

## 小麦小 G 蛋白 Tarab5B 基因全长 cDNA 克隆及表达特性的初步分析

陈秀珍 周荣华 贾继增\*

(中国农业科学院作物科学研究所农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

**摘要:** 通过对白粉病菌诱导的小麦叶片 cDNA 文库的测序, 获得 1 个与水稻 *Rab5B* 基因一致性达 89% 的序列。以该序列为信息探针, 筛选小麦 EST 数据库并进行电子拼接。根据拼接结果设计引物, 利用 RT-PCR 方法获得了 1 个小麦中尚未鉴定的全长 cDNA 克隆 *Tarab5B*。*Tarab5B* 基因编码的蛋白具有结合 GIP/ GDP 的 4 个保守结构域以及 Rab 家族成员所特有的结构域。同源分析表明, 该基因属于 *Rab5B* 亚族。麦类 *Rab5B* 蛋白的 GDSGVGKS、DTAQE、NKAD、ETSA 和 MGCSSS 5 个结构域在进化上非常保守, 而 YYRGA 结构域及其邻近的 C 端 6 个氨基酸残基在小麦材料间同源性很低。RT-PCR 检测显示, 抗、感两个材料 *Tarab5B* 基因在接种后 24 h 和未接种 24 h 的表达水平基本相同; 在接种后 1 h、4 h、7 h、12 h, 抗、感两个材料间 *Tarab5B* 基因的表达水平有一定差异。

**关键词:** 小麦; 小 G 蛋白; 基因克隆; 结构域; 白粉病

中图分类号: S512

## Isolation, Primary Expression Analysis of a Full-length cDNA Clone Encoding Small GTP-binding Protein Gene Tarab5B in Wheat

CHEN Xiu-Zhen, ZHOU Rong-Hua, JIA Ji-Zeng\*

(Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Rab proteins are monomeric small GTP-binding proteins. They exist in all eukaryotic cells and play an important role in vesicular transport. Vesicular transport is required for specialized phenomena as well as common house-keeping function in higher plants. For example, some Rab proteins are involved in development, morphosis and adversity resistance. To date, four *Rab5B* genes have been isolated respectively from *Lotus japonicus*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. Compared with yeast and mammalian, plant *Rab5B* proteins contain plant unique domain in addition to possessing several conserved domains common to small GTP binding protein suggesting that plants may well have developed plant-specific mechanisms of vesicular traffic. *Rab5B* protein functions have been studied extensively in yeast and mammalian systems. However, little information is available about the function of plant *Rab5B* proteins. In our study, a cDNA library was constructed using mRNA from leaves of *Pm16* near isogenic line inoculation with powdery mildew. A partial sequence encoding *Rab5B* protein has been isolated by sequencing the cDNA library. In order to obtain the full-length cDNA sequence of *Rab5B* gene in wheat, silicon cloning was performed against wheat EST database based on this sequence. A contig was obtained which shared high similarity to *Rab5B* gene. According to the contig, a pair of primers was designed and a predicted fragment with 722 bp length was obtained via RT-PCR. PCR product was purified and ligated into vector. A positive cDNA clone was obtained, named *Tarab5B*, and sequenced. Judged by the characters of its nucleotide sequence, *Tarab5B* clone contains the full-length cDNA sequence of *Rab5B* gene. This protein encoded by this cDNA clone included four conserved domains for guanine nucleotide binding and GTPase activities and a domain specific to Rab family. Homologue analysis indicated that amino acid sequence deduced by *Tarab5B* clone showed high similarity to those of *Rab5B* genes from *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Mesembryanthemum crystallinum* and *Lotus japonicus*. Domain comparison showed that GDSGVGKS, DTAQE, NKAD, ETSA and MGCSSS were very conserved among six different materials. However, YYRGA and neighbouring six amino acid residues of its C ends showed significant differences. Expression profile analysis indicated that the expression level of the *Tarab5B* gene between resistant and susceptible materials

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 专项, G19980102)。

作者简介: 陈秀珍(1971 - ), 女, 中国农业科学院博士研究生。\*通讯作者: 贾继增, 研究员, 博士生导师。E-mail: jzjia@mail.caas.net.cn  
Received(收稿日期): 2004-04-27, Accepted(接受日期) 2004-08-31.

at 24 h after inoculation with powdery mildew and 24 h in control (no inoculating with powdery mildew). At 1 h, 4 h, 7 h and 12 h after inoculation with powdery mildew, expression level of the *Tarab5B* gene showed some difference between resistant and susceptible materials. Here it is the first time to report the full-length cDNA of *Tarab5B* gene in wheat. It includes complete coding sequence of *Rab5B* gene. The predicted protein belongs to Rab5B subfamily.

**Key words:** Wheat; Small G protein; Gene cloning; Domain; Powdery mildew

Rab 蛋白是一类单体形式的小 G 蛋白<sup>[1]</sup>, 与 Ras、Rho、Rab、Arf 和 Ran 亚家族共属于 Ras 超家族<sup>[2-3]</sup>, 是 Ras 超家族最大的一个分支<sup>[4]</sup>。Rab 家族的不同成员定位于细胞内与胞吞和胞吐相关的不同的膜区室上, 在真核细胞的膜泡运输中起重要的调控作用。目前, 在高等植物中已分离克隆到许多 *Rab* 基因<sup>[3,5-7]</sup>。与酵母和脊椎动物 Rab5B 蛋白相比, 植物 Rab5B 蛋白除具有小 G 蛋白共有的特征外, 还有自己的特殊性<sup>[8]</sup>。它的 C 端没有异戊二烯化基序 (CAAX, CXC 或 CC), 而在 N 端有一个豆蔻酰化基序。这两个脂肪酰化的基序与 Rab 蛋白的附膜密切相关, 因此, 植物 Rab5B 蛋白很可能具有其他物种来源的 Rab 蛋白所不同的附膜机制<sup>[9]</sup>。近年来, 人们分别从龙船海棠属、百脉根属、拟南芥及水稻中克隆到 *Rab5B* 基因, 并对其表达进行了分析<sup>[8-11]</sup>。

本研究通过对小麦叶片 cDNA 文库进行测序、电子拼接和 RT-PCR, 获得 1 个小麦中尚未报道的小 G 蛋白基因 *Tarab5B* 的全长 cDNA 序列, 初步研究了其结构域及表达特性, 为研究植物 *Rab5B* 基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验所用的小麦抗白粉病近等基因系 (Pm16/7\* 北京 837 F<sub>4</sub>) 和北京 837 由本实验室提供。用于接种的白粉病菌 (*Blumeria graminis* DC) E09 菌株是北京地区流行的 15 号生理小种。

### 1.2 总 RNA、mRNA 的提取

小麦总 RNA 提取采用一步法进行 (TRIzol 试剂, GIBCO/BRL 公司)。mRNA 分离、纯化系按照 Promega polyAtract mRNA isolation system 进行。

### 1.3 cDNA 文库构建和序列测定

以小麦抗白粉病近等基因系 (Pm16/7\* 北京 837 F<sub>4</sub>) 为材料, 选取大小、色泽、饱满度一致的种子种于培养钵中, 室温条件下培养, 培养钵套以透明塑料膜圆桶, 在圆桶上方盖 8 层纱布, 待苗长至一叶一心

后, 均匀抖落白粉病菌。提取接种后 1 h、3 h、6 h、9 h、12 h、16 h、20 h、24 h 的叶片总 RNA, 总 RNA 等量混合后提取 mRNA。用 SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit (Clontech K1051-1) 完成双链 cDNA 合成、*Sfi* 酶切、片段的分级以及连接。连接产物按照 ZAP-cDNA Ggapack Gold Cloning Kit 进行包装, 包装后的产物即为原始文库 (primary library)。原始文库未经扩增直接转化大肠杆菌 BM25.8 感受态细胞。挑取 cDNA 克隆于 96 深孔板, 常规培养。用 Millipore 方法抽提质粒 DNA。cDNA 的序列测定采用 ABI3700 和 ABI3730 测序仪。

### 1.4 同源性比较

利用 Blastn 和 Blastx 进行核酸和蛋白序列的同源性比较, 蛋白的多序列比较采用 DNAStar 的 Clustal 程序。

### 1.5 *Tarab5B* cDNA 的 PCR 扩增及克隆

以构建 cDNA 文库的不同时间点等量混合的总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 第一链的合成参照 Gbco 公司反转录试剂盒 (Superscript) 进行。用于反转录的引物序列是 5'-GAGAGAGAGAGAGAACTCGAGTTTTTTTTTTTTTTIVN-3, (V 是简并碱基, 它是 G、A、C 三种碱基中的任一种。N 是简并碱基, 它是 G、A、C、T 四种碱基中的任一种)。根据电子拼接序列设计 5 引物 F0-2 (5'-AACCTCGGGCATTIACA-3) 和 3 引物 R0-2 (5'-GAGACTCCGCACGAACC-3) 进行 PCR 扩增, 上下链引物序列均位于开放阅读框架外侧。优化的 PCR 反应体系为: 25  $\mu$ L 反应体积, 其中含 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 1.8 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 4 种底物 dNTPs 各 0.2 mmol/L, 正反 2 个引物各 0.2  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。反应条件为 94  $^{\circ}$ C 变性 3 min, 继而 94  $^{\circ}$ C 1 min, 53.2  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 10  $^{\circ}$ C 保温。扩增片段回收、克隆、测序。

### 1.6 *Tarab5B* 基因的 RT-PCR 半定量检测

以反转录时不加反转录酶为阴性对照, 选用 *tublin* 基因作为内参来调整样品的模板浓度。RT-PCR 反应体系及程序同 1.5。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦 *Tarab5B* 基因 cDNA 全长的分离

通过白粉病菌诱导的小麦叶片 cDNA 文库测序,获得一个与小 G 蛋白基因 *Rab5B* 一致性达 89% 的 452 bp 的 cDNA 序列,以该序列为信息探针,筛选小麦 EST 数据库,并用 CAP<sub>3</sub> 进行拼接。拼接后的序列长度为 1 024 bp,与水稻、百脉根属、龙船海棠属及拟南芥中的 *Rab5B* 基因的 cDNA 序列相似性分别为 89%、83%、81%、80%。根据拼接序列设计引物,利用 RT-PCR 得到了预期长度的扩增产物(见图 1),将其回收、克隆、测序。将该产物对应的克隆命名为 *Tarab5B*,长 722 bp,编码区 36~632 bp,拟编码 199 个氨基酸,预测分子质量 21 428.19 Da,等电点 5.845。如图 2 框中所示,起始密码子 ATG 左右有典型的 Kozak 序列 GCCATGG,终止密码子 TGA 是单子叶植物最常利用的密码子(<http://www.ebio-trade.com/bbsf>),3 端有典型的加尾信号 AATAAA,从序列特征判断,该克隆含有完整的编码框。

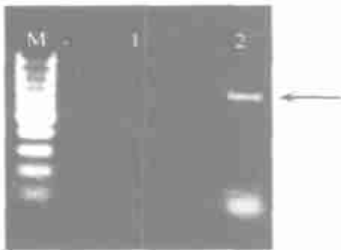


图 1 RT-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上的电泳结果  
Fig. 1 Result of RT-PCR product after electrophoresis in 1.5% agarose gel

M: MBI 100 bp DNA ladder marker plus; 1: 为阴性对照(为了检测总 RNA 中是否有 DNA 污染,确保扩增产物是目的片段,在合成 sscDNAs 时,反应体系中不加反转录酶);

2: 箭头所指为预期的 RT-PCR 扩增片段。

M: MBI 100 bp DNA ladder marker plus system; 1: Negative control (when synthesizing sscDNAs, no reverse transcriptase was added to the reaction system in order to detect whether there existed the genome DNA contamination in total RNA);

2: The predicted fragment for RT-PCR is indicated by the arrow.

### 2.2 推导的小麦 *Tarab5B* 蛋白质的结构域分析及同源性比较

2.2.1 *Tarab5B* 蛋白质的结构域分析 从推导的氨基酸序列看, *Tarab5B* 基因编码的蛋白具有结合 GTP/ GDP 所必需的 4 个保守结构域( , , ,

) ,即磷酸结合回环 QDSGVKS,协调 GTP 的 和 - 磷酸基序 DTACQE、强化鸟嘌呤结合基序 NKAD、帮助鸟嘌呤结合和解离基序 ETSA。此外, *Tarab5B* 蛋白还具备 Rab 家族共有的结构域 YYRGA(图 2)。

2.2.2 同源比较 Blastx 结果显示,小麦 *Tarab5B* 基因编码的氨基酸序列与水稻、拟南芥、龙船海棠属、百脉根属命名为 *Rab5B* 基因的氨基酸序列的相似性分别为 86%、74%、73% 和 72%,同它们一样, *Tarab5B* 蛋白在 N 端有一个豆蔻酰化的基序 MGXXXS,且与水稻 OSRab5B 蛋白的豆蔻酰化基序完全一致,上述分析表明该基因编码的蛋白属于 Rab5B 亚族。

### 2.3 小麦 *Tarab5B* 蛋白结构域的保守性分析

将小麦 *Tarab5B* 基因的核苷酸序列与小麦的 EST 数据库进行 blastn 比较,获得与之相似性在 85% 以上且期望值 E 小于  $e^{-30}$  的 19 条 EST 序列,将这些 EST 序列递交给 GenBank 进行 Blastx 比较,获得 5 条与 Rab5B 蛋白相似性较高的 EST 序列(登录号分别为 BJ311727、BE585583、CD914499、AJ611644、BF292512)。这 5 条序列分别来自普通小麦中国春、苏麦 3 号、Recital 以及圆锥小麦、拟斯卑尔脱山羊草。

从图 3 可以看出,麦类 Rab5B 蛋白的 QDSGVGKS、DTACQE、NKAD、ETSA 和 MGCSSS 结构域在进化上非常保守,这 5 个结构域的保守性与其结合 GTP 的功能和附膜机制密切相关。YYRGA 结构域及其邻近的 C 端 6 个氨基酸残基在材料间存在很大的变异。

### 2.4 *Tarab5B* 基因的表达分析

为研究 *Tarab5B* 基因在抗病反应中的可能作用,分别提取了小麦抗白粉病近等基因系(Pm16/7\* 北京 837 F<sub>4</sub>)和敏感材料北京 837 在白粉病菌诱导后 1 h、4 h、7 h、12 h 及 24 h 的叶片总 RNA 以及未经诱导的叶片总 RNA,用于 RT-PCR 分析。以 Tublin 作为内参调整样品的模板浓度。从 Tublin 的 RT-PCR 结果(图 4)可以看出,样品的模板浓度比较一致。用上述的 5 引物 F0-2 和 3 引物 R0-2,在抗、感两个材料间进行 RT-PCR,结果显示,未接种 24 h 与接种 24 h 抗、感两个材料间, *Tarab5B* 基因的表达量基本一致;在接种后 1 h、4 h、7 h、12 h,抗、感两个材料间 *Tarab5B* 基因的表达水平有一定的差异,敏感材料北京 837 高于或略高于抗白粉病近等基因系(Pm16/7\* 北京 837 F<sub>4</sub>)。

5' GAGACTCCGCACGAACCCGGCCGAAGGCGCGG **GCATGG** GCTGCTCCTCCTCCGTGCCAGCTAGA  
M G C S S S V P A R  
AGCACCGGAGGGCTGAACAATATCAACGGCAGCTCTTCTGCTGCTGATTCAAATGACTTGCGTGCCAA  
S T G G L N N I N G S S S A A D S N D L R A K  
GTTAGTATTGCTTGGAGATTCTGGTGTGGAAAAAGCTGCATCGTTCCTCGGTTTGTCCGCGGTTCAGTT  
L V L L G D S G V G K S C I V L R F V R G Q F  
CGATCCAACCTCCAAGGTAAGTGTGGTGCATCATTTTTATCACAACAATGGCGTGGAGGATTTCGAC  
D P T S K V T V G A S F L S Q T L A L E D S T  
AATAGTGAAGTTTGAAATCTGGGATACTGCTGGACAAGAGAGATATGCTGCCTTGGCACCCCTTTACTA  
I V K F E I W **D T A G Q E** R Y A A L A P L **F E**  
CAGAGGAGCTGCTGCTGCGGTTGTTGTCTATGACATAACTAGTCCAGAATCATTCAAGAAAGCACAAAT  
**R V A A A V V V Y D I T S P E S F K K A Q Y**  
ATTGGGTGAAGGAACTTCAAAAACATGGTAGTCTGGTATTGTCATGGTTTTGGTTGGTAATAAAGCTG  
W V K E L Q K H G S P G I V M V L V G **N K A D**  
ATCTACATGAAAGTCGAAGTGTACCTTCTCAGGAGGCACAAGAGTATGCAGAGAAGAACAGCATGTTA  
L H E S R S V P S Q E A Q E Y A E K N S M L  
TTCATGGAGACGTCAGCAAAAACATCTGATAATATAAATCAAGTATTTGAGGAAATCGCGAAGAGGTT  
F M **E F S A** K T S D N I N Q V F E E I A K R L  
GCCCAAGCCAACGGCGTCC **CG** TA **AAAA** TAGCTCTCGTGTACTATATTGAGATGGAGTGACACGCTT  
P K P T A S  
ACAAGTCTGTACCATGTAATGCATGTAAATGCCCGAGGTT 3'

图2 小麦 Tarab5B 克隆的核酸序列及其推导出的氨基酸序列  
Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of Tarab5B clone in wheat  
斜体字母表示氨基酸。Italic letters represent amino acids.

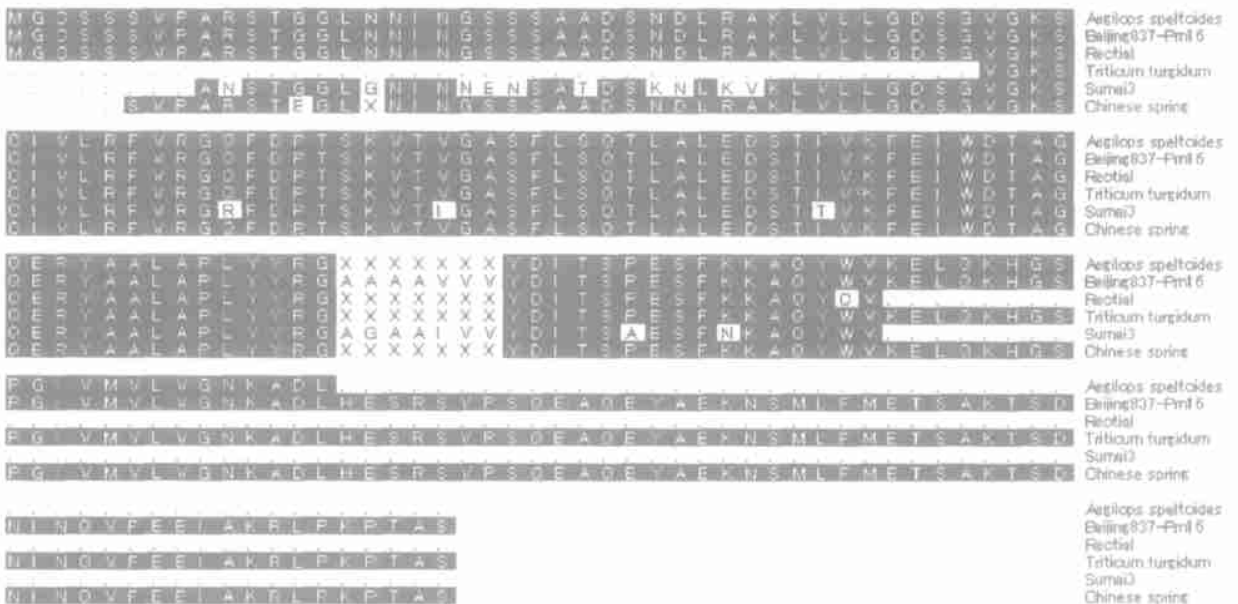


图3 小麦 Tarab5B 蛋白结构域的保守性分析

Fig. 3 Conserve analysis of domain of Tarab5B protein in wheat

·表示序列两端空缺;X表示中间序列缺失。Dot indicates the vacancy of both ends of sequence;X indicates the deletion of middle sequence.

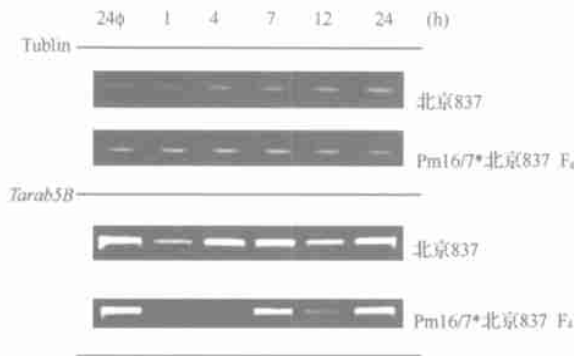


图 4 小麦 *Tarab5B* 基因的 RT-PCR 检测

Fig. 4 RT-PCR analysis of *Tarab5B* gene of wheat

24 $\phi$  表示未诱导;1,4,7,12,24 表示白粉病诱导后的取样时间(单位:小时)。

24 $\phi$ :non-inoculation with powdery mildew, 1,4,7,12,24: the sampling time after inoculation with powdery mildew(h).

### 3 讨论

Rab 蛋白参与膜泡运输,严格调节着基因的表达,在植物生长发育和形态建成过程中起着重要的作用<sup>[12]</sup>。Lu 等(2001)研究表明,反义 *Rab11* 的表达导致番茄发育异常、果实柔软度降低<sup>[13]</sup>。Rab 蛋白除了参与膜泡运输持家功能外,它们还与抗逆性有关<sup>[14]</sup>。Bolte 等(2000)报道,在盐胁迫的早期,普通冰草 *Rab5B* 基因的表达量增加<sup>[8]</sup>。根据核苷酸序列分析、蛋白质结构域分析和同源性分析,证实笔者获得的 cDNA 克隆具有 *Rab5B* 基因的完整编码序列,其编码的蛋白属于 *Rab5B* 亚族,在体内可能行使 Rab 的功能。

结构域的保守性分析表明,YYRGA 结构域及其旁侧的 6 个氨基酸残基在小麦材料间存在很大差异,而不同物种间的差异却很小。同一基因的种内遗传多样性高于种间遗传多样性的现象在其他基因中也有(胡志昂,私人通讯)。在已克隆的 4 个植物 *Rab5B* 基因中,只有拟南芥的作了功能分析。YYRGA 结构域的改变对于该类基因功能的发挥有何影响,目前还未见报道。

RT-PCR 检测显示,*Tarab5B* 基因的表达模式类似于大麦中已克隆的小 G 蛋白基因 *RacB*。Holger 等(2002)的研究表明,*RacB* 基因在抗、感材料间均有表达,且不受白粉病菌诱导,通过 RNAi 技术,证明 *RacB* 基因是一个感病因子<sup>[15]</sup>。在白粉病诱导后 4 h、7 h、12 h 的 *Tarab5B* 基因表达水平感材料高于抗病材料,但它是否是感病因子,还有待进一步验证。另外,不同时间取样点该基因的表达水平又有不同,推测该基因的表达可能受 24 h 内在生长发

育节律的调控。

小麦 *Tarab5B* 基因全长 cDNA 的获得仅仅是一个开端,关于它的基因组序列、染色体位置以及编码蛋白的生物学功能尚需进一步研究。

### References

- [1] Armstrong J. How do Rab proteins function in membrane traffic? *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32**(3): 303 - 307
- [2] Bischoff F, Mølendijk A, Rajendrakumar C S, Palme K. GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**: 233 - 256
- [3] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 2001, **81**:153 - 208
- [4] Chavrier P, Gound B. The role of ARF and Rab GTPase in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, **11**: 466 - 475
- [5] Ma H. GTP-binding proteins in plants: new members of old family. *Plant Mol Biol*, 1994, **26**:1 611 - 1 636
- [6] Verma D P S, Cheon C I, Hong Z. Small GTP-binding proteins and membrane biogenesis in plants. *Plant Physiol*, 1994, **106**: 1 - 6
- [7] Vanessa Vernoud, Amy C Horton, Zhenbiao Yang, Erik Nielsen. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003, **131**: 1 191 - 1 208
- [8] Borg S, Brandstrup B, Jenssen T J, Poulsen C. Identification of new protein species among 33 different small GTP binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus* and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. *Plant J*, 1997, **11**(2): 237 - 250
- [9] Bolte S, Schiene K, Dietz K J. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol Biol*, 2000, **42**(6): 923 - 936
- [10] Takashi Ueda, Masatoshi Yamaguchi, Hirofumi Uchimiya, Akihiko Nakano. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, 2001, **20**(17): 4 730 - 4 741
- [11] Lin H-X(林慧贤), Liu X-B(刘筱斌), Li F-Q(李发强), Luo W-Y(罗文勇), Liu L-S(刘良式). Cloning and characterization of a rice small GTP-binding protein gene of *Osrab5B*. *High Technology Communication* (高技术通讯), 2001, **3**:9 - 14 (in Chinese with English abstract)
- [12] Takashi Ueda, Noriyuki Matsuda, Toyooki Anai, Hirokazu Tsukaya, Hirofumi Uchimiya, Akihiko Nakanob. An Arabidopsis gene isolated by a novel method for detecting genetic interaction in yeast encodes the GDP dissociation inhibitor of Ara4 GTPase. *The Plant Cell*, 1996, **8**: 2 079 - 2 091
- [13] Lu C, Zainal Z, Tucker GA, Lycett GW. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an anti-sense Rab11 GTPase gene. *The Plant Cell*, 2001, **13**:1 819 - 1 833
- [14] Alexander Mazel, Yehoram Leshem, Budhi Sagar Tiwari, Alex Levine. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7(AtRabG3e). *Plant Physiology*, 2004, **134**: 118 - 128
- [15] Holger Schulthesis, Cornelia Dechert, Karl-Heinz Kögel, Ralph H kchelhoven. A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiology*, 2002, **128**: 1 447 - 1 454