

马氏珠母贝 Rab7 基因的克隆及其表达特征分析

石耀华 王 嫣 顾志峰 王爱民* 苏树叶

(海南大学海洋学院, 教育部热带生物资源重点实验室, 海南省热带水生生物技术重点实验室,
海洋生物实验教学中心, 海口 570228)

摘 要 Rab 家族基因在囊泡的形成、转运、黏附、锚定和融合等各个阶段发挥重要作用。在已有的马氏珠母贝 Rab cDNA 片段的基础上, 采用 RACE 方法克隆了该基因的全长。cDNA 长度 2 519 bp, 编码区长 618 bp, 编码 206 个氨基酸。编码的蛋白质序列分析表明, 该基因具有 Rab 家族的全部保守结构, 与人类等其他生物的 Rab7 亚家族的同源性最高。RT-PCR 结果显示, 该基因在马氏珠母贝的鳃、足和胃组织中没有扩增产物, 在卵、感染和未感染蚶贝才女虫 *Polydora ciliata* 的马氏珠母贝的肝脏和血液中均检测到了与预期大小相符的扩增产物, 存在组织差异性表达。

关键词 马氏珠母贝 Rab 克隆 表达特征

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)02-0072-08

Cloning and expression character analysis of Rab7 in *Dunker Pinctada martensii*

SHI Yao-hua WANG Yan GU Zhi-feng WANG Ai-min* SU Shu-ye

(Ocean College, Hainan University, Key Laboratory of Tropic Biological Resources, Ministry of Education,
Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiology Technology,
Experimental Teaching Center of Marine Biology, Haikou 570228)

ABSTRACT Rab gene family plays an important role for endosome in formation, transportation, anchoring and fusion of/with phagosome/lysosome. Based on the existing Rab cDNA fragment of *Pinctada martensii*, the total open reading frame was cloned by using RACE method. The total cDNA consists of 2 519 bp, including a 618 bp coding sequence region. Analysis of deduced amino acid sequences showed that all conserved motifs and regions can be found among these 206 amino acids. Furthermore, it was suggested that this Rab gene was a Rab7 homology because its amino acids constitution was more similar to Rab7 of human beings and other organisms, than to any other Rab subfamilies. Rab7 transcripts could be detected at expected levels respectively in liver and blood of *P. martensii* infected or not infected with *Polydora ciliate*, and in mature eggs. However, nothing was found in gill, tropoda or stomach. These results suggested that Rab7 was a tissue-specific expressing gene and may be involved in special procedures.

国家自然科学基金(30460105, 30640440657)、国家 863 计划(2006AA10A409)和科技部国际科技合作重点项目计划项目(2004DFA07200)共同资助

* 通讯作者。E-mail: aimwang@163.com, Tel: 13006028618

收稿日期: 2009-06-11; 接受日期: 2009-09-16

作者简介: 石耀华(1970-), 男, 副教授, 主要从事水生生物遗传育种和分子生物学研究。E-mail: stone70@126.com, Tel: 13118977908

KEY WORDS *Pinctada martensii* Rab Cloning Expression character

Rab、Ran、Ras、Rho / Rac / Cdc42 和 Sar / Arf 等亚家族组成小分子三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白超级家族(Wennerberg *et al.* 2005), Rab 基因是其中最大的家族。Rab 基因最早在芽殖酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中发现,并以 SEC 系列命名(Novick *et al.* 1980)。随后,在人的肌球蛋白基因和微管蛋白基因之间发现了 SEC4 的同源基因 YPT1(Echard *et al.* 1983)。Touchot 等(1987)从大鼠 *Rattus norvegicus* 的大脑 cDNA 文库中克隆了 SEC4 基因的同源物,将其命名为 Rab (Ras-like in rat brain)。此后,该基因家族基本上以 Rab 系列命名。

Rab 基因编码的蛋白质以单体形式存在,一般由 200~210 个氨基酸组成,分子量多数为 22~27kD,由高度保守的 GTP/GDP 结合结构域和可变的 N 端与 C 端组成。Rab 高度可变的 C 末端决定了 Rab 蛋白亚家族成员与细胞器膜的结合位置(陈萱茂等 2000)。Rab 家族成员的氨基酸序列的相似性大约在 35%~80%之间,极少数大于 80%。

Rab 基因普遍存在于从酵母、果蝇 *Drosophila melanogaster*、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和人 *Homo sapiens* 等真核生物中(聂宇等 2008),不同类群的生物 Rab 亚家族的成员数量各不相同。裂殖酵母 Rab 基因种类较少,仅编码 7 个 Rab 蛋白,芽殖酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 编码 11 个 Rab 蛋白,拟南芥和人类中已经分别发现了 57 种(Rutherford *et al.* 2002)和 60 多种(Bock *et al.* 2001)。在海洋生物中,仅在日本对虾 *Marsupenaeu japonicus*、紫色球海胆 *Strongylocentrotus purpuratus* 少数物种中有零星的 Rab 基因研究。Pan 等(2005)发现在抗病毒日本对虾中 Rab 的表达有所上升,推测 Rab 蛋白可能参与了对虾的免疫过程。吴文林等(2007)克隆了日本对虾的 Rab 基因同源物 PjRab 基因并进行了原核表达。

本研究中,首次克隆了软体动物的 Rab 基因全编码序列,推测的氨基酸序列与哺乳动物等的 Rab7 亚家族成员有较高的相似性,并初步分析了其组织表达特征,为进一步研究 Rab 基因在贝类中的功能以及贝类的细胞内物质和信息交流奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

马氏珠母贝 *Pinctada martensii* 取自海南陵水县黎安毅珠珍珠养殖场,选取健康活体运到实验室。

1.2 RNA 提取和纯化

切断闭壳肌,剖开马氏珠母贝,分别切取约 0.2 g 外套膜、卵、鳃、足、肝、胃、血和感染苗贝才女虫的马氏珠母贝的血液(血感)和肝(肝感),各加入 10 倍体积的 Trizol (购自 Invitrogen 公司),电动匀浆(Pro 200),按照说明书提取总 RNA, RNeasy Mini Kit (购自 QIAGEN 公司)纯化,琼脂糖电泳检测 RNA 质量,并用 Oligotex mRNA Kit (购自 QIAGEN 公司)进行 mRNA 纯化(石耀华等 2007)。

1.3 DNA 的提取

DNA 的提取方法参照石耀华等(2008),共提取 4 只马氏珠母贝的 DNA,电泳检测质量和浓度,混合稀释 DNA 至终浓度为 40ng/ μ l,来源于 4 只马氏珠母贝的 DNA 在混合模板中比例相同。

1.4 cDNA 合成和全长 cDNA 序列的克隆

按照 SMARTTM cDNA Library Construction Kit (购自 Clontech 公司)进行逆转录和合成第二链 cDNA。根据合成 SMART cDNA 的 Smart IVTM寡核苷酸和 CDS III PCR 引物的序列,合成了 SMART 5'引物:5'-AGT GGC CAT TAC GGC CGG G-3'和 SMART 3'引物:5'-GCC GAC ATG T₁₅-3',分别锚定于 SMART cDNA 的 5'和 3'末端,分别作为克隆 5'端的上游引物和克隆 3'端的下游引物。

根据本室构建的 cDNA 文库测序获得的 Rab7 cDNA 片段,设计上游引物(5'-GCA TCC ACA CCC TTC TTT TG-3')和下游引物(5'-GTT GAG GCG TGG CTT TCT AC-3'),上下游引物之间有重叠 cDNA 序列。上游引物与 SMART 3'引物扩增 cDNA 的 3'末端,下游引物与 SMART 5'引物扩增 cDNA 的 5'末端。PCR 反应条件如下:94 °C,4min 变性后,94 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 1.5 min,35 个循环。PCR 产物切胶回收,pGEM-T 载体(pGEM-T Vector System I Kit,购自 Promega)连接,转化大肠杆菌,测序(上海生工生物工程技术服务有限公司),拼接得到 3'末端和 5'末端,去掉重叠区段即获得基因全长 cDNA 序列。

1.5 同源性查找和序列分析

测序获得的序列去掉载体后在 GenBank 中 BLASTx 查找相似序列。NCBI 中 ORF Finder 推断氨基酸序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>),软件 Clustal X 1.83 比较分析氨基酸序列,用 Mega 2 软件对推断的氨基酸序列与小鼠、拟南芥等生物的同源序列进行聚类分析。

1.6 RT-PCR

用 α -tubulin 基因(上游引物:5'-GTG CAC TGG TCT TCA GGG GTT-3',下游引物:5'-GGG AAG TGG ATG CGT GGG TAT-3')扩增逆转录合成的 cDNA 调整模板浓度,使各模板的起始浓度一致,然后用扩增 5'端和 3'端的基因特异性上下游引物以 cDNA 和 40 ng DNA 模板分别进行 PCR,PCR 反应条件如下:94 °C,4min 变性后,94 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 3 min,35 个循环,各取 5 μ l PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 马氏珠母贝 Rab 基因 cDNA 序列和推断的氨基酸序列

马氏珠母贝 Rab 基因 cDNA 长 2 519bp(GenBank 登录号:FJ809935)(其中第 227~683bp 为我们此前克隆的 cDNA 片段),ORF Finder 推测该基因的开放阅读框位于 37~654 bp,编码 206 个氨基酸,终止密码子为 TAA;5'端非编码区有 36 个核苷酸,3'非编码区较长,由 2 261 个核苷酸组成(图 1)。

2.2 马氏珠母贝 Rab 基因拟编码的蛋白质序列分析

马氏珠母贝 Rab 基因 cDNA 在 GenBank 中用 BlastX 查找时,氨基酸相似性较高的基因出现较多的是 Rab7 基因,还有其他的 Rab 基因家族成员。与人类不同亚类型 Rab 基因的氨基酸序列聚类分析结果显示,马氏珠母贝 Rab 基因与人的 Rab7 基因聚为一支,进而与 Rab9A 聚为更高一级分支,与人的其他 Rab 基因较远(图 2)。因此,将马氏珠母贝的 Rab 基因命名为 Rab7。

马氏珠母贝 Rab7 基因拟编码的蛋白序列的分析显示,该基因具有 Rab 蛋白家族成员与 GTP/GDP 和 Mg²⁺ 发生相互作用的保守位点 SGVGGKTS(17-23)、F(33)、N(35)、T(40)、G(67)、NK(126-127)、D(129)、SAK(156-158),也有 Rab 蛋白家族成员的 5 个保守的共有序列元件 GXXXXGK[T/S]、T、DXXG、[N/T] KXD 和 [C/S]A[K/L/T]。Rab7 的 C 末端的 3 个氨基酸为 CGC,符合 CXC 类型。Rab7 拟编码的蛋白质中还存在效应子 GTPase 以及激活蛋白(GTPase activating protein, GAP)结合位点、GDP 解离抑制因子(GDP dissociation inhibitor, GDI)作用位点、鸟嘌呤核苷酸交换因子(Guanine nucleotide exchange factors, GEF)作用位点、开关 I (Switch I)和开关 II (Switch II)区域以及 Rab 家族的 5 个结构域(RabF)和 Rab 亚家族的 4 个结构域((RabSF)(表 1)。

2.3 聚类分析

将马氏珠母贝的 Rab7 基因与玻璃海鞘 *Ciona intestinalis*、果蝇、爪蟾 *Xenopus laevis*、拟南芥、小鼠和人等生物的 Rab7 亚家族基因的蛋白质序列进行聚类分析。拟南芥和水稻 *Oryza sativa* 聚为一支,动物和真菌等聚为另外一支。马氏珠母贝与香菇 *Lentinula edodes* 聚在一起,进而与玻璃海鞘聚为一支,其次与海葵

Aiptasia pulchella 距离较近,与秀丽广杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 和原生动物的双小核草履虫 *Paramecium aurelia* 的关系较远(图 3)。

2.4 马氏珠母贝 Rab7 基因组织表达谱

特异性引物在不同组织中的 RT-PCR 扩增结果显示,Rab7 基因在鳃、足和胃组织中无扩增产物,在卵、感染和未感染苗贝才女虫 *Polydora ciliata* 的马氏珠母贝的肝脏和血液中均检测到了与预期大小相符的 400 bp 扩增产物,其中卵细胞的条带较弱。基因组 DNA 对照中没有对应的 400 bp 条带,但有 1 条大于 2 kb 的带(图 4-B)。

表 1 马氏珠母贝 Rab 基因的功能区或者保守区序列及其所在位置

Table 1 Conserved regions or motif sequences and location of *P. martensii* Rab7

保守或者功能区 Conserved region	氨基酸序列 Amino acids sequence	在序列中位置 Site in the sequence	氨基酸数量 Number of amino acids	保守或者功能区 Conserved regions	氨基酸序列 Amino acids sequence	在序列中位置 Site in the sequence	氨基酸数量 Number of amino acids
GTP/Mg ²⁺ 结合位点 GTP/Mg ²⁺ binding sites	SGVGKTS	17~23	7		RF	70~71	2
	F	33	1		L	74	1
	N	35	1		F	78	1
	T	40	1		RGAH	80~83	4
	G	67	1		A	174	1
	NK	126~127	2	开关 I Switch I	F	33	1
	D	129	1		KATIGSADFL	38~42, 44~47	10
GDI 作用位点 GDI binding sites	SAK	156~158	3	开关 II Switch II	G	67	1
	S	17	1		ERFQSLGVAFY	69~79	11
	G	42	1	G1 box	GDSGVGKT	15~22	8
	DF	44~45	2	G2 box	T	40	1
	D	64	1	G3 box	DTAG	64~67	4
	Q	68	1	G4 box	NKID	126~129	4
	RFQS	70~73	4	G5 box	SAK	156~158	3
GEF 作用位点 GEF binding sites	VA	76~77	2	RabF1	IGSADF	41~42,44~46	6
	R	80	1	RabF2	TMQIW	59~63	5
	K	38	1	RabF3	RFQSLG	70~75	6
	GSADFLTKE	42, 44~50	9	RabF4	FYRGA	78~82	5
	L	57	1	RabF5	LVFDVP	87~92	6
	T	59	1	RabSF1	LK	9~10	2
	Effector 作用位点 Effector binding sites	I	41	1	RabSF2	SLMSQYVNKKFS	23~34
ADF		44~46	3		QYKA	36~39	4
Q		61	1	RabSF3	NFPFVV	118~123	6
W		63	1	RabSF4	KNALAQETE	172~180	9

注: RabF; Rab 家族模体; RabsF; Rab 亚家族模体

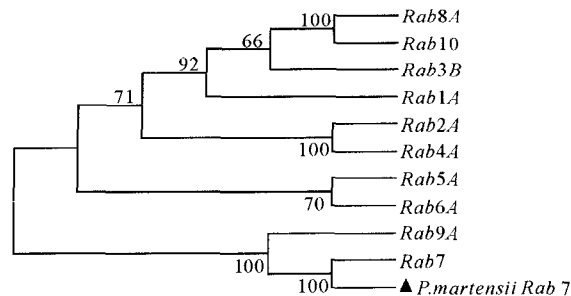
1 acggggagggaataagaaaalcttgatacgaagag 36
 37 atggcttcgaggaagaaggtcttggtagaagtcataatattaggtgacagtggtgttaggt 96
 1 M A S R K K V L L K V I I L G D S G V G 20
 97 aagacatcacattatgagccagatgtgtaacaagaagttcagtaatacaatataaggccacc 156
 21 K T S L M S Q Y V N K K F S N Q Y K A T 40
 157 attggcagcgcagatttccttaccaaaagaagtcagtagaagataggctactcactatg 216
 41 I G S A D F L T K E V M V E D R L L T M 60
 217 cagatatgggacacagcgggccagagaggtttcaagtttaggcgtggcttttcacagg 276
 61 Q I W D T A G Q E R F Q S L G V A F Y R 80
 277 ggtgcacactgttggtagttggtagtttccaatgcctaatacattcgaatcacta 336
 81 G A H C C V L V F D V P M P N T F E S L 100
 337 gacagctggagagatgagtttcttatccaagcaagttccaaggatccagaaaaactttcct 396
 101 D S W R D E F L I Q A S P R D P E N F P 120
 397 tttgtttgtataggaataaataatagatgtggaaaacagggcggtaacggcaaaaagagcc 456
 121 F V V I G N K I D V E N R A V T A K R A 140
 457 caagctggtgttaatagtaaaggagaaaattccttatttcgagaccagtgccaaagagggc 516
 141 Q G W C N S K G E I P Y F E T S A K E A 160
 517 ataatgttgaaacaagctttccagaccgtcgcaagaatgcgctcgcaacaagaacagaa 576
 161 I N V E Q A F Q T V A K N A L A Q E T E 180
 577 gtagaactttacaatgaattccccgatccagtaaaactcaaggacaaccaaaacaacca 636
 181 V E L Y N E F P D P V K L T D N Q N K P 200
 637 aaagaagggttggatgctaaatagtttacaagttatcatggattttattatgtgatcatc 696
 201 K E G C G C
 697 ttaagtctttcaaaaatggaagatttccatggacttgaatttagaattttattttaaa 756
 757 atatggctccacttttgattggacaaaaattggaccacttggcattttgggtaaccatttt 816
 817 gcaagtgaataataactctatctcaaaagcctglatcaaaagtttaagtcctataaga 876
 877 agtagaggcttaagctgaaaaaaagaaatataaggagaatacaatgcatcagatgttt 936
 937 aatttttaacaaagtttaagaaattatgataaattatcagaaggagtagcatgtacaat 996
 997 ctttggtttaccatgggttaccagttcattttatggaaaagtaaaattaaaattttattga 1056
 1057 agtcatgtgaaagtaataatcatlgtaccaagcttttagtataatttgatggatggcatta 1116
 1117 tcaaccttcacatttaatacaaaaatgagaacaagattgataattttttctgacattat 1176
 1177 gacatagatcaaatgtcaacatgtgatgtgatgaatgtacaagtgatgaagaat 1236
 1237 gtagctgcattggccatgtgtactcaaacataaatttggatttttagattagtgatttt 1296
 1297 gcttcagaaatatttaagatacatttttaataatcttttccatacctaaatttaaaag 1356
 1357 aaatgggttggtttgcacattacaacatttggtaagctccaccatttactcatgttatcaac 1416
 1417 aagcactggagagaattgctctcaaaactgttggtagtataaaacataattgtttctcaat 1476
 1477 ttatataatcaacatgaaaaaaaatgtaaaatttggtaaaatacaaaaatgtctgttatgt 1536
 1537 tccccctatctcaacagatattgtaaaaaataaagttcttcaaaagtcatacatgtata 1596
 1597 aataggatttatgtatttttgataaaagttaatcaatgtatagttaagtcagaaacaacta 1656
 1677 aaaaaggctcaaaaattacacaacaatgtcgttatcctgaaacttcccatgaaatgtaa 1716
 1717 catgtatgcgaactcgcagctctcttgtaagtgctacataatttgatattgaaaactggt 1776
 1777 gattatatacattttcttatcgcgaagtttcaattttgactgcactgatttctatgattat 1836
 1837 tgatgtaaaatattatatacatcttgtaatagaaaaataaattgacctctgttaagtttaata 1896
 1897 ttacaagaacttaagcattatcaaaagcttacaaccaccggttagctttattttattat 1956
 1957 tgattgcaagctataggacatattgatfaatggctctttgaccttacacagggcagaaatgt 2016
 2017 tatacagtcagataggaatggtttattatgatttgagcattttccaactttccaag 2076
 2077 attatcttaccatgttaaaattgattttttggggggtaaaacttggcatcatctttat 2136
 2137 gtatctttgggtcgttgtccagataacaatatttttatactttttagagatttggtt 2196
 2197 gttctgtgatttcaggcatgaagccatgtctgcctgcccacataattaaattaaaagggca 2256
 2257 atgaaagatttagctcctatttatgaaatttggtaaatatcatcttatttttggttca 2316
 2317 caaatttgattatcttcaatgtatgtcagacgaagaaaccacgcatgtgtaccagaa 2376
 2377 attcctggattaaacacattgtcactacttgtcatattgttagaggagggagggttaatc 2436
 2437 ggtcagctcttggtaatgctgttactgtcattgatatacaaaaatagtaaatgtcaactaaga 2496
 2497 gatattaataatatacagaaacgca 2519

注: RACE 引物用下划线标出, 终止密码子标为黑体

Note: Gene specific RACE primers were underlined, the stop code was in bold

图 1 马氏珠母贝 Rab 基因 cDNA 与推测的蛋白质序列

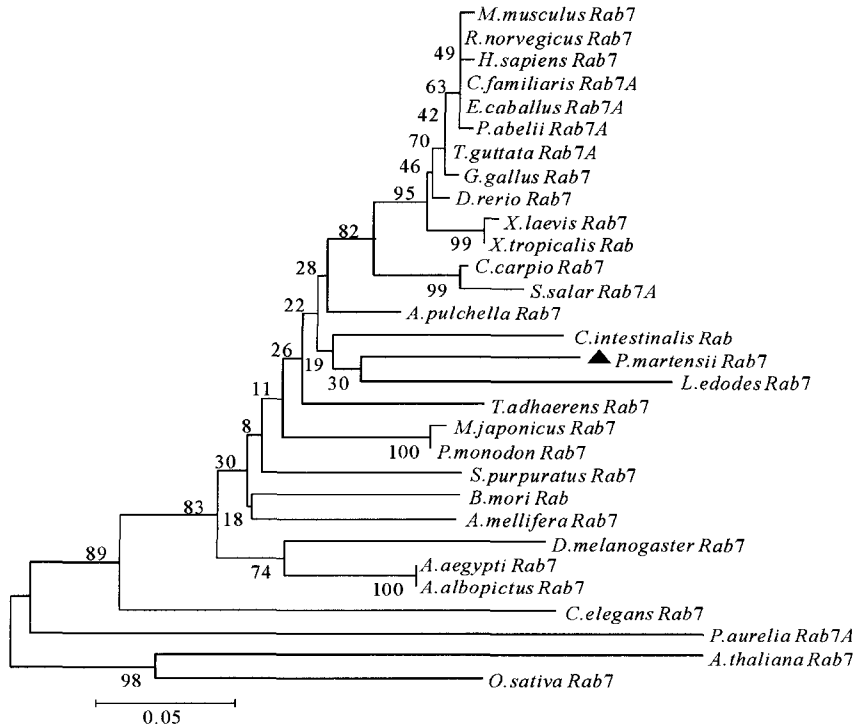
Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *P. martensii* Rab7 gene



Rab1A(NP_004152), Rab2A(NP_002856), Rab3B(NP_002858), Rab4A(NP_004569),
 Rab5A(NP_004153), Rab6A(NP_002860), Rab7(NP_004628), Rab8A(CAG47070), Rab9A(NP_004242) and Rab10(CAG33584)

图 2 马氏珠母贝 Rab 基因与人类 Rab 基因的聚类分支

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of Rab protein from *P. martensii* and *Homo sapiens*



注:进行聚类分析的物种包括埃及伊蚊、白纹伊蚊、海葵、蜜蜂、拟南芥、家蚕、秀丽广杆线虫、狗、玻璃海鞘、鲤鱼、斑马鱼、黑腹果蝇、马、红原鸡、人、香菇、日本囊对虾、小鼠、水稻、双小核草履虫、斑节对虾、苏门达腊猩猩、大鼠、大西洋鲑、紫色球海胆、斑胸草雀、丝盘虫、非洲爪蟾和热带蟾蜍

Note: Phylogenetic tree analysis includes species as following. *Aedes aegypti* Rab7 (EAT45215), *Aedes albopictus* Rab7 (ABL74414.1), *Aiptasia pulchella* rab7(JC8006), *Apis mellifera* Rab7 (XM_001120025), *Arabidopsis thaliana* Rab7(NM_102121), *Bombyx mori* Rab(NP_001040368.1), *Caenorhabditis elegans* Rab7(NM_064148), *Canis familiaris* Rab7A(NM_001003316), *Ciona intestinalis* Rab(XP_002128753.1), *Cyprinus carpio* Rab7(ACK77787.1), *Danio rerio* Rab7(BC054602), *Drosophila melanogaster* Rab7(NM_079748), *Equus caballus* Rab7A(XP_001488351.1), *Gallus gallus* Rab7(XP_414359.1), *Homo sapiens* Rab7(AF050175), *Lentinula edodes* Rab7(AAP13582.1), *Marsupenaeus japonicus* Rab7(BAG06944.1), *Mus musculus* Rab7(X89650), *Oryza sativa* Rab7(AY226827), *Paramecium aurelia* Rab7A(AY744503), *Penaeus monodon* Rab7(ABB70064.1), *Pongo abelii* Rab7A(NP_001127416.1), *Rattus norvegicus* Rab7(AB158428), *Salmo Salar* Rab7A(ACI33008.1), *Strongylocentrotus purpuratus* Rab7(NP_001116983.1), *Taeniopygia guttata* Rab7A(XP_002198172.1), *Trichoplax adhaerens* Rab7(XP_002108937.1), *Xenopus laevis* Rab7(BC077884), *Xenopus tropicalis* Rab(CR926163)

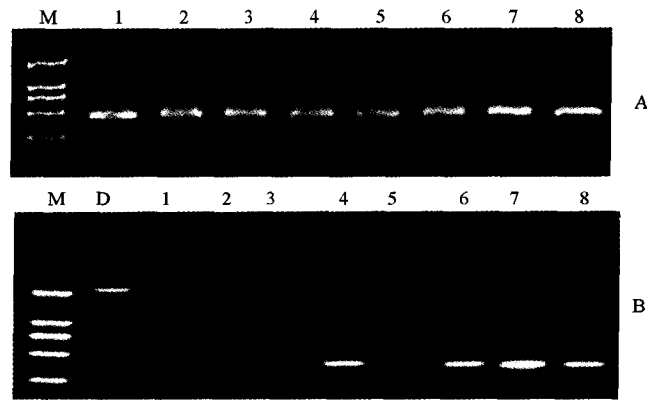
图 3 马氏珠母贝 Rab7 基因与其他物种同源物的聚类分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis among *P. martensii* Rab7 and homologies from other 29 species

3 讨论

3.1 马氏珠母贝 Rab 基因的同源性

Rab 家族有很多亚家族成员,大多数物种的研究结果显示,在同一物种具有数个至数十个 Rab 家族基因(Rutherford *et al.* 2002;Bock *et al.* 2001;Segev 2001)。Rab 家族成员具有 GTP/GDP 和 Mg^{2+} 作用位点、5 个保守的共有序列元件和开关 I (Switch I) 与开关 II(Quevillon *et al.* 2003; Stroupe *et al.* 2000; Ostermeier *et al.* 1999; Neu *et al.* 1997), C 末端的最末几个氨基酸以固定的几种模式存在: C、CC、CXC、CCXX、CXXX 和 CCXXX 型,其中半胱氨酸会进行异戊二烯化修饰,在细胞内膜的可逆定位过程中发挥至关重要的作用(吴文林等 2006;Pereira-Leal *et al.* 2001;Cremers *et al.* 1994)。本研究克隆的马氏珠母贝基因在 NCBI 网站上进行在线同源性查找的结果表明,其与 Rab 家族成员的相似性最高,而且拟编码的蛋白质具有 Rab 基因家族的全部保守结构域和作用位点以及 Rab 蛋白亚家族的(Rab subfamilies, RabSF) 保守序列



A. α -tubulin 基因在不同组织 cDNA 中的扩增; B. Rab7 基因组 DNA 在不同组织中的扩增

A. Amplified products of α -tubulin from tissues of *P. martensii*; B. Amplified products of Rab7 cDNA from tissues of *P. martensii*

注: M; DL2000; D; DNA; 1; 卵; 2; 鳃; 3; 足; 4; 肝; 5; 胃; 6; 血; 7; 血感; 8; 肝感

Note: M; DNA marker DL2000; D; DNA; 1; Mature egg; 2; Gill; 3; Tropoda; 4; Liver; 5; Stomach; 6; Blood; 7;

Blood from *Polydora ciliata* infected *P. martensii*; 8; Liver from *Polydora ciliata* infected *P. martensii*

图4 马氏珠母贝 Rab7 的 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of genomic DNA of *P. martensii* in different tissues

(表1)。因此,该基因可以确信是 Rab 家族的成员。

BlastX 结果表明,该马氏珠母贝 Rab 基因与其他物种的 Rab7 的氨基酸序列相似性最高,均大于 76%,其中 N 端比较保守,而 C 端序列的变异较大。与人的 Rab 家族不同成员的聚类分析结果也表明,马氏珠母贝 Rab 基因的氨基酸序列同人的 Rab7 亚家族成员的同源性最高。由此推测该基因为马氏珠母贝的 Rab7 基因。

马氏珠母贝 Rab7 亚家族基因聚类分析结果显示,其与玻璃海鞘和海葵距离较近,与脊椎动物以及原生动物的距离也与物种的进化关系基本一致,表明该基因在生物进化过程中承受了一定的选择压力,在马氏珠母贝中发挥了重要的功能。然而,距离最近的却是真菌界的香菇 *Lentinula edodes* Rab7 基因,二者在系统学上属于不同的界,应该比原生动物的距离更远。香菇 Rab7 基因的演化和物种进化上的不一致可能是该基因在香菇中的进化速度异常所致。

3.2 Rab7 的表达特征与功能

囊泡运输是细胞内物质运输的重要方式,在上、下游特异调节因子的共同作用下,Rab 蛋白参与了囊泡的形成、转运、锚定和融合等过程。Rab7 募集相关的溶酶体蛋白(Rab7-interacting lysosomal protein, RILP)和氧固醇结合蛋白相关蛋白 1L (Oxysterol-binding protein-related protein 1L, ORP1L),然后共同募集和活化马达分子动力蛋白,从而驱使晚期内体转运到微管负末端,调节晚期内体向液泡/溶酶体的转运(Johansson *et al.* 2007)。胆固醇水平调节(Bruckert *et al.* 2000)和甲状腺激素生产(Croizet-Berger *et al.* 2002)也与 Rab7 基因有关。Rab7 在不同细胞中的表达水平存在差异,可能与细胞的内吞活性有关(Rupper *et al.* 2001; Bruckert *et al.* 2000; Desjardins *et al.* 1994)。大多数 Rab 蛋白没有组织特异性,但是,也有少数 Rab 蛋白尽在某些组织或器官中表达,例如,人的某种 Rab 基因在胎肝、子宫和脑组织表达,但在心、胃、脑、肾、脾、卵巢和外周血等其他 20 多种组织不表达(陈萱茂等 2000);Rab3A 只在神经分泌细胞表达(Stenmark *et al.* 2001);组织特异性表达暗示这些 Rab 亚家族成员具有独特的作用。研究表明,Rab 基因的表达不足或者过度会导致肿瘤或者癌症等病变(He *et al.* 2002; 刘芳莉等 2001; Culine *et al.* 1994)。用反义寡核苷酸阻断 Rab 基因在幼体神经元的表达会使树突和轴突的生长受到抑制(陈萱茂等 2000)。在抗病日本对虾中 Rab 的表达有所上升,推测 Rab 蛋白可能参与了对虾的免疫过程(Pan *et al.* 2005)。RT-PCR 检测结果显示,马氏珠母贝 Rab7 基因在鳃、足和胃中没有表达,无论是否感染蕾贝才女虫的马氏珠母贝的肝脏和血液中均有较强表达,成熟卵中表达较弱,这种表达的组织差异性与肝脏和血液是马氏珠母贝的免疫组织有一定的关系,暗示 Rab7 基因可能参与了对马氏珠母贝细胞的内吞和免疫抗性。进一步的免疫荧光和免疫电镜等方面

的研究将有助于揭示其确切的生物学功能。

参 考 文 献

- 石耀华,王 嫣,顾志峰,侯战辉,王爱民. 2007. 马氏珠母贝核糖体蛋白 S13 基因的克隆和序列分析. 湖南科技学院学报, (4): 79~82
- 石耀华,洪 葵,郭希明,王 嫣,侯战辉,顾志峰,王爱民. 2008. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选. 水产学报, 32(2): 174~181
- 刘芳莉,高凌寒,李 钰,傅松滨,李 璞. 2001. Rad5A 正义表达载体对两种人肺腺癌细胞系黏附基底膜成分能力的影响. 哈尔滨医科大学学报, 3(5): 327~329
- 吴文林,吴穗洁. 2006. Rab 蛋白的结构、功能与研究展望. 台湾海峡, 25(4): 599~605
- 吴文林,戴聪杰,袁建军. 2007. 日本对虾 Rab 基因的克隆, 结构分析与重组表达. 泉州师范学院学报(自然科学), 25(2): 102~107
- 陈萱茂,孙朝辉,应 康,谢 毅. 2000. Rab 家族基因的背景资料. 云南大学学报(自然科学版), 21: 373
- 聂 宇,李江姣,梁爱华,杨 欣,张志云,王 伟. 2008. EoRab43 为八肋游仆虫中编码非典型 Rab 的基因. 动物学报, 54(1): 128~135
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., and Scheller, R. H. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, 409: 839~841
- Bruckert, F., Laurent, O., and Satre, M. 2000. Rab7, a multifaceted GTP-binding protein regulating access to degradative compartments in eukaryotic cells. *Protoplasma*, 210: 108~116
- Cremers, F. P., Armstrong, S. A., Seabra, M. C., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. 1994. REP22, a Rab escort protein encoded by the choroideremia-like gene. *J. Biol. Chem.* 269(3): 2 111~2 117
- Croizat-Berger, K., Daumerie, C., Couvreur, M., Courtoy, P. J., and van den Hove, M. F. 2002. The endocytic catalysts, Rab5a and Rab7, are tandem regulators of thyroid hormone production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 8 277~8 282
- Culine, S., Honore, N., Closson, V., Droz, J. P., Extra, J. M., Marty, M., Tavitian, A., and Olofsson, B. 1994. A small GTP-binding protein is frequently overexpressed in peripheral blood mononuclear cells from patients with solid tumours. *Eur. J. Cancer*, 30A(5): 670~674
- Desjardins, M., Huber L. A., Parton, R. G., and Griffiths, G. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* 124: 677~688
- Dumas, J. J., Zhu, Z., Connolly, J. L., and Lambright, D. G. 1999. Structure basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure*, 7(4): 413~423
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., and Goud, B. 1998. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science*, 279(5 350): 580~585
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., Goud, B., Gallwitz, D., Donath, C., and Sander, C. 1983. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product. *Nature*, 306: 704~707
- He, H., Dai, F., Yu, L., She, X., Zhao, Y., Jiang, J., Chen, X., and Zhao, S. 2002. Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues. *Gene Expr.* 10(5-6): 231~242
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M., and Neefjes, J. 2007. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150 Glued, ORP1L and the receptor III spectrin. *J. Cell Biol.* 176: 459~471
- Neu, M., Brachvogel, V., Oschkinat, H., Zerial, M., and Metcalf, P. 1997. Rab7; NMR and kinetics analysis of intact and C-terminal truncated constructs. *Proteins*, 27(2): 204~209
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21(1): 205~215
- Ostermeier, C., and Brunger, A. T. 1999. Structural basis of Rab effector specificity; Crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96(3): 363~374
- Pan, D., He, N. H., Yang, Z. Y., Liu, H. P., and Xu, X. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 103~112
- Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313(4): 889~901
- Quevillon, E., Spielmann, T., and Brahimi, K. 2003. The Plasmodium falciparum family of Rab GTPases. *Gene*, 306: 13~25
- Rupper, A., Grove, B., and Cardelli, J. 2001. Rab7 regulates phagosome maturation in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* 114: 2 449~2 460
- Rutherford, S., and Moore, I. 2002. The arabidopsis Rab GTPase family; Another enigma variation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(6): 518~528
- Segev, N. 2001. Ypt and Rab GTPases; Insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 500~511
- Stenmark, H., and Olkkonen, V. M. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2(5): 1~7
- Stroupe, C., and Brunger, A. T. 2000. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* 304 (4): 585~598
- Touchot, N., Chardin, P., and Tavitian, A. 1987. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy; molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 (23): 8 210~8 214