

研究报告

Research Report

李 *Ran* 基因的克隆与生物信息学分析

方智振 周丹蓉 姜翠翠 廖汝玉 叶新福 *

福建省农业科学院果树研究所, 福州, 350013

* 通讯作者, yexinfu@126.com

摘 要 本研究以芙蓉李为材料, 采用同源克隆和 RACE 技术从芙蓉李叶片中分离得到 2 个李 *Ran* 基因 *PsRan1* 和 *PsRan3*, 长度分别为 984 bp 和 952 bp。生物信息学分析结果表明 *PsRan1* 和 *PsRan3* 均编码 221 个氨基酸。*PsRan1* 和 *PsRan3* 与其他物种的 Ran 蛋白具有很高的相似性, 均具有 Ran 蛋白的特征结构域, 包括与 GTP 结合与水解有关的结构域、C-末端酸性结构域和影响因子结合结构域。NetPhos 2.0 Server 预测结果表明二者具有 10 个相同的磷酸化位点。

关键词 李, Ran, 基因克隆, 生物信息学

Cloning and Bioinformatic Analysis of *Ran* Genes from *Prunus salicina* Lindl.

Fang Zhizhen Zhou Danrong Jiang Cuicui Liao Ruyu Ye Xinfu *

Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, 350013

* Corresponding author, yexinfu@126.com

DOI: 10.13271/j.mpb.012.000780

Abstract Using Furong plum as experimental material, 2 *PsRan* genes, *PsRan1* and *PsRan3*, were isolated through homologous cloning and RACE technology. *PsRan1* and *PsRan3* contained 984 bp and 952 bp in length respectively. Sequence analysis indicated that both *PsRan1* and *PsRan3* encode 221 amino acids. *PsRan1* and *PsRan3* showed high similarity with Ran proteins from other plants and contained characteristic domains of Ran proteins, including domains involved in GTP-binding and hydrolysis, as well as the acidic C-terminal domain and the effector-binding domain. Prediction of phosphorylation sites in these peptides using the NetPhos 2.0 server showed both of these *PsRan* proteins contained 10 identical phosphorylation sites.

Keywords Plum, Ran, Gene cloning, Bioinformatics

Ran (Ras-like nuclear GTPase)是一类在真核生物中高度保守的小 GTP 水解酶,在核质运输、纺锤体和核膜形成等细胞过程中扮演着重要角色(Hetzer et al., 2002; Weis, 2003; Di Fiore et al., 2004; Ciciarello et al., 2007; Clarke and Zhang, 2008; Meier and Somers, 2011)。目前,关于动物 Ran 的功能与作用机制的研究开展较多,而关于植物 Ran 的功能与作用机制的研究较少。有研究表明植物和动物 Ran 的序

列上高度同源(Zang et al., 2010; Lü et al., 2011),且超表达植物 Ran 可使细胞周期缺陷型酵母突变体正常生长(Wang et al., 2004)。以上研究结果表明植物的功能可能与动物 Ran 相似。Yano 等(2006)发现 AtRAN3 在拟南芥细胞周期进程中的时空分布模式与动物 Ran 蛋白的研究结果一致,表明植物 Ran 与细胞分裂有关,且其作用与动物 Ran 相似。多项研究表明 Ran 与植物对激素和环境信号的响应有关(Fer-

收稿日期 2013-09-18

接受日期 2014-02-10

网络出版日期 2014-03-05

URL: <http://www.biopublisher.cn/index.php/mpbopa/article/view/1772>

基金项目:本研究由福建省农业科学院青年科技人才创新基金项目(2012DBS-6)、福建省公益类科研院所专项(2011R1016-2)、福建省财政专项 - 福建省农业科学院科技创新团队建设项目(CXTD2011-19; CXTD-1316)、农业部公益性行业(农业)科研专项(201003058-8)和农业部热带作物种质资源保护项目(13RZZY-40)共同资助

reira et al., 2006; Kriegs et al., 2006; Miche et al., 2006; Wang et al., 2006; Jiang et al., 2007; Lee et al., 2008; Xu and Huang, 2008; 2010; Yoshimura et al., 2008; Chen et al., 2011; Mahong et al., 2012)。超表达 *OsRAN2* 可通过改变调控蛋白的运输,影响水稻对渗透胁迫和 ABA 的敏感性(Zang et al., 2010)。因此,植物进入与打破休眠,必然与 *Ran* 的表达调控密切相关。研究表明超表达 *OsRAN2* 的转基因水稻细胞植株在低温胁迫条件下可维持活跃的细胞分裂,显著提高植株的抗寒性(Chen et al., 2011)。Frankard 等(2012)研究表明调控 *Ran* 结合蛋白 *RanBP* 的表达可提高植物产量。综上所述,*Ran* 在植物生长发育过程中发挥着重要作用。

李(*Prunus salicina* Lindl.)是一种在世界各地广泛栽培的果树。李的果实美味多汁,营养丰富,是优良的鲜食水果,还可以用于食品加工。李的花和果均具有很高的观赏价值,是绿化环境的优良树种。此外,李的果实还具有很高的药用价值(Lee et al., 2009; Johnson et al., 2011)。目前,不同成熟期的李品种较少,品种配置不科学,成熟期较为集中,产销矛盾突出,严重影响了李产业的健康发展(孙猛等, 2009; 张静茹, 2013, 果树实用技术与信息, (6): 7)。培育不同成熟期的李品种,科学配置品种结构对李产业的持续健康发展具有重要意义。研究表明超表达小麦 *Ran1* 可显著推迟水稻和拟南芥开花时间,通过 RNAi 抑制 *Ran* 的表达则可使水稻和拟南芥提前开花(王昕, 2004)。因此 *Ran* 可能与植物花期调控有关。李需要通过低温积累打破休眠,才能正常开花(陈杰忠, 2003),低温积累不足将导致李延迟开花或开花异常,降低产量。植物芽休眠的重要标志之一是细胞分裂停止,而 *Ran* 与细胞分裂密切相关(Wang et al., 2006)。此外,植物休眠的开始与结束均是通过感受外界环境的信号,进而改变细胞的基因表达谱来实现(Schrader et al., 2004)。*Ran* 是控制细胞质核物质运输的一个重要枢纽,因此 *Ran* 必然参与植物休眠的调控。

本研究中根据 NCBI 数据库中的植物 *Ran* 基因序列,以李叶片为材料,克隆李 *Ran* 基因,并对所获得的基因进行了生物信息学分析,旨在为阐明李 *Ran* 的功能及其作用机制奠定分子基础,为李新品种培育、调节产期和阐明李休眠调控机制提供参考。

1 结果与分析

1.1 李 *Ran* 基因的 cDNA 全长序列的克隆及序列分析

以李叶片总 RNA 的反转录产物为模板, Rf3/Rr2

为引物进行扩增,得到一条长度为 323 bp 的片段(片段 1)(图 1A)。以 R3-2/AUAP 和 R3-3/AUAP 为引物进行巢式 PCR 扩增,得到 2 条长度分别为 562 bp (3' 片段 1)和 495 bp (3' 片段 2)的 3' 末端序列。以 AUAP/R5-2 和 AUAP/R5-1 为引物进行巢式 PCR 扩增,得到一条长度为 265 bp 的 5' 末端序列(5' 片段)。将获得的片段 1、3' 片段 1 和 5' 片段 3 条片段经 DNAMAN 拼接,得到一条长度为 984 bp 的李叶片 *Ran* 全长 cDNA 序列,通过巢式 PCR 扩增得到一个长为 776 bp 的片段(图 1C),将该片段与 3' 片段 2 得到一个长为 952 bp 的片段,命名为 *PsRan1* (GenBank 登记号: KF642609)。*PsRan1* 和 *PsRan3* 均含有 666 bp 的开放阅读框,编码 221 个氨基酸(图 2)。采用 PeptideMass 进行分析,预测结果显示 *PsRan1* 相对分子量为 25.114 kD,等电点(pI)为 6.44,*PsRan3* 相对分子量为 25.172 kD,等电点(pI)为 6.44。

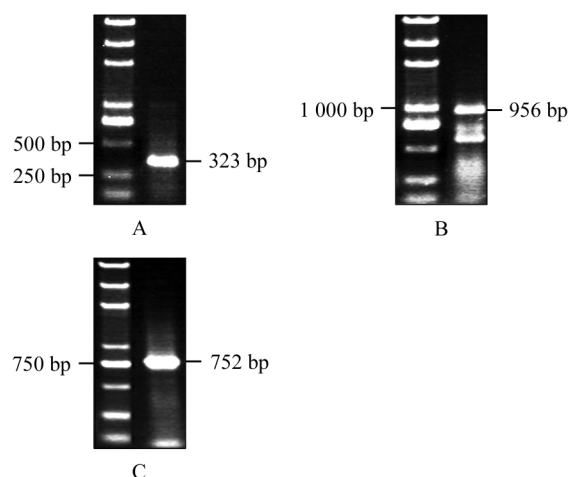


图 1 李 *PsRan* 的 PCR 扩增结果

Figure 1 The amplification results of *PsRan*

1.2 李 *Ran* 基因的 cDNA 全长序列的生物信息学分析

在 NCBI 数据库中进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析,结果表明 *PsRan1* 和 *PsRan3* 编码的蛋白均与葡萄、龙眼、拟南芥、向日葵、大豆、毛果杨、鹰嘴豆、苜蓿和蓖麻等植物的 *Ran* 蛋白具有很高的相似性。采用 DNAMAN6 对 *PsRan1* 和 *PsRan3* 与其他植物 *RAN* 氨基酸序列进行多重比对分析,结果表明 *PsRan1* 和 *PsRan3* 均具有与 GTP 结合与水解有关的结构域, C-末端酸性结构域和效应因子结合结构域等 *Ran* 蛋白的特征结构域(图 3)。从图 3 中可以看出,除了 *AtRan4* 外,这些结构域在不同物种的 *Ran* 蛋白间高度保守。采用临位相邻法对 *PsRan1* 和 *PsRan3* 与其他植物的 *Ran* 蛋白进行亲缘

1 : AAGTAGCCGCTCTTCTCCTTGCGTCTCTGTCACTCTGCTGCTCTTAGATTCTCTCCCCACTCACTACCTTGAACCCA
77 : **ATG**GCTTTGCCAAACCAACAGACTGTTGATTATCCAAGCTTTAAGCTTGTGCATCGTCGGCGATGGAGGCACTGGAAAAACCACT
1 : M A L P N Q Q T V D Y P S F K L V I V G D G G T G K T T
161 : TTTGTGAAGAGGCATCTCACTGGAAGAGTTTGAGAAGAAATATGAACCAACCATTGGTGTGGAGGTTTCATCCTTTGGAATTTCTTC
29 : F V K R H L T G E F E K K Y E P T I I G V E V H P L D F F
245 : ACAAATTCGGGAAGAGTCCGCTTTTACTGCTGGGATACGTCTGGGCAAGAGAAGTTTGGTGGTCTTCGGGATGGCTACTATATT
57 : T N C G K I R F Y C W D T A G Q E K F G G L R D G Y Y I
329 : CACGGGAATGTGCAATCATTATGTTTGACGTCACAGCTAGGTTGACATACAAGAATGTTCTCATATGGCACCGTGATCTCTGT
85 : H G Q C A I I M F D V T A R L T Y K N V P T W H R D L C
413 : CGGGTCGTGTGAGAACATTCCTCATTGTTCTCTGTGGAAACAAGGTTGATGTGAAGAACAGGCAGGTTAAAGCCAAGCAGGTTACC
113 : R V C E N I P I V L C G N K V D V K N R Q V K A K Q V T
497 : TTCCACAGGAAGAAGAACTTGCAATACTATGAAATATCGGCGAAGAGCAACTACAATTTTGAGAAGCPTTCTCTACCTGGGT
141 : F H R K K N L Q Y Y E I S A K S N Y N F E A K P F L Y L A
581 : AGGAAGCTTGCAGGTGACACAAATCTTCATTTCTGTTGAGTCTCTCTGCCCTTGCTCCTCCAGAAGTACACATTGACTTGGCTGCT
169 : R K L A G D T N L H F V E S P A L A P P E V H I D L A A
665 : CAACAACAGCATGAAGCGGAGCTTGACAGGCAGCCAATCAGCCTCTTCCGGATGACGATGATGATGCATTTGAGTAGAGGGCT
197 : Q Q Q H E A E L A Q A A N Q P L P D D D D D A F E *
749 : TTAATTACTCCGCTAGGATGGTTTTCTGTTACGCCCTTTATTTCTATTTAGGCGTTATCATTGGTAGTTGTCTCGGAAATGTTGAC
833 : AATATATTGGAGGATTTGATTTTCGGAATGTTATATAACAATGACTGTATTTAGCGGATTTAAATTCAGCTAATATGATCTA
917 : TTGATTATCAATGGTTGTGAAAAAATGAAAAA

A

```

1      :                               ACTCGTTTGTCTCTCTGCGCCACTCACATTAGCAAGACTCAA
42     :   ATGGCTTTGCCGAATCAGCAGACCGTGGATTACCCGAGCTTCAAGCTCGTAATCGTTGGCGATGGTGGAAACAGGAAAACTACC
1      :   M A L P N Q Q T V D Y P S F K L V I V G D G G T G K T T
126    :   TTTGTGAAGAGACATCTTACTGGTGAATTGAGAAGAAATACGAACCACTATTGGCGTGGAGGTCCATCCATTGGACTTTTTTC
29     :   F V K R H L T G E F E K K Y E P T I G V E V H P L D F F
210    :   ACCAATCTGGGAAAAATTAGATTCTATTGCTGGGACACAGCCGGGCAAGAGAAATTTGGTGGTCTTAGAGATGGATACTACATC
57     :   T N C G K I R F Y C W D T A G Q E K F G G L R D G G Y Y I
294    :   CATGGACAATGTGCAATTATCATGTTTGATGTTACTGCTCGATTGACATACAAGAATGTTCCAACCTTGGCATCGGGATCTTTGC
85     :   H G Q C A I I M F D V T A R L T Y K N V P T W H R D L C
378    :   AGGGTCTGTGAGAACATTCGAATTGTTCTTTGTGGAATAAGGTTGATGTGAAGAACAGGCAGGTCAAGGCCAAGCAGGTTACT
113    :   R V C E N I P I V L C G N K V D V K N R Q V K A K Q V T
462    :   TTCCACAGGAAGAAGAATCTGCAGTACTATGAGATATCAGCAAGAGCAACTATAACTTTGAGAAGCCTTTTCTATACCTTTGCC
141    :   F H R K K N L Q Y Y E I S A K S N Y N F E K P F L Y L A
546    :   AGAAAGCTTGCTGGGGATCCTAAITTTGTCATTTTGTAGTCACTCGCTTGGCTTCTCCAGAAGTACACATTGATCTGGTGCA
169    :   R K L A G D P N L H F V E S P A L A P P E V H I D L A A
630    :   CAACAACAGCAGCAAGCCGAGCTCGCTGCAGCTGCCAGCCAGCCCCCTTCTGATGATGACGATGACACATTCGAGTAGATGTGG
197    :   Q Q Q H E A E L A A A A S Q P L P D D D D D T F E *
714    :   GGAATTGTTGTCTTGGTGAAAGTTTTCGTTATTAATATTTGTGGGTCTTGGACCATTITTTTCTAAGAAAACTTGTGGTATTGC
798    :   TGTTTGTAAAGTGATAATTTTCGTGGTCATGAGGATGTGAATTTGAGGATGCCATGTTTTCATGTATGATTTTATGTTGAATTGG
882    :   CTCCTTATCAGCCCTTTTCCCATTTCTTGTCCAGTCCATTATATGTGATGCCGTTAATTCTATTGCGCTATTAGTATTTTAGC
966    :   AAAAAAATAAAAAAAAAA

```

B

图 2 *PsRan1* 和 *PsRan3* 的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

注: A: *PsRan1*; B: *PsRan3*

Figure 2 Sequence and deduced amino acid sequence of *PsRan1* and *PsRan3*

Note: A: *PsRan1*; B: *PsRan3*

关系分析,发现 PsRan1 与 SIRAN1 和 SIRAN2 聚为一类,PsRan3 单独聚为一类与 GmRan3 的亲缘关系较近(图 4)。

蛋白质磷酸化作为一种蛋白质修饰的重要方式广泛存在于生物体内,通过参与各种细胞过程调控发挥作用。蛋白质磷酸化通过对蛋白质进行修饰改变蛋白质的结构、稳定性、活性以及亚细胞定位,进而影响细胞活动。采用 NetPhos 2.0 Server 对 PsRan1 和 PsRan3 的潜在磷酸化位点进行预测。结果表明 2 个李 Ran 蛋白均含有 10 个相同的潜在磷酸化位点,

分别为 2 个丝氨酸(13 和 156 位) 4 个苏氨酸(35, 45, 96 和 100 位) 4 个酪氨酸(42, 82, 83 和 101 位)。

2 讨论

Ran 蛋白最早因参与细胞核质运输而被从非洲爪蟾中纯化并鉴定(Moore and Blobel, 1993)。目前 *Ran* 的研究以其在动物中的功能为主,关于植物 *Ran* 的研究报道较少。研究人员已从番茄、蚕豆、小麦、洋葱、大蒜、油菜、水稻、高羊茅和龙眼等植物中分离得到 *Ran* 基因(Ach and Gruissem, 1994; Saalbach and

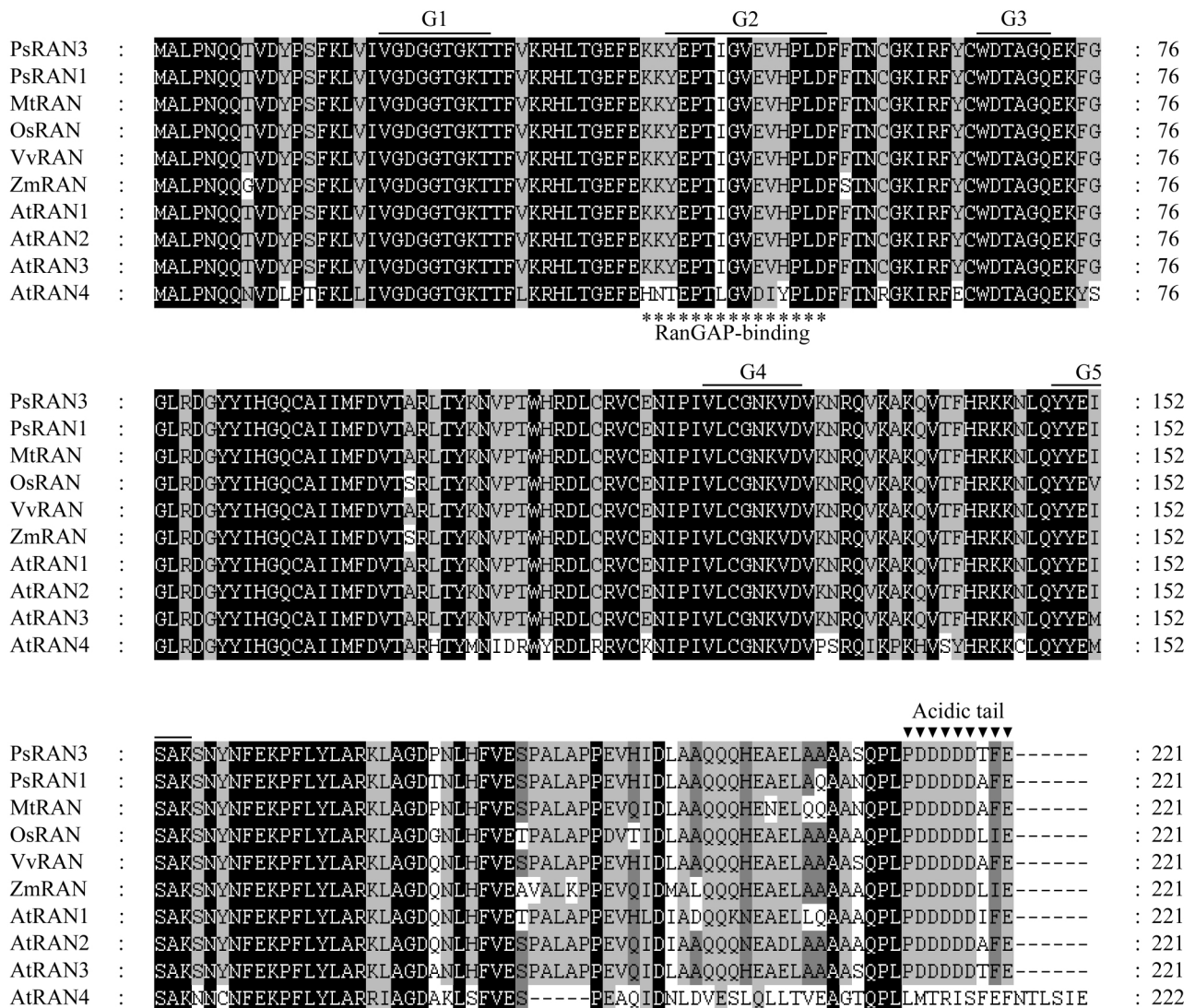


图3 推导的 PsRAN 与其他植物 RAN 氨基酸序列的多重比对

注: 拟南芥(*AtRAN1*, NP_197501; *AtRAN2*, NP_197502; *AtRAN3*, NP_200330; *AtRAN4*, NP_200319), 苜蓿(*MtRAN*, ACJ83982), 玉米(*ZmRAN*, NP_001149221), 葡萄(*VvRAN*, XP_002284967), 洋葱(*AsRAN2*, ABD17864)和水稻(*OsRAN*, NP_001043550); 比对序列间相同和相似的氨基酸残基分别用黑色、灰色和浅灰色标出; 保守的 GTP 结合与水解结构域(G1~G5)用横线标出; 效应因子结合结构域(RanGAP 结合)和酸性 C 端区域(酸性尾)分别用星号和三角形标出

Figure 3 Multiple alignments of the deduced PsRAN sequences with other RAN sequences

Note: *Arabidopsis thaliana* (*AtRAN1*, NP_197501; *AtRAN2*, NP_197502; *AtRAN3*, NP_200330; *AtRAN4*, NP_200319), *Medicago truncatula* (*MtRAN*, ACJ83982), *Zea mays* (*ZmRAN*, NP_001149221), *Vitis vinifera* (*VvRAN*, XP_002284967), *Allium cepa* (*AsRAN2*, ABD17864) and *Oryza sativa* (*OsRAN*, NP_001043550); Identical and similar amino acid residues among the aligned sequences are indicated by Black, grey and light gray shading, respectively; Conserved GTP binding and hydrolysis domains (G1~G5) were indicated by lines; The effector-binding domain (RanGAP-binding) and the acidic C-terminal region (acidic tail) are indicated with asterisks and triangles, respectively

Christov, 1994; Wang et al., 2004; 马立安和张忠明, 2009; Lü et al., 2011; 方智振, 2012)。其中, 拟南芥基因组含有 4 个 *Ran* 基因(*AtRan1*, *AtRan2*, *AtRan3* 和 *AtRan4*), 其中 *AtRan1*、*AtRan2* 和 *AtRan3* 的序列高度同源, 而 *AtRan4* 与其他 *AtRan* 的序列相似性仅为 65% (Vernoud et al., 2003)。AtRAN4 缺乏 RanGAP

的结合位点, 为植物特异性的 Ran 蛋白(Haizel et al., 1997), 但目前尚未见 *AtRan4* 基因的相关报道。本研究从芙蓉李叶片中分离得到 2 条 *PsRan* 的 cDNA 序列, 分别编码不同的蛋白。不同植物 Ran 蛋白之间的相似性和亲缘关系进行分析结果表明, 李 Ran 蛋白与他植物 Ran 高度同源, 且二者均具有 Ran 蛋白的

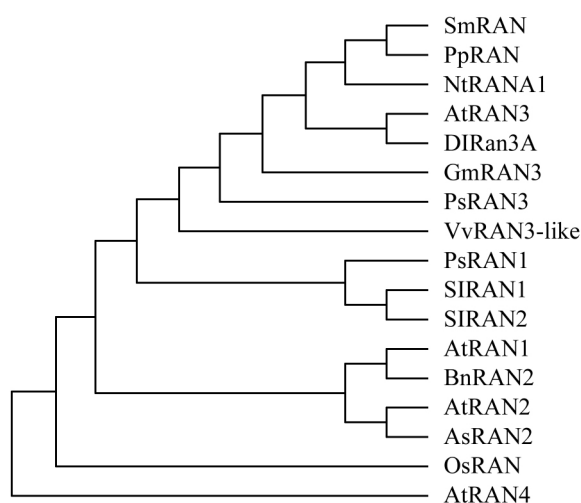


图4 李与其他植物的RAN蛋白系统发育关系分析

注: 拟南芥(*AtRAN1*, NP_197501, *AtRAN2*, NP_197502, *AtRAN3*, NP_200330); 葡萄(*VvRAN3-like*, XP_002285018), 高粱(*GmRAN3-like*, XP_003526422); 番茄(*SIRAN1*, NP_001234016, *SIRAN2*, NP_001234023); 洋葱(*AsRAN2*, ABD17865); 江南卷柏(*SmRAN*, XP_002972496); 小立碗藓(*PpRAN*, XP_001779455); 烟草(*RAN1*, P41918); 欧洲油菜(*RAN2*, ABD17866); 水稻(*OsRAN*, NP_001043550)

Figure 4 Phylogenetic relationships of RAN proteins from *Prunus salicina* and selected plant species

Note: *Arabidopsis thaliana* (*AtRAN1*, NP_197501, *AtRAN2*, NP_197502, *AtRAN3*, NP_200330); *Vitis vinifera* (*VvRAN3-like*, XP_002285018); *Glycine max* (*GmRAN3-like*, XP_003526422); *Solanum lycopersicum* (*SIRAN1*, NP_001234016, *SIRAN2*, NP_001234023); *Allium sativum* (*AsRAN2*, ABD17865); *Selaginella moellendorffii* (*SmRAN*, XP_002972496); *Physcomitrella patens* subsp. *patens* (*PpRAN*, XP_001779455); *Nicotiana tabacum* (*RAN1*, P41918); *Brassica napus* (*RAN2*, ABD17866); *Oryza sativa* Japonica Group (*OsRAN*, NP_001043550)

特征结构域(Ma et al., 2007)。本研究的结果进一步证明植物 Ran 蛋白高度保守。同时, 该结果还表明李 Ran 蛋白与其他植物的 Ran 蛋白具有相似的功能。2 个李 Ran 蛋白在氨基酸序列上存在的差异较小, 与拟南芥 RAN 蛋白(*AtRAN1*, *AtRAN2* 和 *AtRAN3*)之间的差异相似, 仅个别氨基酸位点存在差异。方智振(2012)从龙眼体胚中分离到了多个 *DLRan* 基因, 这些基因编码的蛋白之间的差异与 2 个李 Ran 蛋白的差异相似。这些位点的差异是否与李 Ran 蛋白的具体功能有关? 对植物 Ran 蛋白不同成员的功能比较分析尚未见报道, 2 个李 Ran 蛋白的功能还需通过基因超表达与基因敲除试验进一步研究。

Falchi 等(2010)对桃发育和成熟过程中小 G 蛋白的表达情况进行研究, 发现 *Ran* 基因的表达模式

可能受气候条件影响。Chen 等(2011)分析了不同胁迫下水稻 *OsRAN2* 的表达模式, 发现与盐胁迫和干旱胁迫相比, 低温可显著影响 *OsRAN2* 的表达。Paul 和 Kumar (2011)研究发现低温可导致茶叶休眠组织和旺盛生长的组织中 *CsRan2* 表达量上升, 而室温条件下休眠组织中 *CsRan2* 表达量下降。Li 等(2007)发现低磷处理可提高玉米根系中 Ran B1 蛋白的丰度。Jiang 等(2007)用 150 mmol/L NaCl 处理 48 h 后, 发现拟南芥根系中 Ran-1 蛋白的丰度显著提高, 表明 Ran 可能在盐胁迫条件下发挥着特殊的作用。Yoshimura 等(2008)分析了野生西瓜响应干旱胁迫的根系蛋白质组变化情况, 发现两个 Ran 蛋白的表达量受干旱诱导。Zhai 等(2013)分析了长期积水对玉米冠根 miRNA 的表达谱, 发现作用于 Ran 的 miRNA 的表达发生了显著的变化。Lee 等(2008)研究表明, 不同光源可通过光敏色素介导信号转导途径调控拟南芥 *Ran* 基因的表达。Mahong 等(2012)分析了短时间强光胁迫对单细胞真核藻类(*Chlamydomonas reinhardtii*)的影响, 发现强光胁迫可导致 Ran 蛋白表达量下调。Wang 等(2006)研究发现超表达 *TaRAN1* 的水稻和拟南芥植株对生长素的敏感性显著提高, 表明 *TaRAN1* 可能与胁迫响应机制有关。以上研究均表明 *Ran* 与植物胁迫响应有关, 由此可见, Ran 蛋白在植物胁迫响应过程中发挥着重要的作用。李 Ran 基因在胁迫响应过程中的作用机制, 也是进一步研究的重点。

3 材料与方法

3.1 材料

以古田芙蓉李幼嫩的叶片为材料, 样品取自福建省农业科学院果树研究所李种质资源圃。叶片采集后立即用液氮冰冻, 然后转移至 -80℃ 冰箱中保存备用。

3.2 方法

3.2.1 李叶片总 RNA 的提取及 cDNA 合成

采用天泽柱式植物 RNAout 2.0 试剂盒(北京天恩泽)进行李叶片总 RNA 的提取, 详细步骤参见说明书; 总 RNA 的质量根据紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳分析结果进行确定, 取符合试验要求的总 RNA 用于后续研究。采用 Fermentas 公司的第一链 cDNA 合成试剂盒和 Invitrogen 公司的 SuperScript™ Reverse Transcriptase 进行 cDNA 合成, 具体方法

参照说明书。

3.2.2 引物设计

根据GenBank 上的其他植物的 *Ran* 序列,设计简并引物,用于李 *Ran* cDNA 片段的扩增,并根据获得的 cDNA 片段设计引物,用于李 *Ran* 基因 cDNA 的 3' 和 5' 末端序列的扩增。对获得的片段进行拼接,并根据拼接结果设计引物,进行拼接结果的验证。引物合成委托北京六合华大基因科技股份有限公司完成。本研究中所用到的引物清单(表 1)。

表 1 李 *Ran* 基因克隆引物列表

Table 1 Primers used for cloning of *Ran* genes from plum

名称	引物序列(5'-3')
Name	Primer sequence (5'-3')
Rf-3	GARCCTACHATTGGTGTNGARGTTC
Rr-2	GAAAGGCTTCTCRAAGTTGTARTT
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
R3-2	GTCTGTGAGAACATTCCAATTGTTCT
R3-3	GATGTGAAGAACAGGCAGGTCAAG
R5-1	CGGCTGTGTCCCAGCAATAGAATCT
R5-2	CAATCGAGCAGTAACATCAAACATG
Rf-6	ACTCGTTTGCTCTCTGCGCCACTC
Rr-4	CTAATAGGCGAATAGAATTAACGGC
Rr-8	CATATTAGCTGAATTTAAATCCGCCT
Rr-18	ACGAAAACCATCCTAGCGGAG

3.2.3 李 *Ran* 基因片段的回收、克隆和测序

采用琼脂糖凝胶(1.0%)电泳对 PCR 扩增产物进行检测,采用 Biomega 凝胶回收试剂盒进行目的片段的回收,采用 Takara 公司的 pMD18-T Vector 进行李 *Ran* 基因目的片段的克隆。筛选阳性克隆子委托上海博尚生物技术有限公司完成测序。

3.2.4 李 *Ran* 基因序列的分析

李 *Ran* 基因序列的分析采用 NCBI 的 Blast 和 DNAMAN 6.0 软件对进行分析。采用 PeptideMass 软件进行李 *Ran* 蛋白分子量和等电点的计算(<http://us.expasy.org/tools/peptidemass.html>)。采用 MEGA5 进行 *Ran* 分子进化树的构建。采用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行磷酸化位点预测。

作者贡献

方智振是本研究的实验设计和实验研究的执行人,周丹蓉完成数据分析,姜翠翠和廖汝玉参与实验

设计,试验结果分析,叶新福是项目的构思者和负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改,全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由福建省农业科学院青年科技人才创新基金项目(2012DBS-6)、福建省公益类科研院所专项(2011R1016-2)、福建省财政专项 - 福建省农业科学院科技创新团队建设项目(CXTD2011-19; CXTD-1316)、农业部公益性行业(农业)科研专项(201003058-8)和农业部热带作物种质资源保护项目(13RZZY-40)共同资助。

参考文献

- Ach R.A., and Gruissem W., 1994, A small nuclear GTP-binding protein from tomato suppresses a *Schizosaccharomyces pombe* cell-cycle mutant, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 (13): 5863-5867
- Chen J.Z., ed., 2003, Fruit growing of particular species, 3rd Edition, China Agriculture Press, Beijing, China, pp.340-341 (陈杰忠, 主编, 2003, 果树栽培学各论(第 3 版), 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.340-341)
- Chen N., Xu Y., Wang X., Du C., Du J., Yuan M., Xu Z., and Chong K., 2011, *OsRAN2*, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress, Plant Cell Environ., 34(1): 52-64
- Ciciarello M., Mangiacasale R., and Lavia P., 2007, Spatial control of mitosis by the GTPase Ran, Cell Mol. Life Sci., 64 (15): 1891-1914
- Clarke P.R., and Zhang C., 2008, Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 9 (6): 464-477
- Di Fiore B., Ciciarello M., and Lavia P., 2004, Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time, Cell Cycle, 3(3): 305-313
- Falchi R., Cipriani G., Marrazzo T., Nonis A., Vizzotto G., and Ruperti B., 2010, Identification and differential expression dynamics of peach small GTPases encoding genes during fruit development and ripening, J. Exp. Bot., 61(10): 2829-2842
- Fang Z.Z., 2012, Studis on proteomics during the middle stage of somatic embryogenesis and the expression and regulation of Ran family genes during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour., Dissertation for Ph.D., Fujian Agriculture and Forestry University, Supervisor: Lai Z.X., pp.50-51

- (方智振, 2012, 龙眼体胚发生中期的蛋白质组学及 Ran 家族表达调控研究, 博士学位论文, 福建农林大学, 导师: 赖钟雄, pp.50-51)
- Ferreira S., Hjerno K., Larsen M., Wingsle G., Larsen P., Fey S., Roepstorff P., and Pais M.S., 2006, Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress, *Ann. Bot.*, 98(2): 361-377
- Frankard V., Mironov V., and Reuzeau C., 2012, Plants with modulated expression of RAN binding protein (RANB) having enhanced yield-related traits and a method for making the same, European Patent, EP2423317
- Haizel T., Merkle T., Pay A., Fejes E., and Nagy F., 1997, Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 11(1): 93-103
- Hetzer M., Gruss O.J., and Mattaj I.W., 2002, The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly, *Nat. Cell Biol.*, 4(7): E177-E184
- Jiang Y., Yang B., Harris N.S., and Deyholos M.K., 2007, Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots, *J. Exp. Bot.*, 58(13): 3591-3607
- Johnson C.D., Lucas E.A., Hooshmand S., Campbell S., Akhter M.P., and Arjmandi B.H., 2011, Addition of fructooligosaccharides and dried plum to soy-based diets reverses bone loss in the ovariectomized rat, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 8(1): 1-7
- Kriegs B., Theisen R., and Schnabl H., 2006, Inositol 1,4,5-trisphosphate and Ran expression during simulated and real microgravity, *Protoplasma*, 229(2-4): 163-174
- Lee S.H., Lillehoj H.S., Cho S.M., Chun H.K., Park H.J., Lim C. I., and Lillehoj E.P., 2009, Immunostimulatory effects of oriental plum (*Prunus salicina* Lindl.), *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 32(5): 407-417
- Lee Y., Kim M.H., Kim S.K., and Kim S.H., 2008, Phytochrome-mediated differential gene expression of plant Ran/TC4 small G-proteins, *Planta*, 228(1): 215-224
- Li K., Xu C., Zhang K., Yang A., and Zhang J., 2007, Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants, *Proteomics*, 7(9): 1501-1512
- Lü S.H., Fan Y.L., and Jin C.X., 2011, Overexpression of a Ran GTPase homologous gene, *FaRan* from tall fescue, in transgenic *Arabidopsis*, *Biol. Plantarum*, 55(2): 331-334
- Ma L., Hong Z.L., and Zhang Z.M., 2007, Perinuclear and nuclear envelope localizations of *Arabidopsis* Ran proteins, *Plant Cell Reports*, 26(8): 1373-1382
- Ma L.A., and Zhang Z.M., 2009, Cloning and sequence analysis of three plant *Ran* genes, *Anhui Nongye Kexue* (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 37(34): 17281-17283 (马立安, 张忠明, 2009, 3种植物 Ran 基因的克隆及序列分析, *安徽农业科学*, 37(34): 17281-17283)
- Mahong B., Roytrakul S., Phaonaklop N., Wongratana J., and Yokthongwattana K., 2012, Proteomic analysis of a model unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, during short-term exposure to irradiance stress reveals significant down regulation of several heat-shock proteins, *Planta*, 235(3): 499-511
- Meier I., and Somers D.E., 2011, Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14(5): 538-546
- Miche L., Battistoni F., Gemmer S., Belghazi M., and Reinhold-Hurek B., 2006, Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp., *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19(5): 502-511
- Moore M.S., and Blobel G., 1993, The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus, *Nature*, 365(6447): 661-663
- Paul A., and Kumar S., 2011, Responses to winter dormancy, temperature, and plant hormones share gene networks, *Funct. Integr. Genomic.*, 11(4): 659-664
- Saalbach G., and Christov V., 1994, Sequence of a plant cDNA from *Vicia faba* encoding a novel Ran-related GTP-binding protein, *Plant Mol. Biol.*, 24(6): 969-972
- Schrader J., Moyle R., Bhalerao R., Hertzberg M., Lundberg J., Nilsson P., and Bhalerao R.P., 2004, Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome, *Plant J.*, 40(2): 173-187
- Sun M., Liu W.S., Liu N., Yu X.H., Zhang Y.P., Xu M., and Zhang Q.P., 2009, Overview of overseas and domestic research advances in plum breeding, *Beifang Guoshu* (Northern Fruits), (6): 1-3 (孙猛, 刘威生, 刘宁, 郁香荷, 张玉萍, 徐铭, 章秋平, 2009, 国内外李育种研究概述, *北方果树*, (6): 1-3)
- Vernoud V., Horton A.C., Yang Z.B., and Nielsen E., 2003, Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 131(3): 1191-1208
- Wang X., 2004, Functional analysis of TaRAN1, a small GTP-binding protein during cell cycle and development in plant, Dissertation for Ph.D., Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Supervisor: Zhong K., and Xu Z.H., pp. 81-106 (王昕, 2004, 一种小 G 蛋白 TaRAN1 在植物细胞周期和发育过程中的功能研究, 博士学位论文, 中国科学院研究生院, 导师: 种康, 许智宏, pp.81-106)
- Wang X., Xu W.Z., Xu Y.Y., Chong K., Xu Z.H., and Xia G.X., 2004, Wheat RAN1, a nuclear small G protein, is involved

- in regulation of cell division in yeast, *Plant Sci.*, 167 (6): 1183-1190
- Wang X., Xu Y.Y., Han Y., Bao S.L., Du J.Z., Yuan M., Xu Z.H., and Chong K., 2006, Overexpression of *RAN1* in rice and *Arabidopsis* alters primordial meristem, mitotic progress, and sensitivity to auxin, *Plant Physiol.*, 140(1): 91-101
- Weis K., 2003, Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle, *Cell*, 112(4): 441-451
- Xu C.P., and Huang B.R., 2008, Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance, *J. Exp. Bot.*, 59(15): 4183-4194
- Xu C.P., and Huang B.R., 2010, Differential proteomic response to heat stress in thermal *Agrostis scabra* and heat-sensitive *Agrostis stolonifera*, *Physiol. Plantarum.*, 139(2): 192-204
- Yano A., Kodama Y., Koike A., Shinya T., Kim H.J., Matsumoto M., Ogita S., Wada Y., Ohad N., and Sano H., 2006, Interaction between methyl CpG-Binding protein and Ran GT-Pase during cell division in tobacco cultured cells, *Ann. Bot.*, 98(6): 1179-1187
- Yoshimura K., Masuda A., Kuwano M., Yokota A., and Akashi K., 2008, Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a *C₃ Xerophyte* (wild watermelon) under water deficits, *Plant Cell Physiol.*, 49(2): 226-241
- Zang A.P., Xu X.J., Neill S., and Cai W.M., 2010, Overexpression of *OsRAN2* in rice and *Arabidopsis* renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress, *J. Exp. Bot.*, 61(3): 777-789
- Zhai L.H., Liu Z.J., Zou X.L., Jiang Y.Y., Qiu F.Z., Zheng Y.L., and Zhang Z.X., 2013, Genome-wide identification and analysis of microRNA responding to long-term waterlogging in crown roots of maize seedlings, *Physiol. Plantarum*, 147 (2): 181-193

《基因组学与应用生物学》征稿启事

《基因组学与应用生物学》由中国农业大学教授李宁院士任主编,北京大学教授朱玉贤院士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编。

本刊设置固定栏目和随机栏目。固定栏目常设研究论文和研究报告,主要发表最新的原始研究成果。随机栏目根据稿源可能设研究资源、数据分析、技术专题和评述与展望等栏目,还可能设置刊登有关科学新闻、科技简讯、专利、短评和书评等方面的栏目。今天特向您征集:

研究论文:报道相对比较完整、全面的原始研究工作,其结论代表着在一个重要问题的认识上有了实质性进展,并且具有及时而深远的影响。论文篇幅要求在8个印刷页面以上。

研究报告:简洁报道有重要结果的原始研究工作,其重要性意味着其它领域的科学家对本研究结果也有兴趣。论文篇幅要求在6个印刷页面左右。

评述与展望:告诉广大读者在生命科学、医学、农业科学和环境科学等领域最新的重要进展。论文篇幅要求在6个印刷页面左右。

地址:广西南宁市大学东路100号广西大学西校园榕江路广西大学《基因组学与应用生物学编辑部》

邮编:530004

电话:+86-0771-3239102 传真:+86-0771-3232621

邮箱:gab@gabcn.org 网址:www.gabcn.org



请扫描二维码,登录基因组学与应用生物学网站