

# 正义和反义 Calpastatin cDNA 真核表达载体的构建\*

杜 敏 南庆贤

(中国农业大学食品学院, 北京 100094)

朱美君 张曼夫

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

**摘 要** 本研究利用真核表达载体 pRC/RSV, 将位于 pBS-SK 质粒中的 Calpastatin cDNA 以正反两个方向构入载体; 经酶切分析, 构建的质粒结构正确。所构建质粒 pRC/RSV 正义、反义 Calpastatin cDNA 两个表达载体, 为进一步转化肌细胞, 人为控制 Calpastatin 基因的表达, 从而控制 Calpain 活性, 深入研究钙蛋白酶在肌肉发育及肉嫩化中的作用打下基础。

**关键词** 钙蛋白酶, 钙蛋白酶抑制蛋白, 真核表达载体

提高家畜瘦肉率和产出是畜牧业的一个重要研究课题, 有非常重要的经济意义。目前研究表明钙蛋白酶(Calpain)系统在成肌细胞的分化和肌肉发育中起着关键的调控作用, 很可能可以通过对钙蛋白酶活性的调节而促进肌肉发育。同时对钙蛋白酶系统在肌肉发育中作用的理论研究有利于阐明肌肉发育机制, 这样就可以有针对性的采取措施以促进肌肉发育, 提高瘦肉率和产出。

钙蛋白酶系统主要由钙蛋白酶(Calpain, EC 3.4.22.17)及其抑制蛋白(Calpastatin)组成<sup>[1]</sup>。目前研究表明该系统是细胞质中主要的蛋白水解酶系统, 参与细胞内的一系列生化变化<sup>[1]</sup>。在活体肌肉组织中, 钙蛋白酶是导致肌纤维降解的关键因素<sup>[2]</sup>。据推测钙蛋白酶导致的肌肉降解过程可以分为两步: 首先钙蛋白酶攻击肌原纤维的肌节部位, 使肌原纤维降解为小片段。然后, 这些小片段被溶酶体所捕获而进一步降解<sup>[3]</sup>。这样通过抑制 Calpain 活性很可能可以抑制肌原纤维的降解而促进肌肉发育。Calpastatin 是钙蛋白酶的内源抑制蛋白, 是活体中钙蛋白酶活性的天然调节者。目前, 尽管许多的实验间接表明钙蛋白酶及其抑制蛋白与肌肉发育很可能存在密切关系<sup>[3-5]</sup>, 但这些实验大多采用小分子膜通透抑制剂来抑制钙蛋白酶活性, 缺乏专一性, 只能得出间接证据。构建正义反义 Calpastatin cDNA 二个表达载体<sup>[6]</sup>, 转化肌细胞, 就可以人为控制 Calpastatin 基因的表达, 调节 Calpain 活性进而研究 Calpain 系统与肌肉发育的关系, 为最终通过基因操作或其他手段获得高产瘦肉型的品种打下基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 各种限制性内切酶均为 Promega 产品; 琼脂糖和低熔点琼脂糖为 Gibco 公司的产

\* 国家自然科学基金(编号 39670548)及 International Foundation for Science(瑞典)资助项目。

\*\* 收稿日期 1998-09-15。

品; Calpastatin cDNA 位于 pBS-SK 质粒中, 由日本东京大学 Emori<sup>[7]</sup> 博士惠赠; 真核表达载体 pRC/RSV 购自美国 Invitrogen 公司, 质粒的结构见图 1 和图 2。

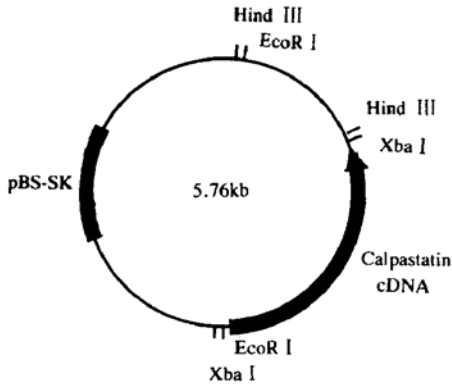


图 1 pBS-Calpastatin 的酶切结构图

Fig. 1 The endonuclease cleavage sites of pBS-Calpastatin

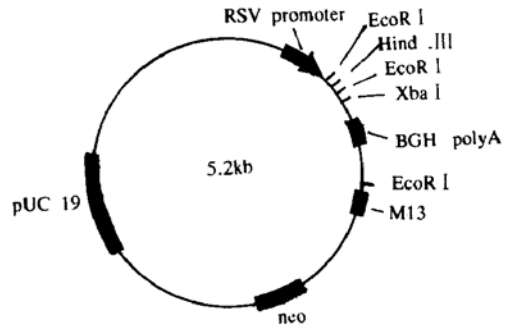


图 2 pRC/RSV 的酶切结构图

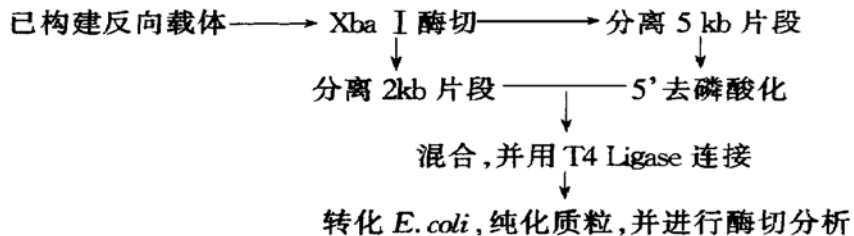
Fig. 2 The endonuclease cleavage sites of pRC/RSV

1.2 方法 pRC/RSV 正、反义 Calpastatin cDNA 真核表达载体构建的反应条件参照 Sambrook 等<sup>[7]</sup>。

1.2.1 pRC/RSV 反义 Calpastatin cDNA 表达载体(pAS) 构建:



1.2.2 pRC/RSV-Calpastatin cDNA 正向表达载体(pSC)构建:



## 2 结果与分析

从图 1 可见, 位于 pBS 质粒中的 Calpastatin cDNA 可以用 EcoR I 和 Hind III 切出。从图 2 可见, 虽然在 pRC/RSV 的 RSV 启动子之后也有 EcoR I 位点, 但由于 EcoR I 非该质粒的单一酶切位点, 因此我们选用 pRC/RSV 上的 Xba I 位点, 通过平端连接与所切出 Calpastatin cDNA 的 EcoR I 粘端相连, 以反方向将 Calpastatin cDNA 构入 pRC/RSV 质粒中, 对获得重组质粒进行限制性内切酶酶切分析, 酶切结果见图 3。图 3 表明, pAS 经 Hind III 酶切, 获得一个 7kb 片段; 经 Xba I 酶切, 获得 2kb 和 5kb 两个片段; 未经酶切质粒呈清晰的两条带, 分别为线状和超螺旋质粒。酶切结果和预计结果相同。所构建质粒命名为 pAS, 其结构如图 5 所示。

由于 pAS 中 Calpastatin cDNA 两侧有两个 Xba I 位点, 分别来自构入的 Calpastatin cDNA 片段和重组再生, 于是, 我们就可以通过用 Xba I 切出 Calpastatin cDNA, 再重新以两个方向随机构入 pRC/RSV, 通过限制性内切酶酶切筛选 Calpastatin cDNA 正向插入的 pRC/RSV 表达载体。图 6 为酶切鉴定结果, pAS 经 EcoR I 酶切, 获得 1kb, 2kb 和 4kb 3 个片段, 而 pSC 经 EcoR I 产生 3kb 和 4kb 两个片段, 说明 Calpastatin cDNA 在这两质粒中的插入方向不同。pSC 经 Xba I 酶切, 可切出 2kb 的插入 Calpastatin cDNA, Hind III 酶切后生成一条 7kb 的片段, 酶切结果证明所构建 pSC 结构是正确的。所筛选质粒命名为 pSC, 其结构见图 6。

本实验所构建的 pRC/RSV 正义、反义 Calpastatin cDNA 真核表达载体可以转化肌细胞, 在细胞内表达就可抑制和增强 Calpastatin 的表达, 从而调节 Calpain 的活性, 为研究 Calpain 系统在肌肉发育中的作用, 进一步提高瘦肉率和产出打下基础。

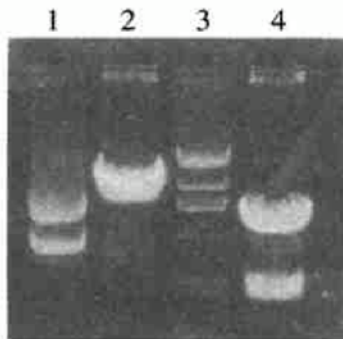


图 3 pAS 经酶切的琼脂糖凝胶(0.7%)电泳图

Fig. 3 The electrophotography of pAS cleaved by restriction endonuclease (0.7% agarose)

1. EcoRI; 2. Hind III; 3. λDNA/Hind III Marker: each lane (Kb), 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0; 4. XbaI

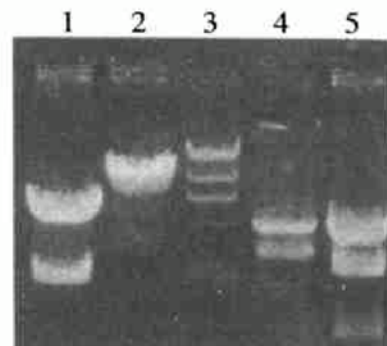


图 4 pSC 经酶切的琼脂糖凝胶(0.7%)电泳图

Fig. 4 The electrophotography of pSC cleaved by restriction endonuclease (0.7% agarose)

1. XbaI; 2. Hind III; 3. λDNA/Hind III Marker: each lane (Kb), 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0; 4. pAS plasmid is cut by EcoRI; 5. pSC plasmid is cut by EcoRI

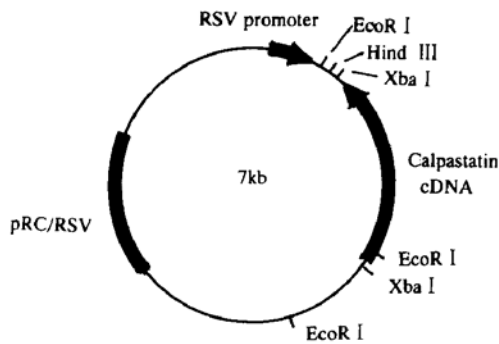


图 5 pAS 的酶切结构图

Fig. 5 The endonuclease cleavage sites of pAS

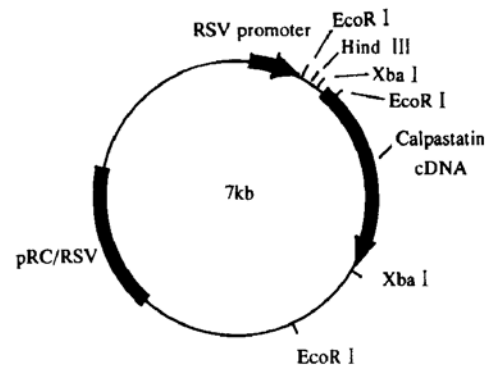


图 6 pSC 的酶切结构图

Fig. 6 The endonuclease cleavage sites of pSC

### 参 考 文 献

- 1 Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*, 1997, 328: 721~732
- 2 Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, et al. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimic*, 1992, 74: 225~237
- 3 Taylor RG, Goll DE. Enzyme localization during postmortem muscle tenderization. *Expression of Tissue Proteinases and Regulation of Protein Degradation as Related to Meat Quality*. Edited by Quali A, et al. 1996
- 4 Kumamoto T, Ueyama H, Sugihara R, et al. Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathes. *Eur Neurol*, 1997, 37: 176~180
- 5 Showalter CJ, Engel AG. Acute quadriplegic myopathy: Analysis of myosin isoform and evidence for calpain-mediated proteolysis. *Muscle Nerve*, 1997, 20: 316~322
- 6 Redekop GJ, Naus CCG. Transfection with bFGF sense and anti-sense cDNA resulting in modification of malignant glioma growth. *J Neurosurg*, 1995, 82: 83~87
- 7 Ishida S, Emori Y, Suzuki K. Rat calpastatin has diverged primary sequence from other mammalian calpastatins but retains functionally important sequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1088: 436~438
- 8 Sambrook J, Fritsh EF. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989

**THE CONSTRUCTION OF pRC/RSV SENSE AND ANTISENSE  
CALPASTATIN cDNA EXPRESSION VECTORS**

Du Min, Nan Qingxian

( *College of Food Science, China Agricultural University, Beijing, 100094* )

Zhu Meijun, Zhang Manfu

( *College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing, 100094* )

**Abstract**

Calpain system has been suggested to play a key role in myoblast fusion and muscle growth. Possibly, we can enhance the growth of muscle through controlling the activity of calpains. Calpastatin is the endogenous inhibitor of calpains which regulate calpain activity *in vivo*. This research employs eukaryotic expression vector pRC/RSV and Calpastatin cDNA in pBS-SK to construct two expression vectors in which calpastatin cDNA are inserted in sense and antisense direction respectively. Endonuclease restriction analysis proved that the two plasmids were correctly constructed. Those plasmids will be useful in regulating the activities of calpains by controlling the expression of calpastatin gene, and facilitate researches in the role of calpain system in muscle growth and meat tenderization.

**Key words** Calpain, Calpastatin, Eukaryotic expression vector