

家鸽 *Caveolin-1* 基因全长 cDNA 的克隆、序列和组织表达分析张 营^{1,2}, 郁建锋², 杨 丽², 王星果^{1,2}, 顾志良^{2,*}

(1. 苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123; 2. 常熟理工学院 生物科学与工程系, 江苏 常熟 215500)

摘要: 窖蛋白(Caveolin)是一类构成细胞膜上胞膜窖主要结构的标志蛋白, 由 *Caveolin* 基因家族编码而成。*Caveolin-1*基因是 *Caveolin* 基因家族的成员之一。该实验采用 RT-PCR 与 RACE(rapid amplification of cDNA ends)技术成功地克隆了家鸽 *Caveolin-1*基因的全长 cDNA。该 cDNA 全长2 605 bp, 包含537 bp 的完整编码区, 编码178个氨基酸; 分析发现家鸽 *Caveolin-1*基因编码区与牛、家犬、鸡、褐家鼠等核苷酸同源性为80.1%~93.4%, 氨基酸同源性高达85.4%~97.2%; 半定量 RT-PCR 分析表明该基因在家鸽各种组织广泛表达, 脂肪中表达量最高, 各种肌肉中表达量次之, 肝脏中表达量最低。此结果说明家鸽 *Caveolin-1*基因可能与脂肪、肌肉中的某些代谢途径有关。

关键词: 家鸽; 窖蛋白基因; RACE; 组织表达分析

中图分类号: Q959.725; Q78; Q951.3; Q341 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)05-0476-07

Cloning and characterization of *Caveolin-1* gene in pigeon,
*Columba livia domestica*ZHANG Ying^{1,2}, YU Jian-Feng², YANG Li², WANG Xing-Guo^{1,2}, GU Zhi-Liang^{2,*}

(1. College of Preclinical Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou Jiangsu 215123, China;

2. Department of Life Science and Technology, Changshu Institute of Technology, Changshu Jiangsu 215500, China)

Abstract: Caveolins, a class of principal proteins forming the structure of caveolae in plasmalemma, were encoded by caveolins gene family. *Caveolin-1* gene is a member of caveolins gene family. In the present study, a full-length of 2605 bp *caveolin-1* cDNA sequence in *Columba livia domestica*, which included a 537 bp complete ORF encoding a 178 amino acids long putative peptide, were obtained by using RT-PCR and RACE technique. The *Columba livia domestica caveolin-1* CDS shared 80.1% – 93.4% homology with *Bos taurus*, *Canis lupus familiaris*, *Gallus gallus* and *Rattus norvegicus*. Meanwhile, the putative amino acid sequence of *Columba livia domestica caveolin-1* shared 85.4% – 97.2% homology with the above species. The semi-quantity RT-PCR revealed that *Caveolin-1* expressions were detectable in all the *Columba livia domestica* tissues and the expressional level of *caveolin-1* gene was high in adipose, medium in various muscles, low in liver. These results demonstrated that *Caveolin-1* gene was potentially involved in some metabolic pathways in adipose and muscle.

Key words: *Columba livia domestica*; Caveolin gene; Rapid amplification of cDNA ends; Tissue expressional pattern

胞膜窖(Caveolae)是细胞膜上直径为50~100 nm的一种凹陷结构, 形状如烧瓶或希腊字母Ω (Yamada, 1955), 广泛存在于各种类型的细胞中。胞膜窖内富含胆固醇、鞘脂和各种蛋白质(Sonnino et al, 2009), 其中窖蛋白 (Caveolin)是一类构成胞

膜窖主要结构的标志蛋白, 相对分子质量在 $(2.1 \sim 2.4) \times 10^4$, 是由*Caveolin*基因家族编码的。*Caveolin*基因家族包括*Caveolin-1*、2、3三个成员(Zhu et al, 2006), 分别编码了4种窖蛋白: *Caveolin-1*(α , β 两种亚型)、2和3。据报道, *Caveolin-1*和2一般形成稳定

收稿日期: 2010-02-08; 接受日期: 2010-09-09

基金项目: 江苏省“六大人才高峰” 第六批高层次人才项目; 江苏省自然科学基金(BK2005026)

*通讯作者(Corresponding author), 博士, 教授; E-mail: Zhiliangu88@hotmail.com

第一作者简介: 张营(1984 —), 男, 山东淄博人, 硕士研究生, 主要从事动物分子遗传学研究; E-mail: yingzhang0928@yahoo.cn

的异源寡聚体复合物(Fanzani et al, 2007), 并广泛存在于多种类型的细胞中, 如内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和脂肪细胞等(Scherer et al, 1997); *Caveolin-3*只存在于各种肌细胞中。

人类 *Caveolin-1*基因位于7号染色体 q31.1, 由三个外显子组成(Engelman et al, 1998)。 *Caveolin-1*在进化上高度保守, 人与欧洲牛, 以及家犬和小家鼠的 *Caveolin-1*的同源性分别是85%、92%和84%。 *Caveolin-1*基因的高度保守性也揭示了 *Caveolin-1*基因对细胞功能的重要性。随着现代分子生物学研究的进展, 发现窖蛋白与许多细胞功能有重要联系。Smythe et al (2003)研究证实, *Caveolin-1*参与了多种信号转导的过程。胞膜窖是细胞信号转导中心, 与信号转导有关的受体, 激酶在此处富集, 包括酪氨酸激酶类受体、类固醇激素受体、丝/苏氨酸激酶类膜受体、激蛋白偶联受体和一氧化氮合成酶(NOS)等(Cohen et al, 2003; Jasmin et al, 2007)。胆固醇是动物细胞内的一种重要物质, 它不仅参与形成细胞膜, 而且是合成胆汁酸、维生素 D 以及甾体激素的原料(Parton et al, 2006)。因此, 保持细胞内外游离胆固醇的平衡对维持正常的细胞功能是非常重要的。 *Caveolin-1*可以作为一种胆固醇结合分子, 将其从胞质转运到胞外, 形成胞外载体, 如高密度脂蛋白。游离胆固醇移出率与胞膜窖上的游离胆固醇含量和 *Caveolin-1* mRNA 水平成正比, 随着细胞内游离胆固醇增加, *Caveolin-1*表达也增加, 反过来, *Caveolin-1*表达增加又促进胆固醇被转运出去(Hailstones et al, 1998)。 *Caveolin-1*可能参与调节了脂肪的动态平衡(Pol et al, 2001; Pol et al, 2004; Wang et al, 2008)。Wang et al (2008)研究发现 *Caveolin-1*mRNA 在蓝塘猪背膘及背最长肌中的表达量极显著, 显著地高于与大白猪, 结果表明 *Caveolin-1* 基因可能是一个胴体性状的候选基因。

在鸟类中, 目前只有鸡的 *Caveolin-1*基因被克隆, 而家鸽的 *Caveolin-1*基因还没有被克隆的报道。本实验根据 GenBank 中已报道的鸡(NM_001105664)和人(NM_001753)的 *Caveolin-1*序列设计引物, 采用 RT-PCR 与 RACE 技术成功地克隆出家鸽(肉鸽)*Caveolin-1*基因的全长 cDNA 并测序, 分析基因在不同物种中的进化关系, 并对家鸽 *Caveolin-1*基因组织表达特异性进行了分析, 为今后进一步研究鸟类 *Caveolin-1*基因的功能提供基础。同时, 也为在特种经济动物肉鸽有关肉质等的育种中选育提

供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及总 RNA 提取

采集家鸽(肉鸽)的胸肌、肝脏、肺、心肌、肌胃、腿肌、脑、小肠、肾、脂肪等10种组织, 液氮速冻后于-80℃冰箱中保存。采用 Trizol(Invitrogen, USA)分别提取上述组织的总 RNA, 保存于-80℃冰箱备用。

1.2 引物的设计和合成

根据 GenBank 登录的鸡(NM_001105664)、人(NM_001753)等的 *Caveolin-1* 基因序列设计引物 chicav1f1/chicav1r1 用于扩增 *Caveolin-1* cDNA 部分序列; 根据获得的部分家鸽 *Caveolin-1* 基因的序列设计用于 3'-RACE 和 5'-RACE 的特异性引物: pgcav1f2/pgcav1r2; 根据鸽的 *GAPDH* 基因序列(GenBank 登录号: AF036934), 设计引物 chigapf1/chigapr1, 扩增家鸽 *GAPDH* 基因; 根据获得的家鸽 *Caveolin-1* 全长序列设计半定量特异引物 chicav1r2。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 3'race outer primer/3'race inner primer 和 5'race outer primer/5'race inner primer 分别来自于 TAKARA 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 和 5'-Full RACE Kit 试剂盒(表 1)。

1.3 RT-PCR 和 5'-RACE、3'-RACE

RT-PCR按TaKaRa反转录试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0.)要求进行。以合成的cDNA为模板, 用引物chicav1f1/chicav1r1 进行扩增, 反应体系为 10×PCR buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 2 μL, 10 μmol/L引物chicav1f1/r1 各 1 μL, rTaq(5 U/μL)1 μL, 1 μLcDNA, dd H₂O 17.3 μL。PCR程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min共 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 并回收克隆后测序。

5'-RACE 按 TAKARA 5'-Full RACE 试剂盒使用说明进行(Lu et al, 2010)。将制备好的 cDNA 用 5'race outer primer/chicav1r1 进行第一轮扩增, 再以 5'race inner primer/ pgcav1r2 引物对第一轮 PCR 产物进行巢式 PCR 扩增。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 并回收克隆后测序。

3'-RACE 按 TAKARA 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒程序进行(Lu et al, 2010)。用引物 3'race outer primer/chicav1f1 对制备好的 cDNA 进行

表 1 克隆实验所用引物序列
Tab. 1 Primers using for gene cloning

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primers(5'→3')
chicav1f1	ACAGGGCAACATCTACAAGC
chicav1r1	TGCACTGGATCTCAATCAGG
pgcav1f2	GCTACCTGATTGAGATCCAG
pgcav1r2	TCTGGCTCAGCAATCACATC
chigapf1	TCATCTGAAGGGTGGTGCTA
chigapr1	GCATGGACAGTGGTCATAAG
chicav1r2	CTCGGATGCTGCTGAACACT
3'race outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3'race inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCATATAGG
5'race outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5'race inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG

第一轮扩增，再以 3'race inner primer/pgcav1f2 引物对第一轮的 PCR 产物进行巢式 PCR 扩增。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳，并回收克隆后测序。

1.4 不同组织 mRNA 表达的 RT-PCR 检测

RT-PCR 方法检测不同组织 mRNA 的表达分布方法如下：反转录按 TaKaRa 反转录试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0.)要求进行(同上述 1.3 段)。RT-PCR 时，扩增家鸽 *Caveolin-1* 和持家基因 *GAPDH* 的引物分别是 chicav1f1/ r2、chigapf1/r1，两个基因的上下游引物分别位于不同的外显子上，并克隆测序验证了这两对引物扩增片段序列。PCR 反应体系和条件同上。

1.5 统计分析软件

将获得的序列在 DNAMAN5.0 软件上进行分析，并与 GenBank 上获取的其他物种序列进行同源性比较。利用 MEGA 4.0 软件中的 Kimura 2-parameter 法计算净遗传距离矩阵。以距离矩阵邻接法(Neighbor- Joining, NJ)建系统发生树，通过自引导检验(bootstrap)获得系统分支的置信度(重复次数为 1 000)。运用 DNAMAN5.0 软件预测氨基酸序列，采用 ExPASy Proteomics Server(http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)和 TMpred 分析蛋白的相对分子质量、等电点和跨膜结构。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增

以家鸽胸肌总 RNA 为模板，经逆转录后得到

cDNA，用引物 chicav1f1/ r1 进行 PCR 扩增，PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳检测(图 1)。电泳检测结果显示，得到 370 bp 左右的 PCR 扩增产物。与设计的目的片段长度相符，将该片段回收后克隆到 pMD-18T 载体中，经测序后获得了该片段的核苷酸序列，经与其他物种的 *Caveolin-1* 基因比对，确认该序列为家鸽 *Caveolin-1* 基因的编码区部分序列。

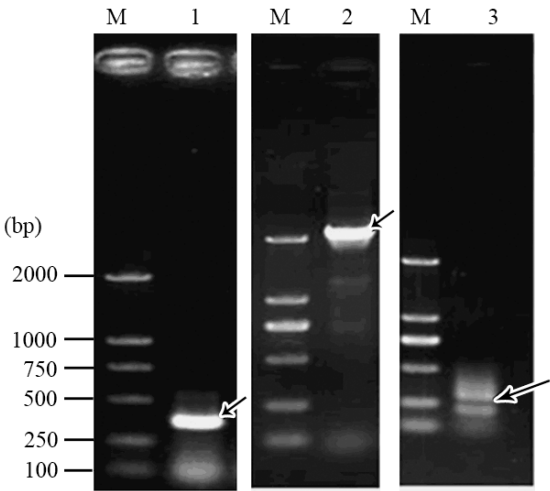


图 1 RT-PCR 及 3'-RACE、5'-RACE 扩增的家鸽 *Caveolin-1* 基因 cDNA

Fig. 1 The amplification products of *Columba livia domestica Caveolin-1* cDNA by RT-PCR, 3'-RACE and 5'-RACE methods

M: DL-2 000 相对分子质量标准；1：引物 chicav1f1/r1 的 RT-PCR 扩增产物；2：3'-RACE 产物；3：5'-RACE 扩增产物。
M: DL-2,000 DNA Marker; Lane 1: RT-PCR products; Lane 2: 3'-RACE products; Lane 3: 5'-RACE products.

2.2 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增

以家鸽胸肌总 RNA 为模板, 经过 5'-RACE 和 3'-RACE 的各两轮 PCR, 分别得到了 259 bp 和 2.1 kb 长度的条带, 与试验预期的结果较接近(图 1)。通过对上述两个片段回收后克隆到 pMD-18T 载体中, 经测序后获得了该片段的核苷酸序列, 经与 *Caveolin-1* 基因比对, 确认这两条序列分别为家鸽 *Caveolin-1* 基因的 5'和 3'端序列。

2.3 序列与分子进化分析

上述 3 个扩增片段经克隆后测序, 拼接获得 2 605 bp 全长的鸽 *Caveolin-1*cDNA 序列, 并递交 GenBank(登录号: GU370065)。此序列包含了 537 个核苷酸的开放性阅读框, 其起始密码子是 ATG, 终止密码子是 TGA, 翻译编码 178 个氨基酸(图 2), 其 5'-UTR 区为 52 bp; 3'-UTR 区为 2 016 bp, 包含一个 AATAA 加尾信号。

用 DNAMAN5.0 软件进行同源性比较分析, 家

鸽 *Caveolin-1* 基因编码区序列与鸡(NM_001105664)的同源性为 93.4%; 与人(NM_001753)、褐家鼠(BC161826)、家犬(NM_001003296)等物种的同源性在 81.0%左右。进一步进行氨基酸序列比较可知, 家鸽与鸡的 *Caveolin-1* 氨基酸同源性高达 97.2%; 与人、大鼠、狗等哺乳物种的同源性在 87.0%左右(表 2)。为分析家鸽与其他物种 *Caveolin-1* 基因的进化关系, 取本实验获得的 *Caveolin-1* 基因序列与 GenBank 中包括鸡、大鼠、野猪、牛、绵羊、狗、人、黑猩猩等物种的 *Caveolin-1* 序列, 利用 MEGA 4.0 软件构建 9 个物种的分子进化树(图 3)。由图 3 可见, 家鸽与鸡形成一个分支, 其他哺乳动物形成一个分支, 这与动物形态分类学一致。

2.4 蛋白预测

家鸽 *Caveolin-1* 蛋白预测相对分子质量为 20 524, 与鸡(MW=20447)和(MW=20472)*Caveolin-1* 相似。预测等电点为 5.84, 这与鸡、人 *Caveolin-1*

```

1      GAAAAATATAGCGCAGAAACCCACGGCAGAGCCGCCAGCCAGCCCCGGGGCAGCATGTCCGG
61      TACCAAATACGTAGACTCGGAGGGCTTCTGTACACGGCGCCCATCAGGGAGCAGGGCAA
      T K Y V D S E G F L Y T A P I R E Q G N
121     CATCTACAAGCCCAACAACAAACGATGGCAGATGAGCTGAACGAAAAGCGGTGACGGA
      I Y K P N N K T M A D E L N E K A V H D
181     CGTGCACACCAAAGAGATCGACCTGGTCAACCGAGACCCCTAAGCACCTCAACGACGACGT
      V H T K E I D L V N R D P K H L N D D V
241     GGTCAAGATTGATTTTGAAGATGTGATTGCTGAGCCAGAGGGAACACACAGCTTTGATGG
      V K I D F E D V I A E P E G T H S F D G
301     AATTTGGAAGGCCAGTTTACCACCTTCACTGTAAACAAATACTGGTTTATCTGCTTACT
      I W K A S F T T F T V T K Y W F Y R L L
361     GTCAGCAATCTTTGGCATTCTATGGCTCTCATCTGGGGCATCTACTTTGCCATTTTGTCT
      S A I F G I P M A L I W G I Y F A I L S
421     ATTCTGCACATCTGGGCAGTGGTGCCTTGCATAAGGAGCTACCTGATTGAGATGACAGTG
      F L H I W A V V P C I R S Y L I E I Q C
481     CATTAGCCGCGTCTATTTCATCTGCATCCACACGTTCTGCGACCCACTGTTTGAGGGCCAT
      I S R V Y S I C I H T F C D P L F E A I
541     AGGCAAAATGTTTCAGCAGCATCCGAGCCACAGTACGGAAAGAAATTTGAGGGACATTTCA
      G K M F S S I R A T V R K E I *
601     AGAAGACCCATCAGCCTAGGAAGGGGGCAGGGTTTGTGTGTTGTTTGAAGTGTGTTTGGTG
661     CCAGTTTTGTGTTTCCCAAAGCAAAAGTACAGCAACTGGTGGTGATATAGTGGCCCAAAA
721     CAAAGAATCACTTGCTCAGTTTCTTTTCTACTGTTTATCTTACTGGACTACTTGCTTT
781     GGGTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTTCAGTCTGCATTCAAACCTAACCTT
841     AAATGGTTATTCTTCCATGCCAGCTGCATATCATTTTGTCTGGCTGCTCAGTTTCAGAGACT
901     GAAGTGTGTTGGATGACTTTTATCTCACCCCTGCATTTCCTTGTGAGATAAATCCACAGT
961     GATACTGAAGAACGACAAAAATGCTTTCCAACTGTAAAGCCATTGATTTTATTGTGGC
1021    CAAAGAGCAGCAGAGCTATTGAAGCAGAAAGAACGTCAGCAGCTGGCAGGTTTATGACAGAA
1081    TGTCTTTTCAATTGGATTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
1141    GTGCACTATGAATAAATAGTTAAGTAAACAAATTAATTAACATAATATATGCTCGTGA
1201    TCCAACTATTTAGAGTTTGGAGACATAGACATGTGAGAGCTTTTCATGCGCATAAAAAG
1261    CTTCACTTGGTGCCTTTCTTTCACATTCTCTTGGAAAGTTTGCATCCAGCCATTCTCTCA
1321    ACCTTTGCTAGGATTGCAGAAAGCAAACTGCAGTTGAGAACTAAAACTGGTCAATTATGGAA
1381    AAGTTTCCCGACTGCGACTTATAACACCTCCCTTAGAGAGCCTTTAGGTGCTTTATCTCA
1441    TAGGCTTCTTTTGGATTGCAAAATTCATATAAATGCATATTGACGCTGCTGCCAGAGA
1501    TAACCTGTAGTTACAAGAAAAATGAAGGCGTGCCAAGCACAACCATATGAGGCCAAGCA
1561    GGGACTGGCCAGAGATAAACTTTTCTGTCGGCTTTCTAAATTTCCCTACCAGCAGCAGT
1621    CAGCATGCCACTAGTACATAGATTATTTTCAGGAGGGTTGATCTTTCTGAGTCAAAACT
1681    AATCCATCACTAGAGATGGTTTAGAACTTTACACATTGTGGGTTGTTTGTGTTGCTTT
1741    TAGCTAAGCTGCAACATCAGGAAGCTTTAAAGGGAGGGTGTGTTGTGTAAGTGCACATG
1801    GCAAGTGCAGAGGCTAGAAAGCAAGCTTTGCGACATGTTGTGATGCTGTGACCTGCA
1861    GGAGCTTTTGGCCCTCACAATAGTACTGTGTCCAGAGACGCTCTCTGATCCTCATATGG
1921    TTTGCTGTAACATTTGTAATAAATAGTTGTGAGGCTGATCAGCTTTATTGTAACCAAGT
1981    TGGGCTGAGCCTGCTCCAGTTGGGATCTCCAGCAAACTCTTTCAGTCCGAGAGT
2041    GCAAGACTTGGCCTTGGGATGAGCATGGAGCTGTCTGGTACACCTACAGCTTTTATTTT
2101    AGCGCTGATATTTACATATTGCTTTTACCTAACACGGGAGTGCCTTCGGTTCAATTTCTG
2161    CCAAAGCATTGAAAGCTTTAAGAAATGCTGCATTTTATTGGGGAGGGGAAAAGGGGAG
2221    AGGGTGACAAAAAAATACGAAGCTATTAACTACTATTGTTTGCATTAAAAACAGACAC
2281    TGGTATGGATATAGTTTATGTTTCTATGTACATAAATGAAGAGTGTACTATTATAGAT
2341    TTTTTCAGTATTAACAAAGCAAGATTGTAAACAGAAATATTTATCTTTTATGAGG
2401    AGAATCAGCTGAAGAATACCTTGAGTTACCATATAAACTGTATATCTGAAAGAGTCTCT
2461    GTTCACTTAGAGTTATTAGCCCTAATCCAAATACATTGCTGATCCAAGACATTTACATT
2521    GTTGTATACGCTTACAGATATACTGACACTTTTTTAAATTTGTCATGTACATTAAAG
2581    ACTACAATAAAAAAGAAAAA

```

图 2 家鸽 *Caveolin-1* 基因核苷酸及氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *Caveolin-1* gene and putative amino acid sequence of *Caveolin-1* in *Columba livia domestica*

表 2 家鸽与其它动物 *Caveolin-1* 基因编码区的同源性比较

Tab. 2 Homologous comparisons of *Caveolin-1* gene CDS between *Columba livia domestica* and other species

物种 Species	GenBank登录号 Accession no.	碱基同源性(%) Nucleotide homology	氨基酸同源性(%) Amino acid homology
欧洲牛 <i>Bos taurus</i>	AY823915	82.0	88.5
家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	NM_001003296	81.8	85.4
鸡 <i>Gallus gallus</i>	NM_001105664	93.4	97.2
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_001753	81.2	86.9
绵羊 <i>Ovis aries</i>	AY684195	82.0	88.5
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	NM_001135818	81.2	86.9
褐家鼠(beta) <i>Rattus norvegicus</i>	NM_133651	80.1	89.2
野猪 <i>Sus scrofa</i>	AY490204	80.2	88.5

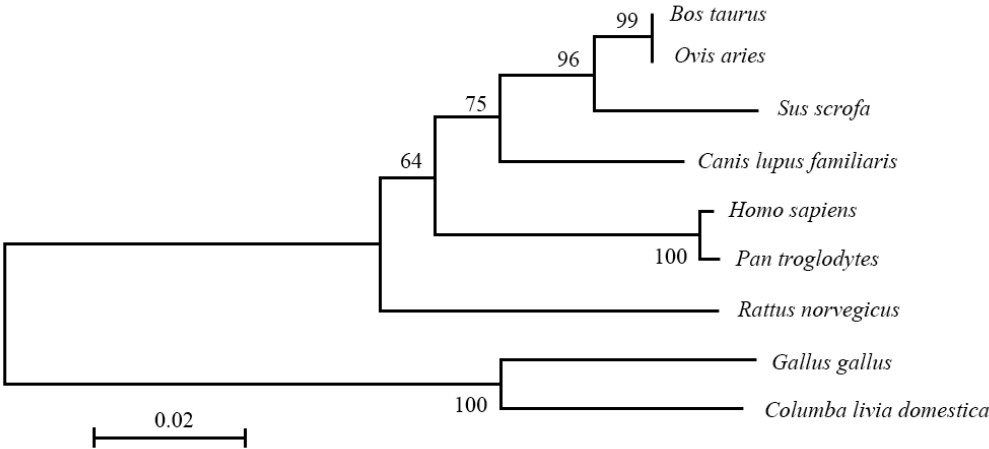


图 3 基于不同物种 *Caveolin-1* 基因构建的分子进化树

Fig. 3 Neighbor-Joining tree reconstructed based on *Caveolin-1* gene

等电点相近。使用 TMPRED 在线分析工具预测家鸽 *Caveolin-1* 跨膜结构(图 4)，得到一个跨膜结构域,在 112~130 氨基酸处,该特征与人的 *Caveolin-1* 蛋白相似。

2.5 不同组织 mRNA 表达分析

采用半定量 RT-PCR 方法，检测了 *Caveolin-1* 基因 mRNA 在家鸽胸肌、肝脏、肺、心肌、肌胃、腿肌、脑、小肠、肾和脂肪等不同组织的表达情况，同时以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)基因的表达作为内参照(图 5)。通过 PCR 条件优化，分别选择 *GAPDH* 基因和 *Caveolin-1* 基因在扩增进入平台期前的循环数为 28 次和 34 次。结果发现，*Caveolin-1* mRNA 在脂肪中的表达量最高，胸肌、肺、心肌、肌胃、腿肌和小肠中的表达量明显高于肝脏、脑和肾中的表达量，肝脏中表达量最低。

3 讨论

本实验采用 RT-PCR、5'-RACE 和 3'-RACE 的方法首次从家鸽胸肌组织总 RNA 中扩增了 *Caveolin-1* 基因 cDNA 片段，克隆测序后，拼接获得了家鸽 *Caveolin-1* 基因的全长 cDNA 序列。该序列包含 537 bp 的完整编码区，编码 178 个氨基酸。将该序列与其他物种的 *Caveolin-1* 基因核苷酸和氨基酸序列比较，与其他物种的同源性较高，其中与鸡的同源性最高。*Caveolin-1* 在褐家鼠等动物体内有 α 、 β 两种亚型，通过序列比对发现，我们克隆得到的序列为 α 亚型的序列。

哺乳动物 *Caveolin-1* 结构比较特殊：N 端和 C 段都伸向胞浆内，中间疏水的 102~134 氨基酸残基形成发卡结构插入到膜内(Le et al, 2009)。在 N 端方向，有两个重要的功能域：一个是位于第 61~

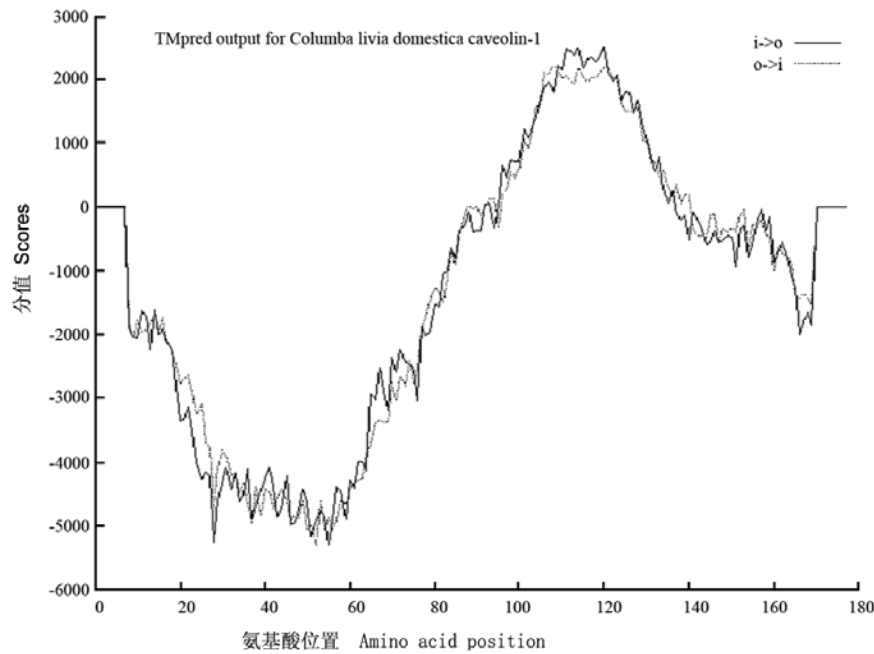


图 4 家鸽 *Caveolin-1* 蛋白的跨膜结构预测

Fig. 4 Predication of transmembrane structure of *Caveolin-1* in *Columba livia domestica*

横坐标表示为鸽 *Caveolin-1* 蛋白的氨基酸位置；纵坐标为分值，分值大于 500 者才有统计意义，正值为疏水性，负值为亲水性。i->o 表示方向为胞内到胞外，o->i 表示方向为胞外到胞内。
The abscissa is the amino acid position of *Columba livia domestica* *Caveolin-1*, and the ordinate is the scores. Scores above 500 are considered significant. Scores above zero mean hydrophobic, meanwhile scores below zero mean hydrophilic. i->o and o->i show the directions from inside to outside, and from outside to inside, respectively.

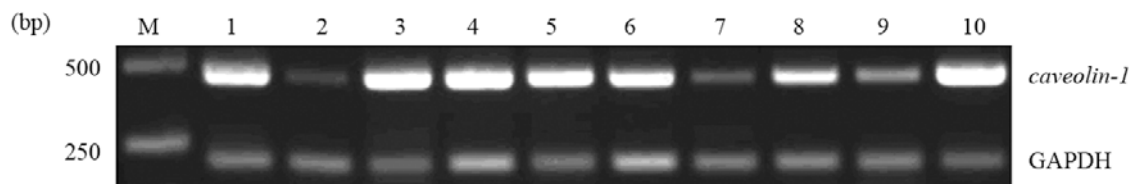


图 5 家鸽 *Caveolin-1* 基因表达的半定量 RT-PCR 检测

Fig. 5 Detection of *Caveolin-1* gene expression in *Columba livia domestica* by semi- quantitative RT-PCR

M: DL-2000 DNA Marker; 1: 胸肌; 2: 肝脏; 3: 肺; 4: 心肌; 5: 肌胃; 6: 腿肌; 7: 脑; 8: 小肠; 9: 肾; 10: 脂肪。
M: DL2000 DNA Marker; 1. Breast Muscle; 2. Liver; 3. Lung; 4. Heart; 5. Muscle stomach; 6. Thigh muscle; 7. Brain; 8. Small intestine; 9. Kidney; 10. Fat.

101 氨基酸残基的寡聚化功能域(oligomerization domain),它是 *Caveolin-1* 单体聚集形成同源寡聚体所必须的结构域;一个是位于第 82~101 氨基酸残基的窖蛋白脚手架区(*Caveolin* scaffolding domain, CSD),它是介导 *Caveolin-1* 与多种信号分子相互作用的区域(Cohen et al, 2003)。我们将预测的家鸽 *Caveolin-1* 氨基酸序列与人、鸡、褐家鼠和家犬等物种 *Caveolin-1* 氨基酸序列进行比对,发现在这 9 个物种内,包括窖蛋白脚手架区(第 82~101 氨基酸残基)在内的寡聚化功能域(第 61~101 氨基酸残基)的氨基酸序列是完全相同的(图 6)。寡聚化功能域

和窖蛋白脚手架区在进化上的高度保守性暗示了它们对于窖蛋白的重要性。

本实验对家鸽 *Caveolin-1* 基因 mRNA 进行了组织表达差异的研究,在所检测的 10 种组织中,其 mRNA 都有表达,尤其在脂肪组织中表达量最高,这与 Wang et al (2008)报道的 *Caveolin-1* 在猪体内的组织表达特异性相吻合。我们下一步将采用 PCR-SSCP 技术对 *Caveolin-1* 基因进行 SNP 检测,并将其与脂肪性状进行相关性分析,旨在揭示 *Caveolin-1* 基因在家鸽中的变异情况,并判断其是否影响脂肪沉积,为进一步研究该基因在鸟类体内

