

# 绵羊钙调蛋白调节基因 *Calponin h1* 的分子克隆

岳作军, 宋俊芳, 黄朝峰, 刘海波, 朱朝辉, 张晓娟,  
张毅, 谭萍萍, 马润林

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

**摘要:** 在一项研究中发现, 雌激素受体在胚胎发育后期对绵羊子宫平滑肌 *Calponin* (*CaP*) 基因的活动有明显上调作用, 而 *CaP* 一直被作为观察其他基因表达水平变化的基准参照基因 (Reference Gene)。迄今为止, 绵羊 *CaP* 尚未完整克隆, 为进一步了解其结构和功能, 根据人、小鼠和家猪的同源保守区序列设计锚定寡核苷酸引物, 通过 5'-RACE 及 3'-RACE 方法克隆了绵羊子宫平滑肌组织全长 *CaP h1* cDNA (GenBank 登录号: AY327118), 在 cDNA 序列的基础上, 又通过 PCR-SSP 方法获得了 *CaP h1* 基因除内含子 1、2 之外的其余 4 个内含子全部序列 (GenBank 登录号分别为: AY771807, AY771808, AY771809, AY771810)。DNA 序列测定和分析表明, 绵羊子宫平滑肌 *CaP h1* cDNA 全长 1499 bp, 编码 297 个氨基酸, 5'-UTR 及 3'-UTR 分别为 79 bp 和 529 bp。*CaP h1* 基因组 DNA 的克隆和序列分析表明, 绵羊 *CaP* 全长约 8 kb, 由 7 个外显子和 6 个内含子组成。同源序列比较发现, 该基因外显子在不同物种间相对保守; 与人类、野猪、小鼠、大鼠和鸡 *Calponin* mRNA 同源性分别为 88%、92%、81%、79% 和 81%, 但不同物种间内含子存在较大差异 (>50%)。填补了绵羊 *CaP* 基因分子克隆的空白, 为进一步研究该基因的功能及子宫平滑肌收缩的调节机理奠定了基础。

**关键词:** 绵羊; *Calponin*; 分子克隆

中图分类号: Q958 文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)03-0357-06

## Molecular Cloning of Smooth Muscle *Calponin h1* in Sheep

YUE Zuo-Jun, SONG Jun-Fang, HUANG Zhao-Feng, LIU Hai-Bo, ZHU Zhao-Hui,  
ZHANG Xiao-Juan, ZHANG Yi, TAN Ping-Ping, MA Run-Lin

(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** It was found that the level of *Calponin h1* (*CaP h1*) mRNA was significantly up-regulated by Estrogen in the myometrium of sheep towards the end pregnancy. Although the *CaP h1* has been widely used as a reference gene to observe the changes of expression level of other genes, the full-length gene in sheep has not been obtained. With the oligo nucleotide primers according to human, mouse and pig *CaP h1* mRNA, the full-length cDNA of *CaP h1* was cloned by 5'- and 3'-RACE (GenBank accession number = AY327118). The cDNA was 1499 bp in length and contained a complete open reading frame of 891 bp, encoding a protein of 297 amino acid residues. 5'- and 3'-UTR was 79 bp and 529 bp, respectively. With PCR-SSP approaches, the genomic DNA of sheep *CaP h1* was obtained. It showed that the gene has 7 exons and 6 introns, spanning over 8 kb (GenBank accession number of introns: AY771807, AY771808, AY771809, AY771810.) Homologous comparison indicated that the cDNA sequences are highly conserved across the species. The highest homology was found in wild pig (92%), followed by human (88%), rat (81%),

收稿日期: 2004-07-14; 修回日期: 2004-10-09

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目 (编号: 30125024) [Supported by National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (No. 30125024)]

作者简介: 岳作军 (1974—), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向: 动物分子遗传学。Tel: 010-6487345, E-mail: zjyue@genetics.ac.cn

通讯作者: 马润林 (1958—), 男, 甘肃成县人, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 010-64852025, E-mail: rlma@genetics.ac.cn

mouse (81%) and chicken (79%). The intron sequence and length showed a large variation among species (>50%).

**Key words:** sheep; *Calponin*; molecular cloning

*Calponin* (*CaP*) 是一类编码钙调结合蛋白的调节基因, 因其产物既能与钙调蛋白 Calmodulin 结合又可与抗肌钙蛋白 Troponin T 的抗体交叉反应而得名<sup>[1]</sup>。作为平滑肌细丝蛋白 Actin 的重要辅助蛋白, *Calponin* 是平滑肌能量和信号传递系统的重要组成部分。Takahashi 从鸡胃中首先分离得到的 *CaP h1* 是一种碱性蛋白(等电点  $PI = 8 \sim 10$ ), 特异性分布在已分化的平滑肌细胞<sup>[2]</sup>, 与分布于心肌的中性 *CaP h2* ( $PI = 7 \sim 8$ ) 有很高的序列同源性<sup>[3~5]</sup>。另一种为无组织特异性分布的酸性蛋白 *CaP h3* ( $PI = 5 \sim 6$ )。所有 3 种 *CaP* 都是寡肽蛋白, 在其氨基端存在包含第 32~127 个氨基酸残基的同源保守区 (*Calponin* homology domain)。3 种 *CaPs* 由各自的基因所编码, 分别位于不同的染色体上<sup>[3,6]</sup>。

*CaP* 按一定比例与肌动蛋白纤维结合在调节肌肉收缩中发挥重要功能。有研究结果表明, 在给定的肌凝蛋白轻链磷酸化水平下 *CaP* 降低了平滑肌对钙离子的敏感度<sup>[7]</sup>。免疫组化实验发现 *CaP* 与 Actin 及 Myosin 在细胞内基本共存于同一位置, 但诱导肌肉收缩后分布有所改变, 从而推测 *CaP* 引导肌动蛋白丝锚定于细胞膜<sup>[8]</sup>。*CaP* 可能作为信号分子促进 PKC 活性并连接 ERK 和 PKC 的导向目标到细胞膜上<sup>[9]</sup>。多项研究证明, *CaP* 能够与 Desmin, Phospholipids, Intermediate protein, Tubulin, Microtubule protein 等相互作用<sup>[10~13]</sup>, 并发现 *CaP* 具有稳定肌动蛋白骨架的作用<sup>[14]</sup>。Kaneko (2002) 等人亦报道 *CaP h1* 与肿瘤发生、细胞移动和抑制细胞分化相关<sup>[15]</sup>。

*CaP h1* 的 cDNA 全长基因已经在人、小鼠、大鼠、鸡和猪中成功得到克隆, 但在绵羊或其他偶蹄类中尚未见报道。*CaP* 分子在氨基端 2/3 的序列中表现出高度相似性, 但是羧基端差异明显<sup>[16]</sup>。

我们在利用绵羊作为生殖分娩机理模型的研究中发现, 绵羊的雌激素及雌激素受体在胚胎发育后期对编码绵羊子宫平滑肌 *CaP h1* mRNA 的表达水平有明显上调, 而该基因在此前一直作为观察其他基因表达水平变化的基准基因 (Reference Gene)。因此在此研究体系中 *CaP* 不再适合作为参考基因。

为进一步阐明 *CaP h1* 受雌激素调节的机理, 本研究通过同源序列比较, 计算机拼接、RACE 和 PCR-SSP 等方法从绵羊子宫平滑肌中分离得到了绵羊 *CaP h1* 基因的完整 cDNA 序列和大部分基因组序列, 并对其基因组结构和氨基酸序列进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织材料

绵羊子宫平滑肌材料取自我国华北地区绵羊品种小尾寒羊。

### 1.2 总 RNA 和基因组 DNA 的提取

新鲜子宫平滑肌组织于液氮中速冻并粉碎后用于提取总 RNA, 提取 RNA 使用 TRIzol<sup>®</sup> 试剂 (Invitrogen) 并按生产商所推荐的程序进行。为保证 RNA 质量, 在 RNA 沉淀步骤之前增加了一次酸性酚 (Phenol : Chloroform = 1 : 1; pH 4.35) 抽提以除去微量的 DNA 污染。总 RNA 质量在经由含 5% 甲醛的 1% 琼脂糖变性胶电泳检查合格后用于其后的实验操作。

绵羊核 DNA 的分离纯化按照《分子克隆实验指南》第 2 版介绍的相关技术路线进行。

### 1.3 cDNA 基因克隆

绵羊子宫平滑肌 cDNA 第一链文库通过反转录 (RT) 绵羊总 RNA 获得。反应体系包括 2.0  $\mu\text{g}$  RNA 模板, 40 pmol/L 寡核苷酸引物 (5'-ATGGATGCCTA-CAGCGCTC-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 1.0 U Superscript II RNA 反转录酶 (GIBCO BRL), 200  $\mu\text{mol/L}$  dNTP。RT 反应的其他条件遵照反转录酶生产商的推荐。

通过比较人、鼠、猪 *CaP h1* 的同源保守区段, 使用 Primer 2.0 软件设计用于 PCR 放大绵羊 *CaP h1* 序列的寡核苷酸锚定嵌套引物。5'-RACE 和 3'-RACE 分别使用自行设计的嵌套引物与 SMART RACE 克隆试剂盒 (Clontech) 提供的通用引物, 以及与 polyT 引物 5' 端同源的通用引物。所有 RACE 反应遵照生产商推荐的反应条件, 所用全部寡核苷酸引物序列参见表 1 (未标明位置引物均为试剂盒所提供通用引物)。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测回收后连

接到载体 pGEM-T easy(Promega)。

表 1 克隆绵羊子宫平滑肌 *Calponin h1* 所用关键寡核苷酸引物

Table 1 Oligo nucleotide primers used for cloning of sheep uterine smooth muscle *Calponin h1*

	用途 Purpose	方向 Direction	序列 Sequence	位置 Position(bp)
1	特异区 Special region	正(F)	5'-tggcaccagctggagaacat-3'	341
		反(R)	5'-cctgttgctgcccactct-3'	850
2	5'-RACE	通用(U)	5'-aagcagtggtatcaacgcagagtacgcggg-3'	
		长(L)	5'-ctaatacgactcactatagggcaagcagtggtatcaacgcagagt-3'	
		短(S)	5'-ctaatacgactcactatagggc-3'	
		反(R)	5'-tgtggtggttctcgaacaggctc-3'	491
3	3'-RACE	长(L)	5'-ctaatacgactcactatagggcaagcagtggtatcaacgcagagt-3'	
		短(S)	5'-ctaatacgactcactatagggc-3'	
4	cDNA	正(F)	5'-ccaccaccaaccagcatgtcctcc-3'	89
		反(R)	5'-acagc(tc)atttattgctccagtgaa(ag)ta-3'	1 490
5	内含子 1 Intron 1	正(F)	5'-ctccgctcacttcaaccgagg-3';	108
		反(R)	5'-cogtccatgaagtgtgtgccgat-3'	94
6	内含子 3 Intron3	正(F)	5'-ccaccaccaaccagcatgtcctcc-3';	89
		反(R)	5'-ttccgttctgcttctccgctatt-3'	554
7	内含子 4,5,6 Intron 4,5,6	正(F)	5'-ttcatcaaggccatcaccaagtagc-3';	374
		反(R)	5'-acagc(tc)atttattgctccagtgaa(ag)ta-3'	1 490

Note: F-Forward; R-Reverse; U-Universal; L-Long; S-Short.

#### 1.4 *CaP h1* 内含子序列确定

在绵羊 *CaP h1* cDNA 全长序列的基础上,依据其与人、小鼠 *CaP h1* 同源序列比较,初步确定内含子与外显子序列的分界点,然后设计位于外显子或内含子的同源保守寡核苷酸引物与位于外显子的引物配对,使用 PCR-SSP 及 Primer walking 方法逐段放大内含子序列直到获得内含子全长。所使用的引物序列及位置见表 1。对一些较小的内含子,也采用了直接在相邻外显子端部设计引物对然后 PCR 直接放大的方式。

本研究对 *CaP h1* cDNA 及内含子的全部测序工作由上海申能博彩公司和上海博亚公司进行。测序结果使用 SeqEd 软件整理后拼接成全长 cDNA 序列及包含内含子的基因组 DNA 序列。

## 2 结果与讨论

### 2.1 绵羊 *Calponin h1* 的克隆与序列分析

通过 5'-RACE 和 3'-RACE 及 PCR-SSP 方法成

功克隆得到了绵羊子宫平滑肌 *Calponin h1* 包含全部氨基酸编码区域,以及 5'末端和 3'末端 UTR 区域的全长 cDNA 序列。这些克隆工作通过一系列的 PCR-SSP 得到不同长度的 cDNA 片段,又全部经过半巢式(Semi-nested)PCR 进行验证,得到的阳性 TA 克隆最后进行 DNA 序列测定。绵羊子宫平滑肌 *Calponin h1* mRNA 全长 1 499 bp,其中阅读框 891 碱基,编码 297 个预期氨基酸,5'-UTR 及 3'-UTR 分别为 79 bp 和 529 bp。该全长 cDNA 已经存入国际基因数据库中并获得 GenBank 注册号(Accession number:AY327118)。绝大部分内含子亦录入数据库中,内含子 3、4、5、6 的 GenBank 登录号分别为 AY771807,AY771808,AY771809,AY771810。

### 2.2 绵羊 *Calponin h1* 与其他物种 *CaP h1* 的序列比较

比较已知几个物种的 *CaP h1* cDNA 序列,发现绵羊 *CaP h1* 的阅读框及预期氨基酸总数(297AA)与人、大鼠、小鼠和野猪的同源序列一致,但比鸡的



绵羊	Sheep	957	ACTACA	ACTCGCCT	AGGGCC	-CCAGT	CCT-CCT	GCCTT	CCCC	-AGGG	1002
猪	Pig	934	ACTACA	ACTCTGCCT	AGGGTG	-CTGGG	CCT-CCC	ACCTT	CCCC	-AGGG	979
人	Human	942	ACTACA	ATTCCGCCT	AGGGCC	ACAAGG	CCTTCC	CTTTT	CCCCCA	AAGG	991
大鼠	Rat	940	ACTATA	ACTCTGCCT	AGGGGC	-----	-----	-----	CCCC	-AAGG	968
小鼠	Mouse	938	ACTACA	ACTCTGCCT	AGGGGC	-----	-----	-----	CCCC	-AAGG	966
鸡	Chicken	873	ACAATA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	879

\*\* \* \*\*

图 2 不同物种 *Calponin h1* mRNA 3'-UTR 部分区段 DNA 序列变异情况

左侧列为比较物种的通俗名称,数字显示的是 DNA 区段在各自 mRNA 序列中的碱基位置。

Fig.2 Sequence variation of *Calponin h1* in the 3'-UTR region among 6 species

The left shows the names of species; numbers represent the position of the amino acid.

其中绵羊与人类及野猪比较接近,但又各不相同。与另外 3 个物种相比,小鼠及大鼠均比绵羊缺失 17 个碱基,而鸡则缺失更多。经统计分析,绵羊的 *CaP h1* mRNA 序列与野猪同源性最高(92%)其他依次为人类(88%)、大鼠(81%)、鸡(81%)和小鼠(79%)。而相应氨基酸序列与人类、野猪、小鼠和大鼠的同源性都在 98% 以上,惟与鸡的同源性最低,为 83%(表 2)。

表 2 绵羊子宫平滑肌 *Calponin h1* 序列与 GenBank 中已知物种的同源基因的比较结果

Table 2 Level of mRNA and AA sequence homology of *Calponin h1* among 6 different species

	绵羊	猪	人	小鼠	大鼠	鸡
	Sheep	Pig	Human	Mouse	Rat	Chicken
绵羊 Sheep		99	98	98	98	83
猪 Pig	92		98	98	97	83
人 Human	88	89		97	97	83
小鼠 Mouse	81	80	84		98	82
大鼠 Rat	79	80	83	93		82
鸡 Chicken	81	80	80	74	77	

注:右上角为预期氨基酸序列同源比较;左下角为 mRNA 序列同源比较。

Note: figures in the upper-right diagonal represent AA sequence homology; lower-left diagonal shows the mRNA homology.

使用 Clustral W 软件对 6 个 *CaP h1* 同源基因进行聚类分析,所得结果清晰表明绵羊与野猪最近,其次与人类、大鼠和小鼠聚类,而鸡则单独成为一个分支(图 3)。与鸡同源性低的主要原因是鸡的 AA 序列在 3'末端区缺失 5 个氨基酸所致。

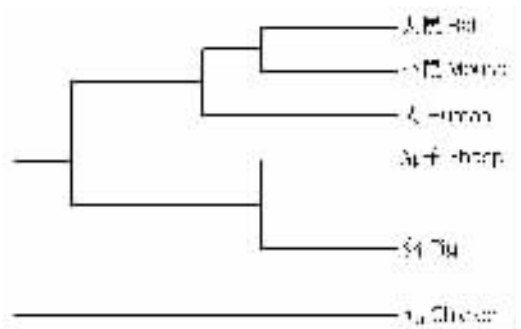


图 3 绵羊子宫平滑肌 *Calponin h1* mRNA 与已知不同物种同源基因聚类情况(Clustral W 软件)

Fig.3 The dendrogram of *Calponin h1* from several species by Clustral W

### 2.3 基因组结构分析

经过 DNA 测序确定的绵羊 *Calponin h1* 核 DNA 序列长度约为 8.0 kb,由 7 个外显子和 6 个内含子组成(图 4)。

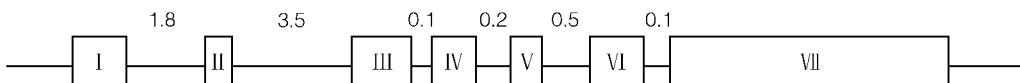


图 4 绵羊 *Calponin h1* 基因结构

罗马数字表示外显子,阿拉伯数字表示内含子大小(kb)。

Fig.4 The genomic structure of sheep *Calponin h1* gene

Rome number represents the position of exon; Arab number represents the length of the intron (kb).

这个结构与目前所发现的其他物种的结构基本一致,变化主要表型在各个内含子的序列长度变化。大鼠基因组序列比人及小鼠的小,约 8 kb,人 11 kb,小鼠 10 kb。主要因为大鼠第 1、2 内含子比人(2.3 kb, 5.5 kb)及小鼠的要小,内含子-外显子的边界与人及小鼠的精确一致。主要是第 5 内含子明显小于人及小鼠的第 5 个内含子。所有内含子-外显子边界拼接子都符合 gt/ag 规则,而且与人及小鼠一致。绵羊 *Calponin h1* 基因在染色体上的定位工作正在进行之中。

## 参考文献(References):

- [1] Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34 000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 141(1): 20~26.
- [2] Takahashi K, Nadal-Ginard B. Molecular cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin. *J Biol Chem*, 1991, 266(20): 13284~13288.
- [3] Strasser P, Gimona M, Moessler H, Herzog M, Small J V. Mammalian calponin. Identification and expression of genetic variants. *FBBS Letters*, 1993, 330(1): 13~18.
- [4] Fukui Y, Masuda H, Takagi M, Takahashi K, Kiyokane K. The presence of h2-calponin in human keratinocyte. *J Dermatol Sci*, 1997, 14: 29~36.
- [5] Danninger C, Gimona M. Live dynamics of GFP-calponin: isoform-specific modulation of the actin cytoskeleton and autoregulation by C-terminal sequences. *J Cell Sci*, 2000, 113: 3725~3736.
- [6] Applegate D, Feng W, Green R S, Taubman M B. Cloning and expression of a novel acidic calponin isoform from rat aortic vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10683~10690.
- [7] Itoh T, Suzuki S, Suzuki A, Nakamura F, Naka M, Tanaka T. Effects of exogenously applied calponin on Ca(2+)-regulated force in skinned smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *Pflügers Arch Eur J Physiol*, 1994, 427: 301~308.
- [8] Parker C A, Takahashi K, Tang J X, Tao T, Morgan K G. Cytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret. *The Journal of Physiology*, 1998, 508(1): 187~198.
- [9] Leinweber B, Tang J X, Stafford W F, Chalovich J M. Calponin interaction with alpha-actinin-actin: Evidence for a structural role for calponin. *Biophys J*, 1999, 77: 3208~3217.
- [10] Bogatcheva N V, Gusev N B. Interaction of smooth muscle calponin with phospholipids. *FEBS Letters*, 1995, 371: 123~126.
- [11] Wang P, Gusev N B. Interaction of smooth muscle calponin and desmin. *FEBS Letters*, 1996, 392: 255~258.
- [12] Fujii T, Koizumi Y. Identification of the binding region of basic calponin on alpha and beta tubulins. *J Biochem (Tokyo)*, 1999, 125: 869~875.
- [13] Fattoum A, Roustan C, Smyczynski C, DerTerrossian E, Kassab R. Mapping the microtubule binding regions of calponin. *Biochemistry*, 2003, 42: 1274~1282.
- [14] Tang D C, Kang H M, Jin J P, Fraser E D, Walsh M P. Structure-function relations of smooth muscle calponin. The critical role of serine 175. *J Biol Chem*, 1996, 271(15): 8605~8611.
- [15] Kaneko M, Takeoka M, Oguchi M, Koganehira Y, Murata H, Ehara T, Tozuka M, Saida T, Taniguchi S. Calponin h1 suppresses tumor growth of src-induced transformed 3Y1 cells in association with a decrease in angiogenesis. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93(8): 935~943.
- [16] Gimona M, Small J V. Calponin. In: *Biochemistry of Smooth Muscle*, edited by Ba'ra'ny M. San Diego, CA: Academic, 1996, 91~104.

## 2005 国际 DNA 和基因组节在大连召开

[本刊讯] 为加强国际间的交流与合作,促进中国基础生命科学及生物技术产业的发展,由美国国际高科合作协会(WHTS)发起,大连市政府主办的首届国际 DNA 和基因组节大型活动于 2005 年 4 月 25~29 日在大连举行。

本次会议共邀请到 5 位诺贝尔奖得主,同时还吸引了来自 25 个国家和地区的 100 多位知名专家学者以及近千名国内专家学者参会。大会共设有主题会议、专题论坛、学术报告、科研成果展示、科技成果产业化报告、学术成果与企业运行相结合等新颖而丰富的活动,内容涉及基因组学、遗传学、免疫学、糖生物学、细胞凋亡、DNA 与干细胞、系统生物学、克隆技术等数十个生命科学前沿领域。其中,专题论坛共举行 33 场,为国内外学者进行科研工作的交流合作构建了很好的平台。

活动周期间,还开展了丰富多彩的青年学术交流展、生物技术领域企业展览、DNA 科普活动、项目合作谈判、项目对接等活动,并取得了一系列成果。

大会不仅得到了大连市政府及大连相关高新技术企业的有利支持,而且还得到了众多媒体的广泛关注。作为本次活动的协办方,《遗传学报》《遗传》编辑部在会议前期的宣传方面给予了大力协助,并且派代表参加了此次大会,不仅了解了学科的最新动态而且宣传刊物扩大了国际影响。