobiotic Response Element,XRE) family",提示它们存在结构域的显著同源。XRE 家族的蛋白是一类具

有典型 HTH 结构域的转录调控蛋白,是原核生物 DNA 结合蛋白,属于异响应元件家族的转录调节因子。

2.2.3 DdrO (DR2574) 同源蛋白的搜索 DdrO (DR2574) 序列的 BLASTP 分析结果显示许多蛋白与 DdrO 有显著的同源性,如与 DR 同属的 Deide_20570,Dgeo_0336,Deide_3p02170 蛋白及栖热菌属的 Mrub_2305, Mesil_2927 等蛋白。分析发现这些序列的相似性很高,并且这些蛋白都含有 XRE 家族保守结构域,描述为 "transcriptional regulator, XRE family"。

另外通过 Clustal W 程序进行多序列比对分析,也发现这些序列具有相当高的相似性,并且非常保守,这些蛋白均具有保守的 XRE 家族结构域。

对以上蛋白的保守结构域进行建树分析发现,DR DdrO 蛋白与 *Deinococcus deserti* VCD115 Deide_20570 具有最近的进化距离。

2.2.4 DdrO 的蛋白结构分析

(1) 一级结构分析 利用 BioEdit 软件对 DdrO 一级结构进行分析,结果见表 1。

表 1 氨基酸组成表
Table 1 Amino acid composition

Amino Acid	Number	Mol%	Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	7	5.34	Cys C	0	0.00
Asp D	10	7.63	Glu E	11	8.40
Phe F	1	0.76	Gly G	9	6.87
His H	3	2.29	Ile I	7	5.34
Lys K	6	4.58	Leu L	22	16.79
Met M	1	0.76	Asn N	3	2.29
Pro P	7	5.34	Gln Q	3	2.29
Arg R	13	9.92	Ser S	6	4.58
Thr T	9	6.87	Val V	6	4.58
Trp W	2	1.53	Tyr Y	5	3.82

Note: Protein: gi|15807558|ref|NP_296294.1| transcriptional regulator [*Deinococcus radiodurans* R1]

Length = 131 amino acids Molecular Weight = 14992.27 Daltons

分析结果显示,该多肽链由 131 个氨基酸残基构成,蛋白质分子质量为 14992.27 D,含有 20 种氨基酸中的 19 种,缺半胱氨酸,而亮氨酸含量最高,占 22%。DdrO 的 131 个氨基酸中强碱性氨基酸(K, R)有 19 个,强酸性氨基酸(D, E)有 21 个,疏水氨基酸(A, I, L, F, W, V)有 45 个,不带电荷的极性氨基酸有

(N, C, Q, S, T, Y)26 个。

(2) 二级结构预测 运用 Swiss-Prot 在线工具对 DdrO 的二级结构进行预测,结果显示 DdrO 的二级结构主要以 α -螺旋,不规则卷曲为蛋白最大量的结构元件, β -折叠散布于整个蛋白质中。

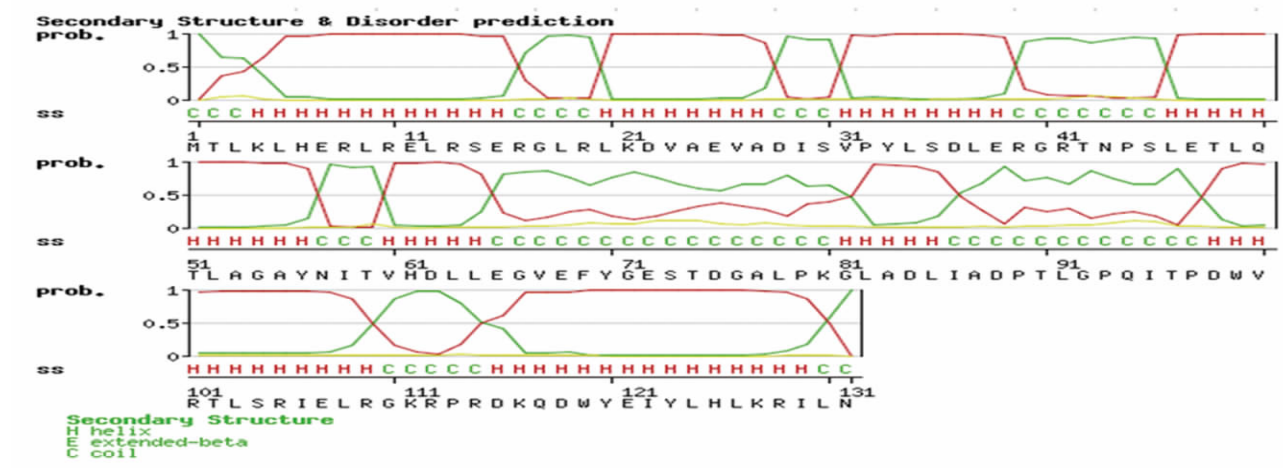


图 4 DR DdrO 蛋白二级结构预测 (H 螺旋;E: β -折叠;C:无规则卷曲)

Fig.4 Prediction of secondary structure of DR DdrO protein (H helix;E:extended-beta;C:coil)

(3) 三级结构预测 运用 Swiss-Prot 在线工具对 DdrO 的三级结构进行预测,结果如图 11 所示,Helix-turn-helix -3 family 类蛋白的三维空间结构主要是由 α -螺旋和不规则卷曲围绕形成,属于 HTH DNA 结合蛋白大家族,包括细菌质粒拷贝控制蛋白,细菌甲基化酶,各种噬菌体转录调控蛋白等。

2.2.5 DR DdrO 蛋白的结构域分析 由于不同的蛋白质结构域数据库和分析软件有不同的识别能力和特点,为了更准确地鉴定 DdrO 蛋白的保守结构域,我们综合运用多种在线工具(包括 CCD、SSDB 和 SMART 等)对 DdrO 蛋白的结构域进行分析。

运用在线工具 SSDB 对 DR DdrO 蛋白的结构域进行保守

motif 的分析。结果如表 2 和图 6 所示 耐辐射球菌 DdrO 蛋白在 9 到 63,100 到 116 氨基酸位置存在 HTH_3 家族保守结构域,预测 E 值(E-value)为 $5.4e-16$,表明这一结构域具有很高的可信度;在 9 到 63 及 53 到 76 氨基酸位置存在 HTH_CROC1 和 PFKB_KINASES_1 结构域,但无可信度。原先的研究发现 HTH_3 结构域非常保守,许多原核和真核生物都含有此类似结构域,具有 DNA 结合活性和转录调控作用,还参与 DNA 修复和复制。

同时,用 CDD(Conserved Domains Database)在线软件对 DR DdrO 进行功能域分析,结果发现在 21-63 氨基酸序列间存在 HTH_XRE 保守结构域。进一步的运用 SMART 分析表明,DdrO 在 8 到 63 氨基酸位置存在 HTH_3 家族保守结构域,且可信度较高。

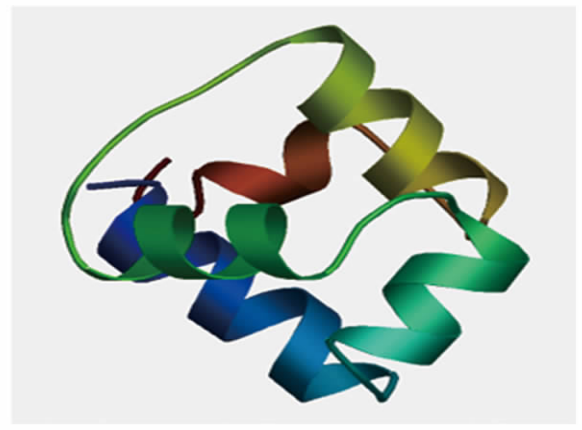


图 5 预测的 DR HTH_3 家族蛋白的三维结构

Fig.5 Predicted three-dimensional structure of DR HTH_3 family proteins

表 2 SSDB 对 DR DdrO 蛋白保守结构域搜索结果

Table 2 SSDB Motif Search Result of DdrO

Motif id	From	To	Definition	E value	Score
pf:HTH_3	9	63	Helix-turn-helix	$5.4e-16$	-
ps:HTH_CROC1	9	63	Cro/C1-type HTH domain profile	-	72283
ps:PFKB_KINASES_1	53	76	pfkB family of carbohydrate kinases signature 1	-	-
pf:HTH_3	100	116	Helix-turn-helix	$5.4e-16$	-

Note: Organism: D.radiodurans; Gene: DR_2574; Definition: transcriptional regulator

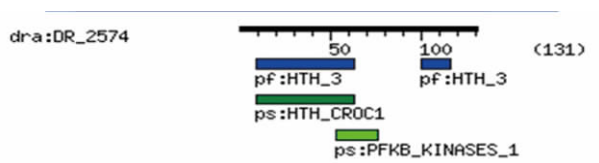


图 6 SSDB 分析耐辐射球菌 DdrO 蛋白结构域

Fig.6 Motif search of DR DdrO on the basis of SSDB

3 讨论

自 1956 年发现 DR 至今,对其辐射抗性机制的研究已近 50 年,但到目前为止,并没有在 DR 中发现特别的生存策略。与辐射敏感细菌相比,DR 最根本的辐射调控机制至今仍然未得到确切的描述,例如,大肠杆菌 *lexA* 调控的依赖于 SOS 反应的辐射调控机制已经得到很好的阐明,但是在 DR 中相似的系统却还未得到鉴定,至少现在还没有一个机制能够完全解释这种极端辐射抗性。DR 这种极端的辐射抗性更可能是一个长期进化,不同的修复机制之间相互协调,多种因素综合调控的结果。

本研究从 DR 中克隆出 ddrO 基因,通过生物信息学的方法对 ddrO 及其蛋白产物 DdrO 进行分析发现,DdrO 含有 HTH (helix-turn-helix) DNA 结合结构域。核酸同源性搜索及比较分析仅在与 DR 同属的 *Deinococcus geothermali*s 和 *Deinococcus*

deserti 中发现高度相似的序列(图 5),说明 ddrO 只存在于 *Deinococcus* 属中;另发现许多与 DdrO 显著同源的蛋白,如 Deide_20570 (95%),Dgeo_0336 (90%),Deide_3p02170 (82%),Mrub_2305 (70%),Mesil_2927 (71%)等,它们都含有保守的 XRE 家族结构域。XRE 家族的蛋白是一类具有典型 HTH 结构域的转录调控蛋白。

综合运用多种在线工具(包括 SSDB、CCD 和 SMART 等)对 DdrO 蛋白的结构域进行分析,结果显示预测到的功能域位置存在差异。SSDB 预测结果显示 DR DdrO 蛋白在 9 到 63,100 到 116 氨基酸位置存在 HTH_3 家族保守结构域(图 6),CDD 分析发现在 21-63 氨基酸序列间存在 HTH_XRE 保守结构域,SMART 在线搜索结果显示在 8 到 63 氨基酸位置存在 HTH_3 家族保守结构域,可信度均较高。这种差异可能是由于不同的蛋白质结构域数据库和分析软件具有不同的识别能力和特点造成的;另外 HTH_XRE 保守结构域是一类 HTH 家族保守结构域的典型结构域,二者在结构上存在一定差异。

对 DdrO 进行生物信息学分析的一个重要发现就是,DdrO 和 DR 的一个 DNA 修复多效调节开关 PprI^[21,22]一样,都含有 HTH DNA 结合结构域。在 PprI 蛋白中,HTH 结构域是其行使生物学功能所必需的,对其突变后会影响到整个蛋白质的结构或性质。Huiming L 等^[22]研究发现,pprI 能够调控 DR 六种途径基因的表达,包括氧化应急、能量代谢、转录调控、信号转导、蛋白折叠和组装,PprI 可以直接感应 DNA 损伤及其它细胞损伤信

号而被激活,行使转录调控子的作用,开启防御系统,包括DNA损伤修复系统、转录、翻译及翻译后修饰系统、抗氧化系统、代谢系统,促进这些系统产生更多的功能性蛋白并且激活其它途径,一起促进DR的恢复(图7)。HTH结构域高度保守,存在于原核生物和真核生物的转录因子中,具有很广泛的作用^[23],例如参与转录调控,DNA修复和复制,RNA代谢以及各种信号肽环境的蛋白之间的相互作用等。除了能够调节一些大分子相互作用之外,HTH结构域还与各种不同酶的催化活性相关^[24]。另外,HTH结构域还与很多古细菌代谢酶的激活相关,例如生物素合成酶、乳清酸磷酸核糖转移酶、苏氨酸合成酶等,这些蛋白能够联合各种生物合成基因的催化和转录调控功能来应对各自不同的代谢环境,这种情况同样也存在于其它细菌中^[25]。

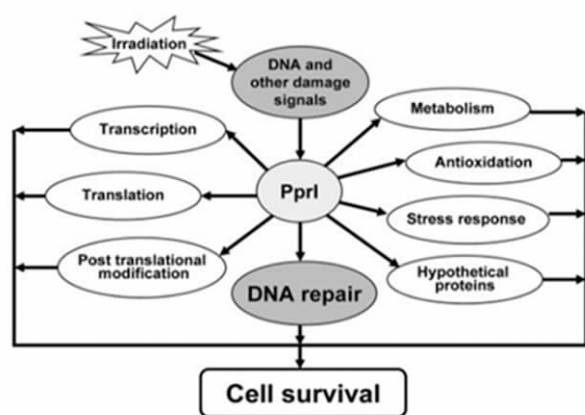


图7 电离辐射后DR通过PprI调控部分系统存活的模式图^[22]

Fig.7 Proposed model for *D. radiodurans* survivorship in part due to activation of the PprI-mediated functional pathways in response to irradiation^[22]

DdrO可能涉及DR DNA损伤修复的调控途径,可能作为一个转录调节因子通过某种机制在DR的DNA损伤修复过程中发挥一定作用。但这留给我们许多问题: DdrO突变体的表型是怎样的呢? DdrO通过哪一种机制识别辐射损伤并且它又是怎样诱导基因表达的? DdrO和PprI之间有什么关系?这样的调节子在其它抗辐射的细菌中是否也存在?目前,DR DdrO转录因子的研究尚处于基因克隆、结构鉴定和表达分析等层面上, DdrO转录因子的功能还没有得到明确的验证,对其下游目标基因和上游调控因子更是知之甚少。通过利用相关生物信息学软件对DdrO蛋白质的结构与功能进行初步预测结果发现DdrO蛋白可能参与转录调控,DNA修复和复制。因此,下一步通过构建该基因的突变株,进一步系统研究DdrO转录因子在DR中的功能;同时深入研究DdrO转录因子与其他蛋白质之间的相互作用及其特性,这对进一步研究DR的抗辐射机制具有重要的意义。

参考文献(References)

[1] Anderson AW, Nordan HC, Can RF, et al. Studies on a radio-resistant micrococcus Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation [J]. Food Technol, 1956, 10:575-578

[2] Kausar J, Ohyama Y, Terato H, et al. 16S rRNA gene sequence of *Rubrobacter radiotolerans* and its phylogenetic alignment with members of the genus *Arthrobacter*, gram-positive bacteria, and members of the family *Deinococcaceae* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(3): 684-686

[3] Lange CC, Wackett LP, Minton KW, et al. Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments [J]. Nat Biotechnology, 1998, 16: 929-933

[4] Minton KW. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* [J]. Mol Microbiol, 1994, 13:9-15

[5] Moseley BE, Evans DM. Isolation and properties of strains of *Micrococcus* (*Deinococcus*) *radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways [J]. J Gen Microbiol, 1983, 129:2437-2445

[6] Wang P, Schellhom HE. Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans* [J]. Can J Microbiol, 1995, 41:170-176

[7] Mattimore V, Battista JR. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation [J]. J Bacteriol, 1996, 178: 633-637

[8] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, et al. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. [J] Microbiol Mol Biol Rev. 2001, 65:44-79

[9] Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, et al. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 4191-4196

[10] Tanaka M, Earl AM, Howell HA, et al. Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance [J]. Genetics 2004, 168: 21-33

[11] Makarova KS, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, et al. *Deinococcus geothermalis*: The Pool of Extreme Radiation Resistance Genes Shrinks [J]. PLoS ONE, 2007, 2(9):1-21

[12] 陈欢. 耐辐射球菌极端条件下和重要基因突变后转录组的研究 [D]. 浙江大学, 2008.06.05

[13] (美) F.M.奥斯伯, R.布伦特, 等著; 颜子颖, 王海林, 等译. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社. 1998, 39

[14] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 2010.03.23

[15] http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/shared/GenePage.cgi?locus=DR_2574. Accessed 2010.03.23

[16] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed 2010.03.26

[17] <http://au.expasy.org/>. Accessed 2010.04.02

[18] http://ssdb.genome.jp/ssdb-bin/ssdb_motif?kid=dra:DR_2574. Accessed 2010.04.15

[19] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>. Accessed 2010.04.23

[20] <http://smart.embl.de/>. Accessed 2010.04.28

[21] Hua YJ, Narumi I, Gao GJ, et al. PprI: A general switch responsible extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306:354-360

(下转第 1071 页)

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,研究人 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 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, 4658-4670