

## 水稻钙调蛋白基因的克隆及结构分析

刘芝华 吴相钰 潘乃穰 陈章良

(北京大学生物系蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

钙调蛋白(Calmodulin)是生物细胞内一种重要的调控蛋白, 通过其与靶酶的相互作用, 控制细胞正常的生长和发育。我们以湖北光敏感核不育水稻cDNA第一条链为模板, 参考大麦钙调蛋白基因序列合成5'端和3'端引物, 利用多聚酶链式反应(PCR)合成了完整的水稻钙调蛋白cDNA, 克隆并测定其序列。结果表明, 光敏核不育水稻的钙调蛋白基因由450个核苷酸组成, 共编码148个氨基酸, 且与迄今为止在植物领域里发表的大麦及苜蓿的钙调蛋白基因有很高的同源性。在核苷酸序列上与大麦有90%的同源性, 与苜蓿有86%的同源性; 其编码的148个氨基酸与大麦和苜蓿的差异分别只有1个。这是国际上第一次克隆水稻的钙调蛋白基因。

**关键词** 湖北光敏感核不育水稻(HPGMR); 钙调蛋白(CaM); 钙调蛋白基因(cam); 多聚酶链式反应(PCR)

钙调蛋白是一种具有较高分子稳定性、耐热、小分子的酸性蛋白质(等电点3.9—4.3), 它在细胞内作为 $\text{Ca}^{2+}$ 的受体蛋白, 调节细胞内许多依赖 $\text{Ca}^{2+}$ 的生理活动<sup>[1]</sup>。钙调蛋白有4个 $\text{Ca}^{2+}$ 结合域( $\text{Ca}^{2+}$ binding domain), 多数钙调蛋白由148个氨基酸构成, 细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高, 使得钙调蛋白的 $\text{Ca}^{2+}$ 结合位点被占据, 因而改变了其构象, 并促进它与细胞内的靶酶的结合, 由此改变细胞内的代谢活动。通过这套系统, $\text{Ca}^{2+}$ 作为第二信使促进真核细胞里对刺激的反应。由于钙调蛋白重要的调控功能, 近几年来愈来愈引起人们的重视<sup>[2-5]</sup>。植物界在最近二年已迅速开展了此项研究, 迄今为止国际上已成功地克隆了大麦<sup>[8]</sup>和苜蓿<sup>[9]</sup>的钙调蛋白基因, 并发现和动物的钙调蛋白基因有很高的同源性。本论文首次成功地克隆了水稻钙调蛋白基因, 测定其序列, 并与大麦和苜蓿作一比较, 提出了钙调蛋白调控的可能模型。

## 材料和方法

### (一)试剂

cDNA合成试剂盒购自Promega公司, DNA序列分析试剂盒购自Pharmacia公司, PCR试剂盒购自华美生物工程公司,  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$ 为Amorsham产品, 限制酶及其它工具酶均购自华美生物工程公司, 其它常规试剂均为国产分析纯试剂。人工合成引物由北京大学生命科学中心ABI DNA合成仪合成。

### (二)方法

1. 水稻RNA的提取: 用异硫氰酸胍法提取。剪碎-70℃保存的水稻叶片, 加液氮研磨成粉状, 加异硫氰酸胍溶液匀浆, 水饱和酚, 氯仿/异戊醇抽提, 上清液用异丙醇沉淀, 再用异硫氰酸胍溶液溶解, 异丙醇沉淀, 溶于无RNase的水中, 65℃,

本文于1992年5月6日收到。  
国家自然科学基金资助项目。

保温10min后,乙醇沉淀,抽干,溶于DEPC处理过的水中,  $-70^{\circ}\text{C}$ 保存。取15 $\mu\text{l}$ 作RNA的甲醛变性电泳检查。

2. cDNA第一条链的合成:参考Promega公司cDNA合成试剂盒上的方法,以水稻RNA为模板, Oligo dT为引物,在逆转录酶的作用下合成cDNA的第一条链,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3. 用PCR方法扩增钙调蛋白基因:参考已发表的大麦<sup>[6]</sup>钙调蛋白基因序列,人工合成两段分别含有26个和24个核苷酸的寡聚核苷酸作为引物,序列分别为:5'端引物,5'--GGCATGGCGGATCCGC TCACCGACGA--3', 3'端引物,5'--TCCCTAGGCCATCATGACCTTGAC--3'。以合成的cDNA第一条链为模板,加Taq DNA Polymerase合成。反应为93 $^{\circ}\text{C}$ 变性30s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 退火1min30s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2min,共30个循环。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4. PCR扩增产物的克隆:PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析后用冻融法回收,并用T4 DNA Polymerase处理使之成为平末端。载体Bluescript经EcoRV酶解,在T4 DNA Ligase作用下与经T4 DNA polymerase处理过的PCR回收产物进行平末端连接,按Maniatis<sup>[8]</sup>的方法制备DH5 $\alpha$ 感受态细胞,将上述连接产物加到200 $\mu\text{l}$ 感受态细胞中,按常规方法进行转化。

5. 重组子的筛选:用选择培养基筛选,挑选白色菌落,经液体培养基培养后,提取质粒,做酶切分析,用BamHI + HindIII双酶切,选择插入片段为0.45kb左右的重组子做序列分析。

6. 克隆片段的DNA序列分析:外源片段克隆在Bluescript载体上,以双脱氧核苷酸链终止法,直接用双链DNA测序。先将超螺旋的质粒DNA在0.2mol/L

NaOH中65 $^{\circ}\text{C}$ 变性15min,再以0.4倍体积5mol/L  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 中和,乙醇沉淀即得到变性的单链DNA分子。变性的DNA分别与T7 primer和SK primer一起退火,然后按Chen的方法<sup>[9]</sup>测定DNA序列。

## 结果与讨论

### (一)钙调蛋白基因的PCR合成

以光敏感核不育水稻cDNA的第一条链为模板,人工合成两段寡聚核苷酸为引物,用PCR方法合成了钙调蛋白基因。电泳结果表明PCR产物长约0.45kb,并且具有很高的特异性(图1-A)。

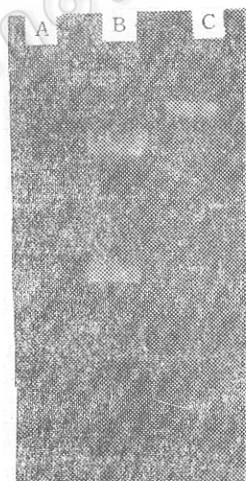


图1 PCR产物和pLC24的凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR product and pLC24  
A. PCR product; B. pLC24/BamHI + HindIII; C. DNA/HindIII marker

### (二)PCR产物的克隆和筛选

PCR产物(0.45kb条带)经冻融法回收后克隆至Bluescript载体上,用BamHI + HindIII双酶切,筛选插入片段在0.45kb的质粒(图1-B),命名为pLC24。

1.	GGC ATG GCG GAT CCG CTC ACC GAC GAG CAG ATC GCC GAG TTC AAG
2.	5' primer E Q I A E F K
3.	C +++ +++ +++ +++ +++ +++
4.	+ +++ +++ T+T +++ +T +++

1.	GAG GCG TTC AGC CTC TTC GAC AAG GAC GGC GAC GGT TGC ATC ACT
2.	E A F S L F D K D G D G C I T
3.	+++ ++C +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++A ++T +++ ++T +++ ++C
4.	++A ++T +++ +++ ++A +++ ++T +++ ++T +++ ++T +++ ++T ++T +++

1.	ACT AAG GAG CTT GGA ACT GTG ATG CGG TCC CTT GGT CAG AAC CCA
2.	T K E L G T V M R S L G Q N P
3.	++C +++ +++ ++G +++ ++A ++C +++ ++C ++G ++G ++G +++ +++ +++
4.	++C +++ +++ ++C ++G +++ +++ +++ A++ ++G ++A ++C +++ +++ +++

1.	ACT GAG GCT GAG CTC CAG GAC ATG ATC AAC GAG GTT CAT GCT GAT
2.	T E A E L Q D M I N E V D A D
3.	++G +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++T ++A ++C ++C +++ +++
4.	+++ +++ +++ ++A T+G +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++

1.	GGC AAT GGG ACC ATT GAC TTC CCA GAG TTC CTG AAC CTG ATG GCC
2.	G N G T I D F P E F L N L M A
3.	+++ ++C ++C +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++C +++ +++ +++ +++
4.	++A ++C ++T +++ +++ ++T +++ ++T ++A +++ ++T +++ +++ +++ +++

1.	CGC AAG ATG AAG GAT ACT GAC TCT GAG GAG GAG CTC AAG GAG GCC
2.	R K M K D T D S E E E L K E A
3.	+++ +++ +++ +++ ++C +++ +++ ++A +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++
4.	+++ +++ +++ +++ +++ +++ ++T ++T +++ ++A +++ +++ +++ ++A ++T

1.	TTC CGT GTG TTT GAC AAG GAC CAA AAC GGT TTC ATC TCA GCT GCT
2.	F R V F D K D Q N G F I S A A
3.	+++ A+G +++ ++C +++ +++ +++ +++ +++ ++C +++ +++ ++T +++ +++
4.	+++ +++ +++ +++ +++ +++ ++T +++ ++T +++ +++ +++ ++T ++A +++

1.	GAG CTC CGC CAC GTG ATG ACC AAC CTT GGT GAG AAG CTG ACC GAC
2.	E L R H V M T N L G E K L T D
3.	+++ +++ +++ +++ ++C +++ ++G ++T ++C ++C +++ +++ ++C +++ +++
4.	+++ +++ ++T ++T ++C +++ ++A ++T ++C ++A +++ +++ +++ ++T ++T

1.	GAG GAA GTC GAC GAG ATG ATC CGT GAG GCT GAC GTC GAT GGC GAT
2.	E E V D E M I R E A D V D G D
3.	+++ ++G ++G +++ +++ +++ +++ +++ ++A +++ +++ ++T ++C ++T +++
4.	++A +++ ++T +++ +++ +++ ++T ++C +++ +++ ++T ++T +++ ++T +++

1.	GGC CAG ATC AAC TAC GAG GAG TTC GTC AAG GTC ATG ATG GCC TAG GGA
2.	G Q I N Y E E F 3' primer
3.	+++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++
4.	++G +++ +++ +++ ++T +++ +++ ++T

图 2 水稻钙调蛋白基因全序列及其编码的氨基酸与大麦和苜蓿相应序列的比较

Fig. 2 Nucleotide sequence and derived amino acid sequence of rice

CaM and the comparison with that of barley and alfalfa

1. Nucleotide sequence of rice cam, 2. Amino acid sequence of rice CaM, 3. Nucleotide sequence of barley cam, 4. Nucleotide sequence of alfalfa cam. ("+" indicates the identical sequence)

### (三) 水稻钙调蛋白基因的序列分析以及与大麦、苜蓿相应序列的同源性比较

pLC24质粒做序列分析得知, 插入片段确为钙调蛋白基因。光敏核不育水稻的钙调蛋白cDNA由450个核苷酸组成, 编码148个氨基酸。大麦和苜蓿的钙调蛋白基因也由450个核苷酸组成, 三者之间有很高的同源性(图2, primer部分不做比较)。分析结果表明: 光敏核不育水稻钙调蛋白基因的核苷酸序列与大麦的同源率为90%, 与苜蓿的同源率为86%, 其编码的148个氨基酸与大麦和苜蓿的差异分别只有1个, 其中第7个氨基酸在水稻中为谷氨酸, 在大麦中为天冬氨酸; 第10个氨基酸在水稻中为丙氨酸, 在苜蓿中为丝氨酸。

### (四) 钙调蛋白结构和功能的保守性

钙调蛋白是一个在生命活动中非常重要的必需蛋白质, 其突变体是致死的, 因此它在结构和功能上也是非常保守的。钙调蛋白分子有4个  $\text{Ca}^{2+}$  结合域( $\text{Ca}^{2+}$  binding domain), 每个含1个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点。其中, 第I结构域在8—40氨基酸之间, 第II结构域在44—76氨基酸之间, 第III结构域在81—113氨基酸之间, 第IV结构域在117—148氨基酸之间<sup>[2]</sup>。这4个结构域中I/III、II/IV间亦有很高的同源率。光敏核不育水稻中同源性如图3。Kretsinger认为: 这是由于进化过程中基因发生复制, 由一个共同的祖先基因进化而来<sup>[10]</sup>。我们的结果亦支持这种观点。Yagi认为: C结构域(III、IV)参与和靶蛋白的结合, 而N结构域(I、II)对  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化起反应, 只有完整的钙调蛋白分子, 才能表达生理功能<sup>[11]</sup>。

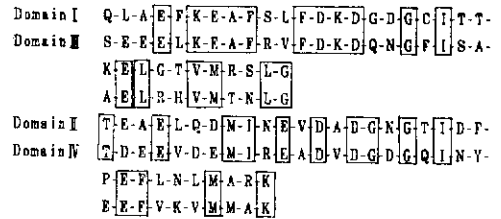


图3 钙调蛋白4个结构域之间的同源性

Fig.3 The homology between the 4 domains of CaM  
(The sequences in the frame represent identical ones)

钙调蛋白分子结构的相似性, 不仅体现在亲缘关系较近的种之间, 甚至在高度分化的高等植物和高等动物之间亦有很高的同源性。我们比较了水稻与脊椎动物钙调蛋白的核苷酸序列, 同源率都高达70%以上, 尤其是第II个  $\text{Ca}^{2+}$  亚结构域(第57—68氨基酸), 水稻和鸡之间的同源率竟高达92%, 充分体现了其在进化过程中的高度保守性和重要性。

### (五) 钙调蛋白调控的可能模型

已有报道指出, 钙调蛋白对光、重力和激素较敏感, 以上刺激分别通过不同的途径增加了细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度,  $\text{Ca}^{2+}$  与钙调蛋白结合使之被激活, 从而促进其与靶酶的结合, 靶酶则进一步改变细胞内的代谢活动。目前已发现的植物里的靶酶有三种: NAD Kinase, microsomal ATPase和一种特定的Protein Kinase。靶酶使一种特定蛋白磷酸化, 激活了一系列的生理反应。我们下一步拟研究不同刺激条件下, 钙调蛋白及靶酶的变化情况, 以期对其调控机制有进一步的认识。

### 参 考 文 献

[1] 孙大业, 植物生理学通讯, 6:13—19, 1984.

- [2] Watterson, D. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 255:962—975, 1980.  
[3] Floyd, E. E. et al.: *Dev. Biol.*, 113:501—511, 1986.  
[4] Davis, T. N. et al.: *Cell*, 47:423—431, 1986.  
[5] Schudi, C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82:998—4002, 1985.  
[6] Ling, V. et al.: *Plant Physiology*, 90:714—719, 1989.  
[7] Barnett, M. J. et al.: *Nucleic Acids Research*, 18:3395, 1990.  
[8] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.  
[9] Chen, E. Y. et al.: *DNA*, 4:165—170, 1985.  
[10] Kretsinger, R. H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 405:40—52, 1975.  
[11] Roberts, D. M. et al.: *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 4:311—332, 1986.

## Cloning and Structural Analysis of Calmodulin Gene From Rice

Liu Zhihua Wu Xiangyu Pan Naisui Chen Zhangliang

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic  
Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Calmodulin is a calcium binding protein that modulate the activity of a diverse group of proteins including some protein kinases, adenylate cyclases and ATPase. Here we report the cloning and sequencing of the full-length cDNA encoding calmodulin mRNA from rice (*Oryza sativa*). The first strand cDNA was synthesized using rice leaf mRNA in the presence of 26 and 24 nucleotides as primers according to barley cam sequence. The calmodulin gene was amplified through PCR before it is actually cloned. We found that calmodulin gene consists of 450 bp and the protein as predicted from DNA sequence, consists of 148 amino acids and differs from that of barley and alfalfa in only 1 position separately. The nucleotide homology between rice and barley is 90%, between rice and alfalfa is 88%. Calmodulin is a very conservative regulator protein.

**Key words** Hubei Photoperiod-sensitive Genic Male Sterile Rice (HPGMR), calmodulin (CaM); calmodulin gene (cam); polymerase chain reaction (PCR)