

# 辣椒小 G 蛋白 *CaRab11* 基因全长 cDNA 的分离及序列分析

赖 燕<sup>1</sup> 林金辉<sup>1</sup> 陈成聪<sup>1</sup> 官德义<sup>2</sup> 牟少亮<sup>2</sup> 邱爱连<sup>1</sup> 何水林<sup>1,2\*</sup>

(1. 福建农林大学 生命科学学院 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 作物科学学院 福建 福州 350002)

**摘要:**通过分析克隆获得的辣椒 *Rab11* 全长 cDNA 及其编码的氨基酸序列结构特征,为进一步研究辣椒 *Rab11* 功能奠定基础。通过对辣椒均一化 cDNA 文库的筛选分离获得了一个与葡萄 *Rab11* 小 G 蛋白 *VvRabA1f* 高度同源的全长 cDNA,命名为 *CaRab11*。序列分析结果表明:该 cDNA 包含有 1 164 bp 的完整开放阅读框,编码 217 个氨基酸。该蛋白含有 Rab GTP 酶超家族保守的 RabSF 模体; Rab 亚家族蛋白所特有的五个氨基酸序列 RabF 模体 (RabF1 - RabF5); 参与 GTP/Mg<sup>++</sup> 结合及 GTP 水解的 G 结构域 (G1 - G5: GDGSGVGS, T, DTAGQE, GNKADL 及 ETSAL); 两个构象变构域 (Switch I 和 Switch II) 及与异戊二烯化相关的 CCX 序列。氨基酸同源性及进化分析同样表明 *CaRab11* 为辣椒小 G 蛋白 *Rab11* 家族新成员。

**关键词:**辣椒; 小 G 蛋白; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S641.3; Q78 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2012)05 - 1021 - 05

## Isolation and Sequence Analysis of a Full-length cDNA Clone Encoding Small GTP-Binding Protein Gene *CaRab11* in Pepper

LAI Yan<sup>1</sup>, LIN Jin-hui<sup>1</sup>, CHEN Cheng-cong<sup>1</sup>, GUAN De-yi<sup>2</sup>,  
MOU Shao-liang<sup>1</sup>, QIU Ai-lian<sup>1</sup>, HE Shui-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. School of Crop Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The characteristics of *Rab11* cDNA and deduced amino acids sequence in pepper were analyzed, which would lay the foundation for further investigation of the function of *Rab11* protein. One 1 164 bp full-length cDNA clone was isolated from a pepper normalized cDNA library, which encodes a putative protein composed of 217 amino acids. The full-length cDNA was named *CaRab11*. The amino acid sequence deduced by *CaRab11* cDNA showed high similarity to *VvRabA1f* protein from *Vitis vinifera*. *CaRab11* protein included conserved domains specific to Rab GTPase superfamily (RabSF), Rab subfamily specific regions (RabF, RabF1 - RabF5), five highly conserved GTP-binding consensus sequences (GDGSGVGS, T, DTAGQE, GNKADL, and ETSAL) involved in GTP/Mg<sup>++</sup> binding and GDP hydrolysis, two conformational switch (Switch I and II) regions as well as C-terminal cysteines motif important to prenylation. Amino acids similarity and phylogenetic analysis also indicated that *CaRab11* is a new member of small GTP-binding protein *Rab11* superfamily.

**Key words:** pepper; small G protein; gene clone; sequence analysis

收稿日期: 2012 - 05 - 15 修回日期: 2012 - 06 - 08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30600391、30971718)、高校博士点基金 (20093515110004) 和福建省自然科学基金项目 (2008J0049)

作者简介: 赖燕 (1984—), 女, 讲师, 博士, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究, E-mail: laiyan1010@126.com;

\* 通讯作者: 何水林, 教授, 博士, E-mail: shlhe2007@yahoo.com.cn。

Rab 家族蛋白作为小分子 GTP 酶超家族成员中最大的亚家族,其家族不同成员在膜泡运输过程中起重要的调节作用<sup>[1-2]</sup>。Rab 蛋白 C 端具有该家族成员特有的、与膜定位相关的典型的异戊二烯结构基序(CCxxx, CCxx, xCCx, xxCC 或 xCxC)<sup>[3]</sup>。通常认为 Rab 蛋白通过参与内膜系统囊泡运输、内吞作用、膜循环等过程维持细胞正常功能<sup>[4-5]</sup>。Bischoff 等<sup>[6]</sup>根据序列同源性将 Rab 蛋白分为 8 个亚家族(Rab1、Rab2、Rab5、Rab6、Rab7、Rab8、Rab11 和 Rab18)。其中, Rab11 参与了内吞作用的再循环内体阶段<sup>[7]</sup>,并介导了受体蛋白在核内体、高尔基体及质膜间的转运过程<sup>[8-10]</sup>。前人研究<sup>[11]</sup>表明,番茄 Rab11 参与了果实的催熟过程,反义 Rab11 基因的表达使得番茄果实表现出生长的异常和软化的延迟。在烟草中 Rab11 蛋白介导的内膜系统运输过程在调节花粉管正常的极性生长和花粉的活力具有重要作用<sup>[12]</sup>。此外, Rab11 蛋白还参与了光信号转导途径及油菜素内酯的生物合成过程<sup>[13-14]</sup>。当前, Rab11 蛋白结构和功能的研究主要集中在动物及拟南芥、烟草等模式植物中,在包括辣椒在内的非模式植物中鲜有报道。

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是一种重要的茄科蔬菜和工业原料作物,在我国其种植面积仅次于大白菜,但产值却最高<sup>[15]</sup>。对辣椒的一些重要调节基因的研究是有效开展辣椒遗传改良的重要基础。在辣椒中仅 3 个 Rab 小 G 蛋白被克隆,且仅有 1 个可能参与信号转导途径的 CaRab8 已见报道<sup>[16]</sup>,未见 Rab11 的相关报道。鉴于 Rab11 蛋白功能的重要性,本研究以辣椒为材料,在已建立的辣椒均一化 cDNA 文库的基础上,筛选获得辣椒 Rab11 基因的全长 cDNA,并对其编码的氨基酸结构特征进行分析,以期对辣椒 Rab11 功能和相关信号通路研究奠定基础,并为有效开展辣椒遗传改良提供可能的理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

辣椒均一化 cDNA 文库为本实验室构建,滴度为  $1.8 \times 10^6$  cfu/mL。辣椒材料为福建省地方品种 L11。

### 1.2 方 法

辣椒 CaPIP1 蛋白同源 EST 搜索、拼接及文库筛选引物的合成。以拟南芥 Rab11(AAO63302.1)氨基酸序列为探针序列,从 GenBank(www.ncbi.nlm.gov)中比对获得辣椒 EST 序列,通过 DNAMAN 进行重叠群分析,选取包含有 Rab11 蛋白保守域的共有序列,采用 PRIMER5 软件设计特异性引物:Ca Rab11F:5'-GTCTAAGTCCACCATCGG-3';Ca Rab11:5'-GAAGGCGTTCTCCACAT-3',扩增序列长度为 379 bp。

### 1.3 均一化 cDNA 文库的筛选

采用特异性引物对文库进行 PCR 检测,依据 Yim 等<sup>[17]</sup>的方法,基于 PCR 技术通过逐级稀释文库,从中获得目的基因阳性克隆。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。以通用引物委托上海英骏生物技术公司测序。

### 1.4 序 列 分 析

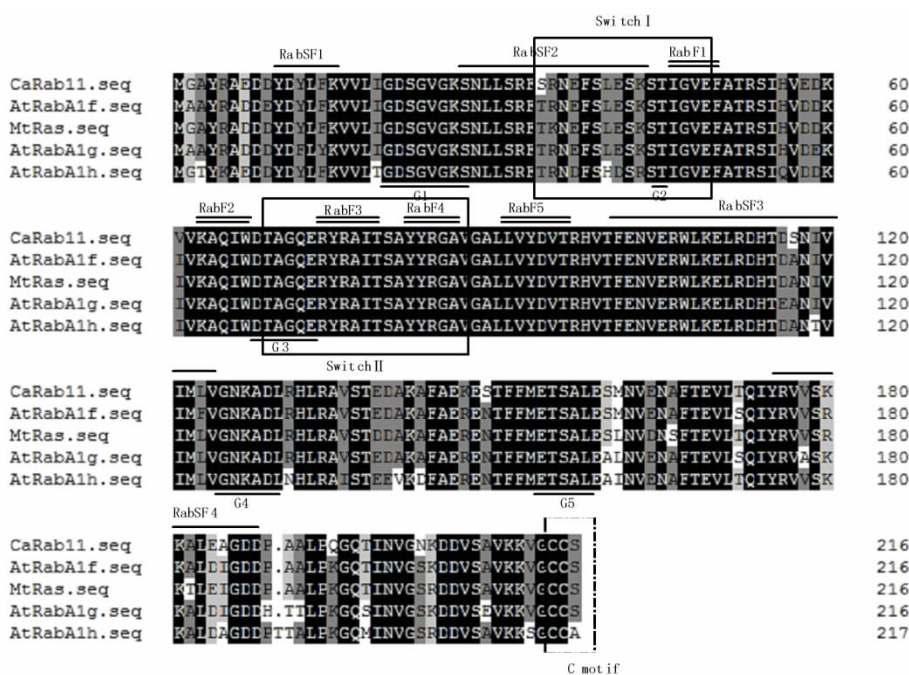
搜索 NCBI 蛋白数据库 Blastp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 CaRab11 进行氨基酸序列同源性分析;采用 DNAMAN 软件对基因序列及编码的蛋白质结构域进行分析;采用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的相对分子量和理论等电点;采用 Mega 5.01 软件对 CaRab11 和拟南芥、葡萄及烟草等其他物种的 Rab 小 G 蛋白氨基酸序列进行序列比对和分子进化树绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒 *CaRab11* 基因克隆及序列分析

本研究通过文库稀释池法筛选辣椒均一化 cDNA 文库,分离获得了一个辣椒 Rab 小 G 蛋白阳性克隆。测序结果表明该 cDNA 长度为 1 164 bp,包含有 651 bp 的完整开放阅读框,编码长度为 217 个氨基酸的蛋白(图 1),预测分子量(<http://www.bioinformatics.org/sms/>)为 24.12 ku。ProtParam 软件预测结果表明该蛋白的理论等电点为 5.48。该 cDNA 推导的氨基酸序列初步经 NCBI Blastp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对表明与拟南芥小 G 蛋白 RabA1f(Rab11)有较高的同源性,将该基因命名为 *CaRab11*。





上划线所示为 RabSF 模体 (RabSF1 - 4), 双上划线为 RabF 模体 (RabF1 - 5), 下划线部分为 G 模体 (G1 - 5), 方框所示为两个构象变构域 (Switch I 和 Switch II), 虚线方框为半胱氨酸模体。

The overline amino acids indicate RabSF motifs (RabSF1 - 4); The double overline amino acids represent RabF motifs (RabF1 - 5); The underline amino acids represent G - domains (G1 - 5); Boxes indicate two conformational switch (I and II) regions; The dotted line box indicate Cys - Cys motif (C motif).

图 2 CaRab11 蛋白氨基酸序列同源性分析

Fig. 2 Amino acids similarity analysis of CaRab11 protein

### 3 讨论

Rab11 在植物中一般以多基因家族的形式存在, 拟南芥 57 个 Rab 家族蛋白中有 26 个 Rab11 蛋白<sup>[18]</sup>, 除普遍认为在质膜受体再循环, 胞质分裂, 蛋白质分泌, 吞噬作用和信号转导中的作用外, 近年来在高等植物中也发现结构上高度保守的 Rab11 蛋白参与了植物生殖发育及信号转导的过程。本研究通过高效的文库稀释池法筛选辣椒均一化 cDNA 文库, 首次获得了一个长度为 1 164 bp 的 cDNA, 编码长度为 217 个氨基酸的辣椒 CaRab11 小 G 蛋白阳性克隆。该蛋白具有多个 Rab11

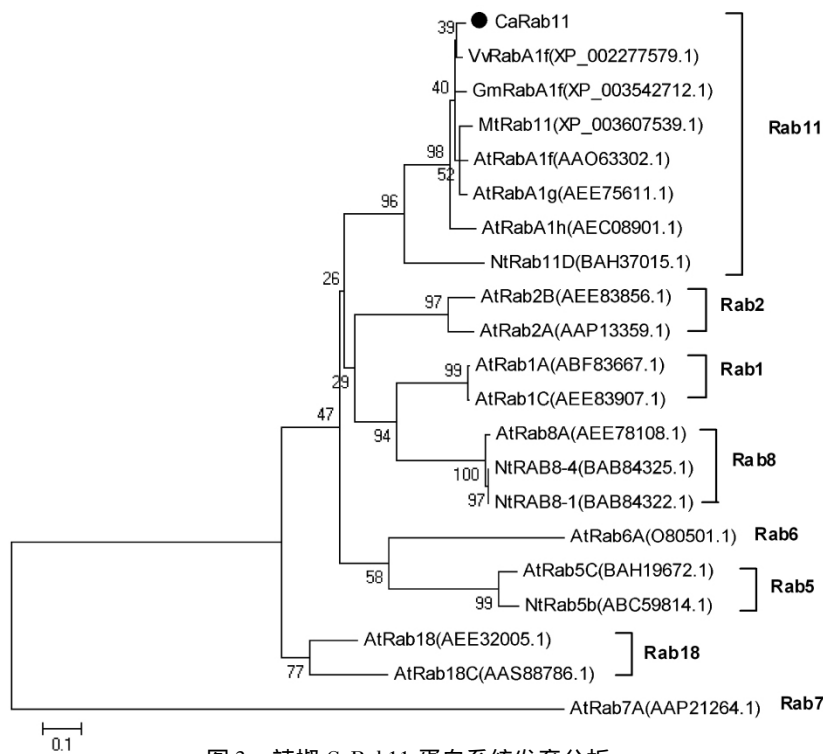


图 3 辣椒 CaRab11 蛋白系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of CaRab11 protein

家族蛋白的保守结构特征 (RabSF 模体, RabF 模体, 两个构象变构域及 G 结构域)。且 C 末端具有与 Rab 小 G 蛋白亚家族保守的异戊二烯化相关 CCX 序列, 推测该序列介导了 CaRab11 在辣椒中与特点膜

结构的结合过程。序列同源性及分子进化分析同样表明了 *CaRab11* 为新的辣椒 Rab11 类小 G 蛋白家族成员。

辣椒 Rab11 蛋白基因 *CaRab11* 的首次克隆对于研究非模式植物 Rab11 蛋白具有重要意义。鉴于该蛋白结构上的高度保守并且与包括双子叶、单子叶在内的植物 Rab11 蛋白( *VvRabA1f* ,*AtRabA1f* ,*GmRabA1f* ,*OsRab11* 等) 具有高度的同源性,推测 *CaRab11* 具有已知的 Rab11 蛋白家族共有的参与膜运输系统的功能,但是 *CaRab11* 在膜运输系统中的具体功能,及 *CaRab11* 在辣椒膜运输系统中的可能功能是否同样介导了植物生长发育或信号传递过程,甚至是否通过特点的信号传递过程参与辣椒逆境应答过程还有待于进一步的研究确认。

#### 参考文献:

- [1] Lazar T, Gotte M, Gallwitz D. Vesicular transport: how many Ypt/Rab - GTPases make a eukaryotic cell[J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22( 12 ): 468 - 472.
- [2] Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9( 4 ): 496 - 504.
- [3] Pereira - Leal J B, Seabra M C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily[J]. *J Mol Biol*, 2000, 301( 4 ): 1077 - 1087.
- [4] Molendijk A J, Ruperti B, Palme K. Small GTPases in vesicle trafficking[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7( 6 ): 694 - 700.
- [5] Surpin M, Raikhel N. Traffic jams affect plant development and signal transduction[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5( 2 ): 100 - 109.
- [6] Bischoff F, Molendijk A, Rajendrakumar C S, et al. GTP - binding proteins in plants[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55( 2 ): 233 - 256.
- [7] Stenmark H, Olkkonen V M. The Rab GTPase family[J]. *Genome Biol*, 2001, 2( 5 ): 3007.
- [8] Volpicelli L A, Lah J J, Fang G, et al. Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor[J]. *J Neurosci*, 2002, 22( 22 ): 9776 - 9784.
- [9] Schlierf B, Fey G H, Hauber J, et al. Rab11b is essential for recycling of transferrin to the plasma membrane[J]. *Exp Cell Res*, 2000, 259( 1 ): 257 - 265.
- [10] Wileke M, Johannes L, Galli T, et al. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans - golgi network[J]. *J Cell Biol*, 2000, 151( 6 ): 1207 - 1220.
- [11] Lu C, Zainal Z, Tucker G A, et al. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene[J]. *Plant Cell*, 2001, 13( 8 ): 1819 - 1833.
- [12] De Graaf B H, Cheung A Y, Andreyeva T, et al. Rab11 GTPase - regulated membrane trafficking is crucial for tip - focused pollen tube growth in tobacco[J]. *Plant Cell*, 2005, 17( 9 ): 2564 - 2579.
- [13] Nagano Y, Okada Y, Narita H, et al. Location of light - repressible, small GTP - binding protein of the YPT/rab family in the growing zone of etiolated pea stems[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92( 14 ): 6314 - 6318.
- [14] Kang J G, Yun J, Kim D H, et al. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark - induced small G protein in etiolated seedling growth[J]. *Cell*, 2001, 105( 5 ): 625 - 636.
- [15] 徐小万, 李颖, 王恒明. 中国辣椒工业的现状、发展趋势及对策[J]. *园艺园林科学*, 2008, 24( 11 ): 332 - 338.
- [16] 赖燕, 肖翔, 林菁, 等. 辣椒小 G 蛋白 *CaRab8* 基因全长 cDNA 的分离及表达特征的初步分析[J]. *热带作物学报*, 2011, 32( 6 ): 1111 - 1115.
- [17] Yim Y S, Moak P, Sanchez - Villeda H, et al. A BAC pooling strategy combined with PCR - based screenings in a large, highly repetitive genome enables integration of the maize genetic and physical maps[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 47.
- [18] Vernoud V, Horton A C, Yang Z, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis[J]. *Plant Physiol* 2003, 131( 3 ): 1191 - 1208.