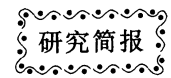


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00370



大豆立枯丝核菌 G 蛋白β亚基基因的克隆与分析

马炳田^{1,2} 曲广林¹ 黄文娟¹ 林瑜凡¹ 李仕贵^{1,2,*}

¹ 四川农业大学水稻研究所, 成都温江 611130; ² 四川农业大学 / 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 四川雅安 625014

摘要: 由立枯丝核菌 [*Rhizoctonia solani* Kühn, 有性世代: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] 引起的大豆纹枯病 (soybean sharp eyespot) 是一种重要病害。G 蛋白 β 亚基 (guanine nucleotide binding protein beta-subunit) 作为重要的信号传导因子, 在植物病原菌致病分子机制中起着重要作用。为了解 G 蛋白 β 亚基基因的结构与功能, 根据同源物种 G 蛋白 β 亚基相关序列设计引物, 利用 PCR 和 RT-PCR 技术克隆了大豆立枯丝核菌 G 蛋白 β 亚基的基因序列和开放阅读框 (G-protein beta-subunit of soybean *Rhizoctonia solani*, 简称为 *gbsrs1*, GenBank 登录号为 EU663628)。该片段全长 1 864 bp, 含有 4 个内含子和 5 个外显子; 开放阅读框 (ORF) 长 1 047 bp, 编码 348 氨基酸残基, 与多种真菌 G 蛋白 β 亚基的氨基酸序列相似程度较高, 达 79.72%~99.43%; 该蛋白质具有 2 个 α-螺旋和 7 个 β-折叠的二级结构, 形成无规则卷曲连接的桶形三级结构。将 *gbsrs1* 的 ORF 连接于原核融合表达载体 pGEX-4T-2 中, 经 IPTG 诱导, 获得了相应蛋白的表达。*gbsrs1* 的克隆和特性研究为了解大豆立枯丝核菌的致病机理、有效防治纹枯病奠定了基础。

关键词: 大豆; 立枯丝核菌; 致病性; G 蛋白 β 亚基; 信号传导

Cloning and Analyzing of G-protein β-Subunit Gene in *Rhizoctonia solani* Causing Soybean Sharp Eyespot

MA Bing-Tian^{1,2}, QU Guang-Lin¹, HUANG Wen-Juan¹, LIN Yu-Fan¹, and LI Shi-Gui^{1,2,*}

¹ Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ² Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: Soybean sharp eyespot is one of the most serious diseases in world. The protein encoded by G-protein β-subunit (guanine nucleotide binding protein beta-subunit) gene plays an important role in pathogenesis mechanism. In this paper, the G-protein β-subunit from *Rhizoctonia solani* (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*) causing soybean sharp eyespot was identified. The genome of 1 864 and 1 047 bp open reading frame (ORF) were amplified by PCR and RT-PCR. The gene included 4 introns and 5 exons. Introns ranged in size from 54 to 65 bp, and their sequences complied with the rule of “5 -gt” and “ag-3” (GenBank Accession No. EU663628). The ORF encoded 348-amino acid polypeptide with 38.24 kD of calculated molecular weight and 6.31 of pI. There were two alpha-helices and seven beta-sheets including four beta-strands each in its amino acid secondary structure. Two alpha-helices in its N-terminal and seven beta-sheets formed barrel structure by non-regular curl in the tertiary structure. The deduced amino acid sequence of β-subunit was identical to that from *Rhizoctonia solani* (GenBank Accession No. EU267677, AY884129), *Lentinula edodes* (GenBank Accession No. AAT74567), *Coprinopsis cinerea* (GenBank Accession No. EAU92269), *Ustilago maydis* (GenBank Accession No. AAN33051) and *Filobasidiella neoformans* (GenBank Accession No. AAD03596) with 99.43%, 89.19%, 87.97%, 83.66%, 80.23%, and 79.72%, respectively. The amplified ORF was ligated into the prokaryotic fusion expression vector pGEX-4T-2. *E. coli* BL21 was transformed with this recombinant vector and induced by IPTG for expression. The result indicated that the protein size of ORF matched the prediction. This cloning of this gene provides the evidence for controlling hyphal growth, development and virulence in *R. solani*.

Keywords: Soybean; *Rhizoctonia solani*; Pathology; G-protein β-subunit; Signal transduction

由立枯丝核菌 [*Rhizoctonia solani* Kühn, 有性世代: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] 引起的纹枯病是大

豆的一种重要病害, 近年来随着稻豆轮作制的推广, 有日趋严重的趋势, 部分地区发病率已高达 40% 以上, 造成严

本研究由教育部长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT0453) 资助。

* 通讯作者 (Corresponding author): 李仕贵, E-mail: lishigui_sc@263.net; Tel: 028-82722661

第一作者联系方式: E-mail: btma02@vip.sina.com; Tel: 028-82722661

Received (收稿日期): 2008-05-18; Accepted (接受日期): 2008-09-10.

重减产。立枯丝核菌也引起其他许多植物发生纹枯病, 是一种重要的植物病原真菌, 但其致病分子机制研究尚不完善。

鸟苷酸结合蛋白(Guanine nucleotide binding protein, 简称 G 蛋白)是连接细胞表面受体和效应器的最重要信号传导分子之一, 参与了许多动植物细胞的生理生化反应过程。G 蛋白偶联信号传导系统由 G 蛋白偶联受体、异源三聚体 G 蛋白和效应器三部分组成^[1]。异源三聚体 G 蛋白又由 α 、 β 和 γ 3 个亚基组成^[2-3], 其中 β 亚基相对比较保守。在哺乳动物中已鉴定了 β_1 到 β_5 等 5 种 G 蛋白 β 亚基。 β_1 到 β_4 之间同源性很高, 达 80% 以上, 而 β_5 与其他 4 种 β 亚基同源性较低, 大约为 50%^[4]。除哺乳动物外, 在其他物种如真菌中也发现了一些 G 蛋白 β 亚基在生长发育和致病等过程中起着重要作用^[5-8]。对栗疫病菌 (*Cryphonectria parasitica*) 的研究表明, β 亚基功能缺失会导致病菌色素沉积减少、致病力降低以及影响孢子形成等^[5]; 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的 G 蛋白 β 亚基也参与了其生长、发育和致病性的调控过程^[8]。因此, G 蛋白 β 亚基参与了植物病原真菌的生长发育与致病等生理生化过程。

然而, 作为植物重要病原真菌的立枯丝核菌, 其 G 蛋白 β 亚基特性和功能分析至今鲜见报道。Lunprom 等虽从立枯丝核菌中克隆了一个 G 蛋白 β 亚基(GenBank 登录号为 AY884129), 但与我们克隆的水稻立枯丝核菌相应基因的 ORF 差异较大(另文报道), 同时未见其特性和功能分析的后续报道。本文通过 PCR 和 RT-PCR 技术, 克隆了大豆立枯丝核菌 G 蛋白 β 亚基基因(*gbsrs1*, GenBank 登录号为 EU663628), 为研究大豆立枯丝核菌的致病机理、有效防治纹枯病奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆立枯丝核菌菌株 2-1, 分离于田间大豆立枯丝核菌菌核, 保存于本实验室。DNA 提取试剂盒 E.Z.N.A. Fungal DNA Miniprep Kits、RNA 提取试剂盒 E.Z.N.A. Fungal RNA Kits、DNA 凝胶回收试剂盒 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit 等均购自 E.Z.N.A 公司; *Sma* I、*Not* I、Prime STAR HS DNA Polymerase 和 pMD20-T Vector 等均购自宝生物工程(大连)有限公司; 原核表达载体 pGEX-4T-2 由本实验室提供; 反转录酶 ReverTraAce 购自 Biobrk 公司。引物由 Shenergy Biocolor 合成; 测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2 基因组 DNA 和总 RNA 的提取

滤取在马铃薯蔗糖液体培养基中培养 2 d 的大豆立枯丝核菌菌丝体, 参照 DNA 提取试剂盒 E.Z.N.A. Fungal DNA Miniprep Kits 和 RNA 提取试剂盒 E.Z.N.A. Fungal RNA Kits 操作说明分别提取其基因组 DNA 和总 RNA。

1.3 引物设计与 *gbsrs1* 的克隆

根据同源物种 G 蛋白 β 亚基的基因组序列设计 1 对

引物, 正向引物 G β 1-F 序列为 5'-GCAAGGGTGCAGTA TGA-3; 反向引物 G β 1-R 序列为 5'-TGACCACGACCAA ATGAA-3, 目标片段约 1.9 kb。PCR 体系(50 μ L)含模板 DNA 2 μ L、10 pmol L⁻¹ 的两向引物各 1 μ L、2.5 mmol L⁻¹ 的 dNTP 各 4 μ L、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μ L、5 \times PrimeSTAR buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ L、超纯水 31.5 μ L。PCR 扩增程序为 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 采用 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit 回收约 2 kb 的目的片段, 克隆到 pMD20-T Vector 进行序列测定。

1.4 *gbsrs1* 基因 cDNA 的克隆

根据大豆立枯丝核菌基因组序列设计 RT-PCR 引物, 正向引物 G β 2-F 带有 *Sma* I 酶切位点(CCCGGG), 序列为 5'-CCCGGGATGTCGAACCAAGGAGATATT-3, 反向引物 G β 2-R 带有 *Not* I 酶切位点(GCGGCCGC), 序列为 5'-GCGGCCGCTTACGCCAGACCTTGAG-3, 目标片段包含完整的 ORF。以大豆立枯丝核菌总 RNA 为模板, 按 ReverTraAce 的使用说明进行 cDNA 第一链的合成; 再用 cDNA 第一链为模板, 用 Prime STAR HS DNA Polymerase 进行 PCR 扩增, 采用 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit 回收约 1 kb 的特异片段, 克隆到 pMD20-T Vector 进行序列测定。PCR 程序为 98 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 67 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。

1.5 *gbsrs1* 的原核表达

从含有完整 cDNA 的重组载体 pMD20-T Vector(即测序载体)中, 提取质粒 DNA, 用 *Sma* I 和 *Not* I 进行双酶切, 回收约 1 kb 的片段, 连接到经过双酶切的载体 pGEX-4T-2 上, 得到重组载体 pGEX-4T-2-*gbsrs1*。将 pGEX-4T-2-*gbsrs1* 用电击法转入宿主菌 *E. coli* BL21 中, 用菌落 PCR 检测含重组载体的菌株。将含重组质粒的宿主菌在 LB 液体培养基中培养 3~5 h, 当菌液 A₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时加入 IPTG 至 0.1 mmol L⁻¹, 诱导重组载体表达。稀释调整经诱导的培养菌液 A₆₀₀ 到 0.7, 取菌液 1.5 mL 离心收集菌体并采用超声波破碎后定量蛋白, 将可溶性蛋白组分进行 SDS-PAGE (分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 3%), 考马斯亮蓝 G-250 染色并脱色, 观察结果。

2 结果与分析

2.1 *gbsrs1* 的克隆与序列分析

从大豆立枯丝核菌中提取全基因组 DNA, 用合成的 G β 1-F 和 G β 1-R 引物进行 PCR, 得到一条长约 1.9 kb 的扩增带(图 1)。回收该片段后连接到 pMD20-T Vector 上进行序列测定, 获得基因组核苷酸序列, 将其命名为 *gbsrs1* (G-protein beta-subunit of soybean *Rhizoctonia solani*)。以总 RNA 为模板, 用合成的 G β 2-F 和 G β 2-R 引物进行 RT-PCR, 得到一条长约 1 kb 的扩增带(图 2)。回收该片段后连接到 pMD20-T Vector 上测序, 得到 *gbsrs1* 的 ORF 核苷

酸序列(GenBank 登录号为 EU663628)。通过 ORF 与其基因组序列对比,发现 *gbsrs1* 含有 4 个内含子和 5 个外显子,内含子长度分别是 64、65、54 和 56 bp,且序列均符合 5'-gt...ag-3 规则。序列分析表明,*gbsrs1* 与 AY884129 的碱基序列相似率达 89.96%,外显子与内含子区域都具有差异碱基;与本实验室克隆的水稻纹枯病 G 蛋白 β 亚基基因(GenBank 登录号为 EU267677)的相似率达到了 98.02%。

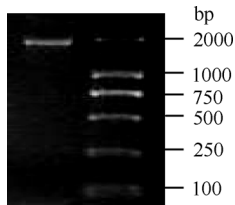


图 1 PCR 扩增 β 亚基基因组

Fig. 1 Amplification of the β -subunit by PCR
左: PCR 产物; 右: DNA 分子量标准 (DL2000).
Left: PCR product; Right: DNA marker (DL2000).

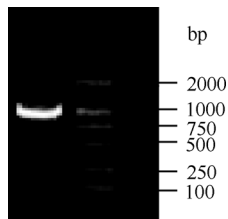


图 2 RT-PCR 扩增的开放阅读框

Fig. 2 Amplification of the β -subunit ORF by RT-PCR
左: RT-PCR 产物; 右: DNA 分子量标准 (DL2000).
Left: RT-PCR product; Right: DNA marker (DL2000).

2.2 *gbsrs1* 编码蛋白的特性分析

通过分析 *gbsrs1* 的 ORF 发现该基因编码 348 个氨基酸残基,分子量为 38.24 kD,等电点为 6.31。AY884129 编码 370 个氨基酸残基,分子量为 40.77 kD,而现在已经克隆的 G 蛋白 β 亚基基因编码的氨基酸残基数目均在 340 个左右,蛋白分子量在 37.00 kD 左右^[9-10]。通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索其他物种 G 蛋白 β 亚基氨基酸序列,采用 DNAMAN 6.0(Lynnon Biosoft Corp.)进行序列多重比较发现,该蛋白质序列与其他物种已知的 G 蛋白 β 亚基具有较高的同源性,与真菌的 6 条 G 蛋白 β 亚基的同源率为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*, GenBank 登录号 EU267677)99.43%、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*, GenBank 登录号:AY884129)89.19%;香菇(*Lentinula edodes*, GenBank 登录号:AAT74567)87.97%;灰盖鬼伞菌(*Coprinopsis cinerea*, GenBank 登录号:EAU92269)83.66%;玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*, GenBank 登录号:AAN33051)80.23%;新型隐球菌(*Filobasidiella neoformans*, GenBank 登录号 AAD03596)79.72%(图 3)。经过进一步分析发现,该蛋白质与哺乳动物 G 蛋白 $\beta 1$ 亚基中的重要功能区域极为相似,如与腺苷酸环化酶相互结合的两个区域 TTNKV

HAIPLRSSWVMTCA Y(氨基酸残基 93~112)和 ACGGLDN ICSIYNLKTREGNV(氨基酸残基 121~141)^[10],仅在氨基酸残基 121~141 区域有 5 个氨基酸不同。通过 NCBI 的 Blastp 分析发现,大豆立枯丝核菌物 G 蛋白 β 亚基具 2 个 α -螺旋和 7 个 β -折叠(每个含 4 条 β -链)组成的二级结构,并无规则卷曲连接形成桶形三级结构;还发现 6 个典型的 G 蛋白 β 亚基 WD-40 重复结构。

2.3 *gbsrs1* 的原核表达

将 *gbsrs1* 的 cDNA 与原核表达载体 pGEX-4T-2 连接获得重组载体;将重组载体转化到 *E. coli* BL21 中,经 0.1 mmol L⁻¹ 的 IPTG 诱导 2 h 后提取蛋白。SDS-PAGE 分析表明,在分子量约 65 kD 处有一明显的融合诱导表达蛋白带(图 4),与预期一致,说明该 cDNA 是完整的可表达序列。

3 讨论

在 G 蛋白的异源三聚体中, β 和 γ 亚基是通过非共价键的疏水作用紧密结合在一起的功能体。 β 亚基有两个明显的结构域一个是相对保守的 N 端两亲性 α -螺旋,与 γ 亚基的 N 端螺旋接近平行且相互作用^[11];另一个是由 40~43 个氨基酸残基组成的 7 个膜片状螺旋桨式结构(WD-40),含有特定的色氨酸和天冬氨酸,可能参与调控 β 和 γ 亚基选择性结合及亚基对多种构象变化的适应能力^[12-13]。现已从玉米和拟南芥^[14]、水稻^[15]、烟草^[16]等植物中分离到预测编码 β 亚基的 cDNA 或基因。这些蛋白序列也有 2 个共同的特有结构一个是 N 端 α -螺旋序列,另一个是 7 个 β -折叠结构。在哺乳动物中已鉴定的 5 种 G 蛋白 β 亚基都有类似的特点。Blastp 分析发现,笔者克隆的 *gbsrs1* 基因编码蛋白在 N 端有 2 个 α -螺旋,后面是 7 个 β -折叠,但在整个序列中只有 6 个 WD-40 结构,与其他物种中克隆的 G 蛋白 β 亚基的 7 个 WD-40 有一定差异,说明在立枯丝核菌中调控 β 和 γ 亚基选择性结合的方式及亚基对多种构象变化的适应能力可能有别于其他物种。

立枯丝核菌是一种重要植物病原真菌,对其与信号传递有关的 G 蛋白的相关研究较少,特别是关于 β 亚基的报道更少。Lunprom 等克隆了一个立枯丝核菌 G 蛋白 β 亚基(GenBank 登录号 AY884129),只发现 3 个内含子和 4 个外显子。采用基因组与 cDNA 序列的比对分析发现,*gbsrs1* 基因含有 4 个内含子和 5 个外显子,各内含子长度 54~65 bp,序列不仅符合 5'-gt...ag-3 规则,而且前 3 个内含子的 5 端都是 GTG,说明立枯丝核菌 G 蛋白 β 亚基的剪切可能比较保守。由本实验室克隆的玉米和水稻立枯丝核菌 G 蛋白 β 亚基也发现了同样现象。*gbsrs1* 基因及其 ORF 的获得并实现原核表达,为研究该基因的功能和表达调控模式奠定了基础。

真菌 G 蛋白 β 亚基在有性生殖过程中也起作用,并且发现该基因功能缺失后的菌株毒性丧失,说明该亚基与病菌致病过程有关^[8,17]。Delgado-Jarana 等^[8]发现尖孢镰

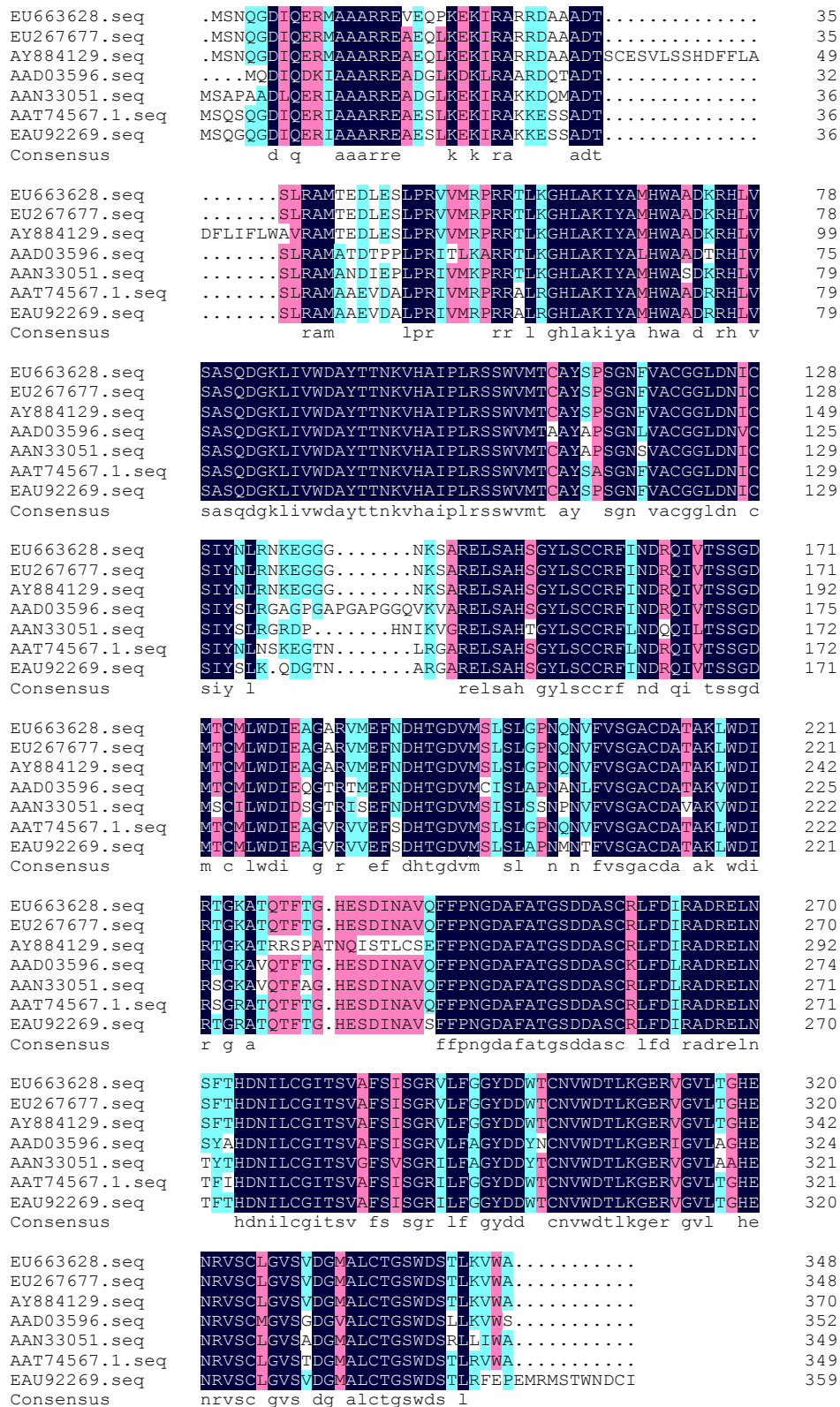


图 3 推导的氨基酸序列与同源物种的比对分析

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequence of *gbsr1* with the related proteins

EU663628 : *gbsr1*; EU267677 : 水稻立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*); AY884129 : 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*); AAD03596 : 新型隐球菌(*Filobasidiella neoformans*); AAN33051 : 玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*); AAT74567 : 香菇(*Lentinula edodes*); EAU92269 : 灰盖鬼伞菌(*Coprinopsis cinerea*).

EU663628: *gbsr1*; EU267677: *Rhizoctonia solani* in rice; AY884129: *Rhizoctonia solani*; AAD03596: *Filobasidiella neoformans*; AAN33051: *Ustilago maydis*; AAT74567: *Lentinula edodes*; EAU92269: *Coprinopsis cinerea*.

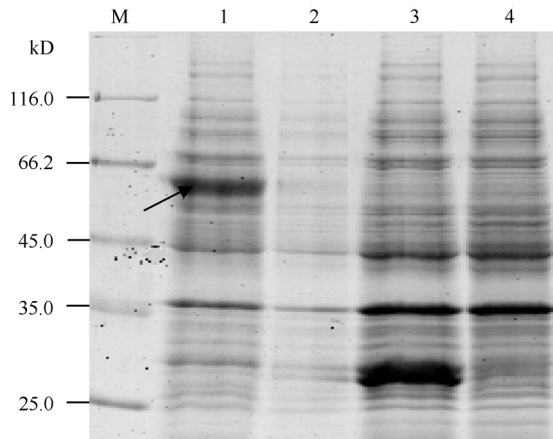


图4 基因 *gbsrs1* 原核表达 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressive pGEX-4T-2-*gbsrs1*

M: 分子量标准; 1: IPTG 诱导重组载体表达菌体粗提物(箭头所指为目标蛋白); 2: 未诱导重组载体表达菌体粗提物;

3: 未重组载体表达菌体粗提物; 4: 诱导未重组载体表达菌体粗提物。

M: marker; 1: crude lysate of *E. coli* BL21 transformed with pGEX-4T-2-*gbsrs1* after IPTG induction (arrow presents this protein); 2: crude lysate of *E. coli* BL21 transformed with pGEX-4T-2-*gbsrs1*; 3: crude lysate of *E. coli* BL21 transformed with pGEX-4T-2; 4: crude lysate of *E. coli* BL21 transformed with pGEX-4T-2 after IPTG induction.

刀菌(*Fusarium oxysporum*)的 G 蛋白 β 亚基通过参与 cAMP 或独立于 cAMP 的代谢途径控制病菌的生长、发育和致病过程。Wang 等^[5]对栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*) G 蛋白 β 亚基的研究结果显示, β 亚基的功能缺失会导致真菌色素沉积减少、致病力降低以及影响孢子形成, 但不会降低菌丝的直线生长速率, 为有效控制立枯丝核菌提供了一种新的思路。而笔者克隆的 *gbsrs1* 基因在其生长发育和致病机制中究竟起什么作用, 还有待进一步研究。

References

- [1] Zhai Z-H(翟中和), Wang X-Z(王喜忠), Ding M-X(丁明孝). Cell Biology (细胞生物学). Beijing: Higher Education Press, 2000. pp 124-157(in Chinese)
- [2] Ford C E, Skiba N P, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter L R, Rosal R, Weng G, Yang C S, Iyengar R, Miller R J, Jan L Y, Lefkowitz R J, Hamm H E. Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science*, 1998, 280: 1271-1274
- [3] Chen J-L(陈巨莲), Ni H-X(倪汉祥), Sun J-R(孙京瑞), Weng G. G protein $\beta 1\gamma 2$ subunits purification and their interaction with adenylyl cyclase. *Sci China (Ser C)* (中国科学·C 辑), 2003, 33(1): 56-64 (in Chinese)
- [4] Hou Y M, Chang V, Capper A B, Taussig R, Gautam N. G protein β subunit types differentially interact with a muscarinic receptor but not adenylyl cyclase type II or phospholipase C- $\beta 2/3$. *J Biol Chem*, 2001, 276: 19982-19988
- [5] Kasahara S, Nuss D L. Targeted disruption of a fungal G-protein β subunit gene results in increased vegetative growth but reduced virulence. *Mol Plant Microbe Int*, 1997, 10: 984-993
- [6] Latijnhouwers M, Govers F. A *Phytophthora infestans* G-Protein β subunit is involved in sporangium formation. *Eukaryot Cell*, 2003, 2: 971-977
- [7] Zeller C E, Parnell S C, Dohlmans H G. The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein β -Subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem*, 2007, 282: 25168-25176
- [8] Delgado-Jarana J, Martínez-Rocha A L, Roldán-Rodríguez R, Roncero M I, Di Pietro A. *Fusarium oxysporum* G-protein beta subunit Fgb1 regulates hyphal growth, development, and virulence through multiple signalling pathways. *Fungal Genet Biol*, 2005, 42: 61-72
- [9] Chen J-L(陈巨莲), Weng G-Z, Ni H-X(倪汉祥). The advancement of G protein and coupled signal transduction pathways. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, 17(2): 113-117(in Chinese with English abstract)
- [10] Ruiz-Velasco V, Ikeda S R, Puhl H L. Cloning, tissue distribution and functional expression of the human G protein β_4 -subunit. *Physiol Genomics*, 2002, 8: 41-50
- [11] Lupas A N, Lupas J M, Stock J B. Do G protein subunits associate via a three-stranded coiled coil? *FEBS Lett*, 1992, 314: 105-108
- [12] Clapham D E, Neer E J. New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signaling. *Nature*, 1993, 365: 403-406
- [13] Wang D S, Shaw R, Winkelmann J C, Shaw G. Binding of PH domains of β -adrenergic receptor kinase and β -spectrin to WD40/ β -transducin repeat containing regions of the β -subunit of trimeric G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 203: 29-35
- [14] Weiss C A, Garnaat C W, Mukai K, Hu Y, Ma H. Isolation of cDNAs encoding GTP-binding protein β -subunit homologues from *maize* (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 9554-9558
- [15] Ishikawa A, Iwasaki Y, Asahi T. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the β -subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 223-228
- [16] Kaydamov C, Tewes A, Adler K, Manteuffel R. Molecular characterization of cDNAs encoding G protein α and β subunits and study of their temporal and spatial expression patterns in *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 149: 143-160
- [17] Wang P, Perfect J R, Heitman J. The G-protein β subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 352-362