

# 八肋游仆虫 *Rab* 家族基因克隆和多样性分析

李江姣<sup>①</sup> 聂宇<sup>①②</sup> 许静<sup>①</sup> 王伟<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup> 山西大学生物技术研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006;

<sup>②</sup> 北京协和医学院 中国医学科学院 阜外心血管病医院 卫生部心血管疾病再生医学重点实验室 北京 100037)

**摘要:** Rab 蛋白是在真核细胞内膜泡运输过程中起重要调节作用的一类小分子 Ras-like 蛋白,为 Ras 超家族中最大的家族。Rab 家族成员在不同的生物中表现出数量的多样性和功能上的分化。为进一步了解 Rab 蛋白的多样性及其在真核细胞内膜泡运输网络中的功能,本研究利用游仆虫大核染色体特异的端粒结构和基因大小的染色体结构特征,通过简并引物 PCR 方法从八肋游仆虫 (*Euplotes octocarinatus*) 中克隆到 9 种新的 *Rab* 基因,分别为 *EoRab1A*、*EoRab2b*、*EoRab2c*、*EoRab2d*、*EoRab6*、*EoRab7*、*EoRab2-like*、*EoRabL2* 和 *EoRan* (GenBank 登陆号为 HM371131 ~ HM371139)。序列分析表明,游仆虫中 *Rab* 基因家族成员既包括具有维持细胞结构核心功能保守基因,又包括为适应环境而进化出的特殊功能的新基因。  
**关键词:** 八肋游仆虫; Rab; 克隆; 多样性; 膜泡运输

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)06-01-08

## Cloning and Diversity Analysis of *Rab* Family Genes from *Euplotes octocarinatus*

LI Jiang-Jiao<sup>①</sup> NIE Yu<sup>①②</sup> XU Jing<sup>①</sup> WANG Wei<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup> Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006;

<sup>②</sup> Research Center for Cardiovascular Regenerative Medicine, The Ministry of Health of China, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

**Abstract:** Rab proteins constitute the largest subfamily of the Ras superfamily of small GTPase and regulate different vesicular trafficking pathway in eukaryotic cells. The number and function of Rab family proteins display divergences in different species. In order to understand the diversity of *Rab* gene, 9 new *Rab* genes, *EoRab1A*, *EoRab2b*, *EoRab2c*, *EoRab2d*, *EoRab6*, *EoRab7*, *EoRab2-like*, *EoRabL2* and *EoRan* (GenBank accession no. HM371131 - HM371139), were obtained from the ciliate *Euplotes octocarinatus*. Sequences analysis showed that the *Rab* gene family contains not only evolutionary conservative core function genes, but also function-specific genes in *Euplotes*.

**Key words:** *Euplotes octocarinatus*; Rab; Cloning; Diversity; Vesicular transport

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30770295, 31072000), 山西省自然科学基金项目 (No. 2008011063), 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划资助项目;

\* 通讯作者, E-mail: gene@sxu.edu.cn;

第一作者介绍 李江姣,女,博士研究生;研究方向:细胞分子生物学;E-mail:lijiangjiao@126.com。

收稿日期:2010-06-10, 修回日期:2010-08-28

Rab 蛋白家族属于 Ras GTP 酶超家族(该超家族包括 Ras、Rho、Rab、Ran 和 Arf 5 个蛋白家族)成员,在真核细胞的膜泡运输过程中发挥关键的调控作用。目前已从人类细胞中鉴定出超过 150 种的 Ras 超家族成员<sup>[1]</sup>,其中 Rab 家族成员达 70 余种<sup>[2]</sup>,占到了 Ras 超家族成员一半,是最大的分支家族。不同 Rab 家族蛋白能够与其特定细胞器膜上的效应子相互作用进而介导膜泡定位于不同的细胞器上,在不同膜泡运输途径中发挥作用。随着越来越多不同生物全基因组测序的完成,研究发现不同生物基因组中编码 Rab 蛋白的基因数目不同,并且 Rab 基因的数量与生物体的细胞数量以及生物类群的进化地位没有直接的相关性。线虫(*Caenorhabditis elegans*)约有 1 000 个细胞,果蝇(*Drosophila melanogaster*)有 30 亿个细胞,但这两种生物中同样含有 29 种 Rab 基因;溶组织内阿米巴虫(*Entamoeba histolytica*)作为单细胞生物却拥有 91 种编码 Rab 蛋白的基因<sup>[3]</sup>。因此,对 Rab 基因家族进行多样性和进化的分析有利于进一步了解 Rab 家族基因的功能和膜泡运输的分子机制。

原生动物的内膜系统的组成和结构上与高等真核生物相比存在较大差异,分析原生动物的 Rab 蛋白多样性对全面理解真核细胞的内膜结构及囊泡转运机制具有重要意义。八肋游仆虫(*Euplotes octocarinatus*)是一种纤毛门单细胞原生动物<sup>[4]</sup>,我们已从八肋游仆虫中克隆获得了多种编码 Rab 蛋白的基因(命名为 *EoRab* 基因),并对部分基因的编码蛋白进行了抗体制备及细胞定位分析<sup>[5-11]</sup>;但之前获得的 *EoRab* 基因只涵盖了 *Rab1*、2、8、11、43 5 个亚家族。为了进一步了解游仆虫中 Rab 基因家族的多样性,分析其在细胞内膜泡运输网络中的功能,本研究依据 Rab 家族蛋白保守区的氨基酸序列设计简并性引物,利用 PCR 方法从游仆虫大核基因组中克隆筛选得到了 9 种新的 Rab 基因,并对其进行了序列分析。结果表明,游仆虫中 Rab 基因家族成员既包括具有维持细胞结构核心功能的保守基因,又包括为适应环境而

进化出的特殊功能的新基因。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株和质粒** 八肋游仆虫(德国明斯特大学 Heckman K 教授惠赠)由本实验室培养;绿梭藻虫(*Chlorogonium elongatum*)由本实验室培养,用于饲喂游仆虫;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  为本实验室保存;pGEM<sup>®</sup> Teasy Vector System I 购于美国 Promega 公司。

**1.2 试剂和工具酶** DNA 回收试剂盒(Gel Extraction Mini Kit)和质粒抽提试剂盒(Plasmid Mini Kit)购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;*Taq* DNA 聚合酶购于大连 TaKaRa 公司;核酸分子量标准(DNA Marker)为北京天根生化科技公司产品;PCR 引物合成由 TaKaRa 公司完成;DNA 序列测定由北京奥科生物公司完成;LB 培养基所用的 Tryptone、Yeast Extract、Sodium Chloride、Agar 购于上海 Sangon 公司;氯霉素青霉素为华美生物工程公司产品。

**1.3 八肋游仆虫培养** 实验材料八肋游仆虫大量培养于 SMB 培养液中,以绿梭藻虫为食物,生长温度为 22 $^{\circ}$ C<sup>[12]</sup>。

**1.4 八肋游仆虫大核 DNA 的制备** 游仆虫大核 DNA 提取见参考文献<sup>[13]</sup>,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

**1.5 *EoRab* 基因 5'端序列文库的构建** 游仆虫大核中每个基因两端都具有相同的端粒序列(telomitic sequence, C<sub>4</sub>A<sub>4</sub>C<sub>4</sub>A<sub>4</sub>C<sub>4</sub>A<sub>4</sub>C<sub>4</sub>),本实验据此设计端粒引物 Telo(引物序列为:CCCCAAAACCCCAAAAACCCCAAAAAC);根据 Rab 家族蛋白结构中 GTP 结合区 G3 的氨基酸序列(WDTAGQE)<sup>[14]</sup>设计简并性引物 P1(引物序列为 CTTTCTTGWCCWGCWGTATCCC,其中 W 为 A/T)。以 P1、Telo 为引物,游仆虫大核 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,48 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 10 min;共 30 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化,将目的片段克隆于 pGEM<sup>®</sup> Teasy 载体中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,构建游仆虫中 Rab 基因的 5'端序列文库。

**1.6 *EoRab* 基因全序列的克隆** 挑取基因片

段文库中的大肠杆菌菌落,提取质粒,以 P1、Telo 为引物进行 PCR 鉴定,将阳性结果测序;各个测得的序列运用 Blast X 工具在 GenBank 数据库中搜索,将其中与 Rab 蛋白 N 端同源的序列筛选出来,据此设计各个 *EoRab* 基因 5' 端特异引物 P2;应用各个 *EoRab* 的 5' 端特异引物 P2 与 Telo 引物从大核基因组中进行扩增,得到了从该基因上游到端粒的序列,但扩增的结果往往是非特异性扩增多,不能实现对目的条带的回收。继续根据 5' 端序列设计巢式引物 P3,以 5' 端特异引物和 Telo 的 PCR 产物为模板,以 5' 端巢式引物 P3 和 Telo 再次进行 PCR,结果获得了特异性目的条带,产物回收后克隆于 pGEM® Teasy 载体中测序,以此获得相应 *EoRab* 基因的 3' 端序列。各序列的 5' 端特异引物 P2 及巢式引物 P3 的序列见表 1。3' 端序列的测序结果与 5' 端序列对接便获得了 *EoRab* 基因的全序列。*EoRab* 基因全序列的克隆策略见图 1。

表 1 *EoRab* 基因全序列扩增中所用的特异引物及巢式引物

Table 1 Specific and nest primers of *EoRabs* PCR amplification

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences
EoRab1A P2	GCACATATGAAGGAGACTACAGATC
EoRab1A P3	CAATTATTGTTGATGAGATTCTG
EoRab2b P2	ATGGAAAGCAAAGCAATAGATGAA
EoRab2b P3	CTTATTATTATCGGAGATTCAGGAG
EoRab2c P2	CTAACTATAGGTGTGCAATTTGGATC
EoRab2c P3	CGAATTTGGATCAATACTTTTCAAGACTG
EoRab2d P2	GTCCGAAAATCATGCTTAC
EoRab2d P3	CAATTGGAGTTGAGTTTGGAC
EoRab2-like P2	CATGTTTTGAGAAAATGCTGTTGG
EoRab2-like P3	CTGTTACGAAGATTTACTGGAGAC
EoRabL2 P2	CATTTTATTGGGAGATTCAGCAGTTG
EoRabL2 P3	CTTGATGATTATGAGGAGAGAAC
EoRab6 P2	ATGGCAGATTTTGTGTCGG
EoRab6 P3	CGGACGCATTATACCAATCTTCATC
EoRab7 P2	CTAATAATAGGTGATGTTGCATGAGG
EoRab7 P3	GCATGAGGAAAAACATCTATTCTGAAC
EoRan P2	CTAGTCAAGTACCAGATTTCAAAG
EoRan P3	GTGCAGGAGAGATTAACCTCATGG

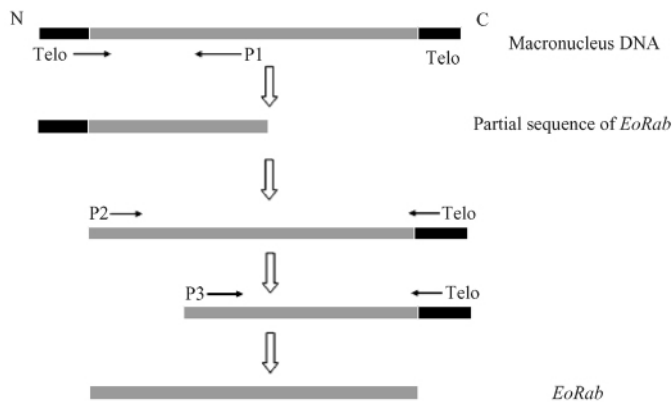


图 1 *EoRab* 基因全序列的克隆策略

Fig. 1 The PCR walking strategy for amplification of *EoRab* from macronucleus DNA

“Macronucleus DNA”表示 *EoRab* 的大核 DNA 序列;“Partial sequence of *EoRab*”表示 *EoRab* 基因的部分序列;“*EoRab*”表示 *EoRab* 基因。

1.7 *EoRab* 基因拟编码氨基酸序列分析 使用 CLUSTAL W (1.83) 软件对克隆到的 9 种 *EoRab* 拟编码的氨基酸序列进行比对分析。运用 DNASTar 软件进行 15 种 *EoRab* 基因拟编码氨基酸序列的一致性分析。采用 MEGA4 软件

中的邻接法 (neighbor-joining method, NJ 法) 进行 15 种 *EoRab* 蛋白的聚类分析,bootstrap 值为重复 1 000 次。

## 2 结果

### 2.1 9 种 *EoRab* 基因的克隆 游仆虫中 *Rab*

基因的 5' 端序列文库中挑取白色菌落加以鉴定, 获得了 36 个长度为 300 bp 左右的基因片段(图 2), 测序鉴定。各个测得的序列运用 Blast X 工具搜索 GenBank 数据库分析, 发现有 9 个序列片段与数据库中的 Rab 蛋白 N 端同源, 据此设计各个 *EoRab* 基因 5' 端特异引物;

应用各个 *EoRab* 的 5' 端特异引物 P2 及巢式引物 P3 与 Telo 引物从大核基因组中进行扩增, 获得相应 *EoRab* 基因的 3' 端序列, 克隆到 pGEM® Teasy 载体中测序; 测序结果与 5' 端序列对接便获得了 9 种 *EoRab* 基因的全序列(图 3)。

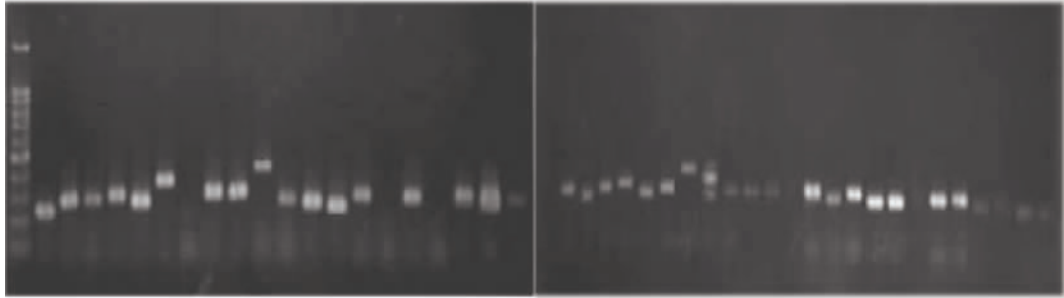


图 2 *EoRab* 基因 5' 端序列片段文库的 PCR 鉴定图

Fig. 2 Identification of *EoRab* gene fragments by PCR amplification

第一泳道为 100 bp DNA 分子量标准, 其余各泳道为扩增到的不同 *EoRab* 基因 5' 端部分片段。

Lane 1 was 100 bp DNA marker, PCR products in the other lanes indicate different *EoRab* gene fragments.

**2.2 9 种 *EoRab* 基因的鉴定** 将克隆到的 9 种 *EoRab* 基因分别通过 Blast X 搜 GenBank 数据库, 主要以人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*) 等生物中已鉴定的 Rab 蛋白为参照, 对八肋游仆虫中的这 9 种 *EoRab* 基因进行了系统命名, 分别为: *EoRab1A*, *EoRab2b*, *EoRab2c*, *EoRab2d*, *EoRab6*, *EoRab7*, *EoRab2-like*, *EoRabL2*, 以及 *EoRan*; 这 9 种 *EoRab* 基因拟编码的氨基酸序列及比对见图 3。从中我们可以看出 *EoRab* 基因拟编码的蛋白质都具有 GDP/GTP 结合区 (G1 ~ G5), RabF 保守区 (RabF1 ~ RabF5) 以及 Rab 蛋白特有的 C 端半胱氨酸模序 (Cys motif); 而 *EoRab2-like*、*EoRabL2* 以及 *EoRan* 拟编码的蛋白不具有 Cys motif。

**2.3 游仆虫中 *Rab* 基因的多样性** 结合我们先前的工作, 从八肋游仆虫中获得了 15 种编码 Rab 蛋白的基因。序列比对分析显示, 这 15 个基因拟编码蛋白的氨基酸序列相互之间的差异显著(图 4), 证明它们为不同的 *EoRab* 基因, 在游仆虫细胞中 *Rab* 基因具有多样性。根据 Blast X 工具的搜索结果, 我们将这 15 种 *EoRab* 基因划分到了 8 种 Rab 亚家族, 即 *Rab1*, 2, 6,

7, 8, 11, *Rab-like* 和 *Ran*。图 5 为对 15 种 *EoRab* 基因拟编码蛋白的聚类分析。

### 3 讨论

Rab 蛋白作为 Ras 超家族最大的分支家族, 成员众多, 功能多样, 保守区特征显著。表 2 列出几种不同物种 *Rab* 基因家族成员的数量, 裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 仅有 7 种编码 Rab 蛋白的基因, 是已知 Rab 家族基因种类最少的生物, 其中的 6 种 Rab 与其他生物中的 Rab 在序列与功能上具有不同程度的保守性, 分别对应于哺乳动物中的 Rab1、2、5、6、7、11 亚家族。这 6 个亚家族成员可能代表真核生物 Rab 蛋白进化过程中最基本的功能, 也是真核生物维持正常生理功能所需的 Rab 最少数目, 因此称之为核心 Rab (core Rabs)<sup>[15]</sup>。本研究克隆的 9 种编码 Rab 蛋白的新基因, 通过同源性分析对其进行了系统命名。结合本课题组之前的实验结果, 我们共获得了 15 种 *EoRab* 基因, 分别隶属于 Rab1、2、6、7、8、11、*Rab-like* 和 *Ran* 8 个亚家族, 除了没有筛选到 *EoRab5* 蛋白亚家族的基因, 基本涵盖了所有的

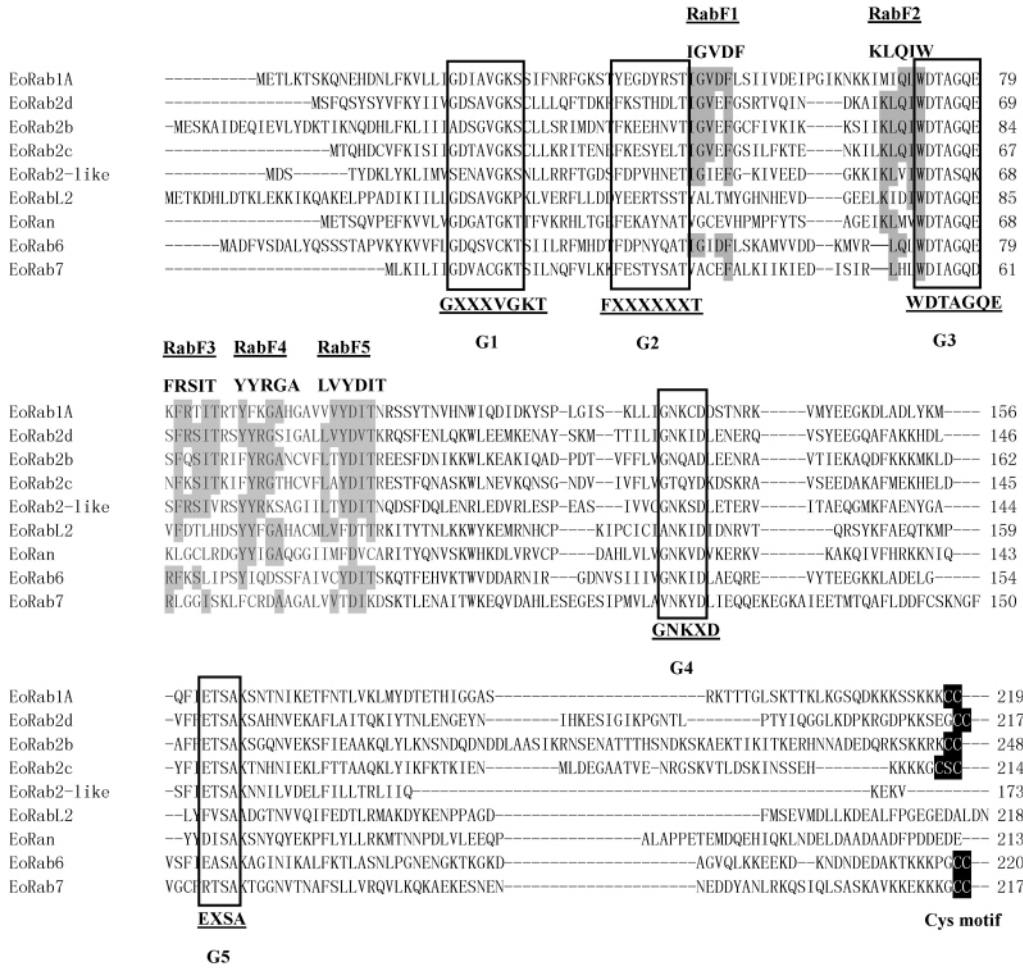


图 3 9 种 *EoRab* 拟编码的氨基酸序列及比对结果

Fig. 3 Multiple alignments of 9 *EoRabs* deduced amino acid sequence

长方框括入的区域为 GDP/GTP 结合区 (G1 ~ G5), 该区域的保守序列标注于方框的底部。RabF 区保守的氨基酸 (RabF1 ~ RabF5) 用灰色背景色突出显示, 该区域主要的保守序列标注于比对序列的上方。C 端 Cys 模序用黑色背景突出显示。

The GDP/GTP binding domains (G1 - G5) are boxed, and the prototypical sequence for each of the G domain is indicated on the bottom of the alignment. The RabF conserved residues are highlighted in gray. The prototypical sequence for each of the RabF motifs is indicated on the top of the alignment. The Cys motifs are highlighted in black.

核心 Rab 蛋白基因。这些核心 Rab 亚家族成员在内吞、分泌、细胞内膜泡运输以及细胞核质之间物质运输途径中具有保守的重要作用, 表明游仆虫内具有完善的内膜系统和膜泡运输途径<sup>[15-17]</sup>。

Ran 蛋白能够调控细胞核与细胞质之间穿越核膜的大分子运输, 并在有丝分裂中纺锤体的组装、有丝分裂后期核膜的组装等方面发挥重要作用<sup>[22]</sup>。早先 Ran 蛋白作为 Ras 超家族

中的一个家族 (Ran family) 独立分类, 近来的研究表明 Ran 应该作为一种 Rab-like 蛋白划分到 Rab 家族<sup>[1-2]</sup>。Rab-like 蛋白的最大特点就是氨基酸序列与 Rab 蛋白同源, 只是不具备 C 末端的 Cys motif。目前多数 Rab-like 蛋白的功能没有得到合理的解释, 该类基因在纤毛虫中的研究, 为我们阐明 Rab-like 蛋白的功能提供了新的途径。

*Rab* 基因的多样性与细胞内膜系统的复杂

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	■	27.4	30.5	33.2	34.1	29.8	33.0	35.4	21.5	31.8	25.7	37.7	35.9	29.7	21.5	1
2	--	■	26.0	26.0	26.0	21.2	24.5	29.1	18.8	26.9	21.6	30.8	25.5	27.9	17.3	2
3	--	--	■	36.2	32.6	33.5	37.2	37.7	16.9	27.6	22	30.2	36.7	32.1	24.3	3
4	--	--	--	■	42.2	42.3	57.3	42.9	25.1	31.2	28.4	38.2	37.7	34.4	20.1	4
5	--	--	--	--	■	47.9	41.3	40.0	19.2	26.2	22.9	34.0	39.7	30.6	22.4	5
6	--	--	--	--	--	■	39.5	34.3	17.7	28.4	26.5	31.1	37.7	32.5	22.9	6
7	--	--	--	--	--	--	■	42.9	23.9	29.8	27.5	34.4	40.8	30.6	22.9	7
8	--	--	--	--	--	--	--	■	24.0	34.9	24.6	38.9	35.4	32.0	24.0	8
9	--	--	--	--	--	--	--	--	■	21.0	16.1	19.8	23.7	19.1	25.7	9
10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	■	29.4	32.5	28.1	34.9	19.2	10
11	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	■	28.8	25.7	24.4	18.7	11
12	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	■	35.4	31.6	18.4	12
13	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	■	33.0	22.0	13
14	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	■	17.7	14
15	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	■	15
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	

图 4 15 种 *EoRab* 基因拟编码氨基酸序列的一致性分析

Fig. 4 Percentage identity of deduced amino acid sequences of 15 *EoRabs*

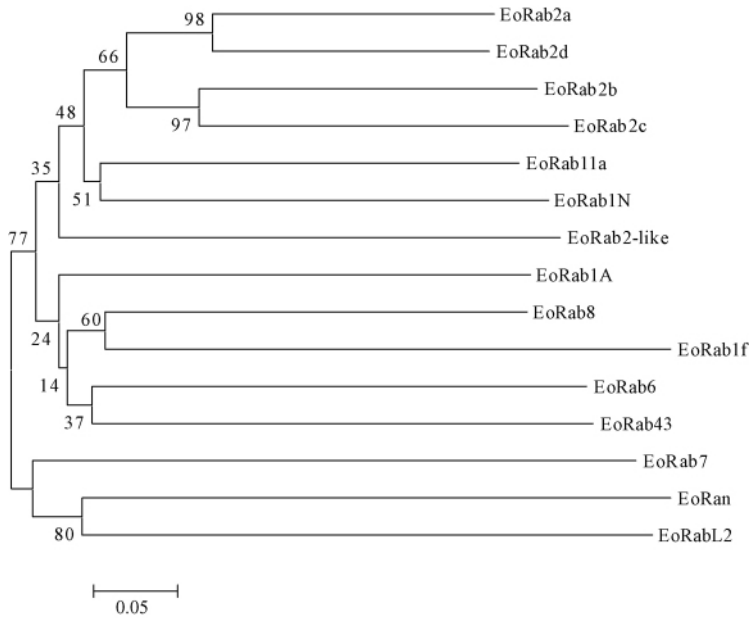


图 5 15 种 *EoRab* 拟编码蛋白氨基酸序列的聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of 15 *EoRabs* deduced amino acid sequences

标尺表示进化距离为每个位点发生 0.05 个碱基替换。分支处数字表示 bootstrap 支持率。

Scale bar indicates a genetic distance of 0.05 nt substitutions per site.

Numbers in the nodes of cladogram indicate bootstrap probabilities.

性密切相关。对恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、盘基网星菌虫 (*Dictyostelium discoideum*)、阴道毛

滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*)、溶组织内阿米巴虫等细胞内 Rab GTPases 的多样性进行分析, 结

表 2 不同物种细胞内 *Rab* 家族基因的数量Table 2 The number of *Rab* genes in different species

物种 Species	<i>Rab</i> 家族基因的数量 The number of <i>Rab</i> genes	细胞数目 The number of cells	参考文献 References
裂殖酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7	单细胞生物	
芽殖酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11	单细胞生物	
蓝氏贾第虫 <i>Giardia lamblia</i>	8	单细胞生物	
恶性疟原虫 <i>Plasmodium falciparum</i>	11	单细胞生物	
布氏锥虫 <i>Trypanosoma brucei</i>	16	单细胞生物	
盘基网星菌虫 <i>Dictyostelium discoideum</i>	54	单细胞生物	
阴道毛滴虫 <i>Trichomonas vaginalis</i>	65	单细胞生物	[3, 14 - 15 ,
四膜虫 <i>Tetrahymena thermophila</i>	69	单细胞生物	18 - 21 ]
溶组织内阿米巴虫 <i>Entamoeba histolytica</i>	91	—	
海绵 <i>Suberites domuncula</i>	26	959 个细胞	
线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	29	959 个细胞	
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	29	30 亿个细胞	
人类 <i>Homo sapiens</i>	>70	500 ~ 600 万亿个细胞	
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	57	—	

“—”表示没有相关数据。“—”Indicates no relevant data.

果显示如上生物的基因组中分别含有 11、16、54、65、69、91 个编码不同 *Rab* 蛋白成员的基因,并且这些生物中的部分 *Rab* 蛋白不能划分到任何根据多细胞生物鉴定的 *Rab* 亚家族<sup>[3, 14-15, 18, 20]</sup>。这些数据一方面体现了原生动动物由于进化起源早而呈现的巨大歧异度。另一方面则表明,某些原生动动物由于生活环境特殊,在进化过程中导致某些细胞器之间膜泡运输调节功能的缺失,而另一些原生动动物则需要更为复杂的内膜系统来完成其生理机能。因此,分析原生动动物中的 *Rab* 蛋白的功能对理解原生动动物的进化及生理调节机制有重要的意义。在之前的工作中我们也从游仆虫基因组中克隆到一种游仆虫所特有 *Rab* 蛋白基因——*EoRab43*<sup>[9]</sup>,该基因编码蛋白在游仆虫细胞内定位于大核染色体内侧胞质中,表明游仆虫细胞的大核周围可能存在与该生物某些特殊生理功能相关的特定膜泡运输途径<sup>[10]</sup>。

通过比较多种原生动动物中的 *Rab* 基因家族成员的数量,我们发现,原生动动物中 *Rab* 基因数量的多少与其生活方式可能有一定关系,例如阴道毛滴虫、溶组织内阿米巴虫和盘基网星菌虫都存在阿米巴运动现象,其细胞内编码 *Rab*

的基因就多达 54 ~ 91 种;而不存在阿米巴运动的寄生原生动动物则只拥有 8 ~ 16 种 *Rab* 基因,其中被认为是最原始的原生动动物的蓝氏贾第虫就只拥有 8 种 *Rab* 基因<sup>[3, 15, 20]</sup>。目前在游仆虫中已鉴定出了 15 种 *Rab* 基因,与游仆虫同属纤毛门,同样营自由生活的四膜虫拥有 69 种 *Rab* 基因<sup>[18]</sup>,这提示游仆虫中仍含有未发现的新的 *Rab* 基因,游仆虫中 *Rab* 家族的丰富度到底如何? 这些新的蛋白在细胞内膜调控中确切的功能是什么? 有待今后进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Wennerberg K, Rossman K L, Der C J. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 2005, 118(5): 843 - 846.
- [2] Schwartz S L, Cao C, Pylypenko O, et al. *Rab* GTPases at a glance. *J Cell Sci*, 2007, 120(22): 3905 - 3910.
- [3] Saito-Nakano Y, Loftus B J, Hall N, et al. The diversity of *Rab* GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*, 2005, 110(3): 244 - 252.
- [4] Prescott D M. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev*, 1994, 58(2): 233 - 267.
- [5] 樊俊蝶,王伟,柴宝峰,等. 游仆虫 *Rab* 蛋白基因的克隆表达及纯化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(2): 200 - 205.

- [6] 智慧,柴宝峰,梁爱华,等. 游仆虫 Rab 家族成员 *Eorab1f* 的基因克隆、表达及多克隆抗体制备. 动物学报, 2005, 51(2): 314 - 319.
- [7] 李凌燕,柴宝峰,梁爱华,等. 八肋游仆虫 Rab 家族新成员 *Eo-rab-1N* 基因的克隆与序列分析. 遗传, 2006, 28(4): 437 - 442.
- [8] 聂宇,李江蛟,党旭红,等. 八肋游仆虫中 *EoRab2a* 基因的克隆与序列分析. 水生生物学报, 2008, 32: 105 - 109.
- [9] 聂宇,李江蛟,梁爱华,等. *EoRab43* 为八肋游仆虫中编码非典型 Rab 的基因. 动物学报, 2008, 54(1): 128 - 135.
- [10] 李江蛟,聂宇,梁爱华,等. *EoRab43* 参与游仆虫细胞内大核周围的物质运输. 分子细胞生物学报, 2009, 42(1): 35 - 42.
- [11] Li J, Nie Y, Dang X, et al. Characterization of a Rab11 homologue, *EoRab11a*, in *Euplotes octocarinatus*. FEMS Microbiol Lett, 2009, 292(2): 222 - 230.
- [12] Schulze D H, Freiburg M, Heckmann K. The isolation of gametes 3 and 4 of *Euplotes octocarinatus*. Eur J Biochem, 1987, 168(1): 89 - 94.
- [13] Tan M, Heckmann K, Brunen-Nieweler C. The micronuclear gene encoding a putative aminoacyl-tRNA synthetase cofactor of the ciliate *Euplotes octocarinatus* is interrupted by two sequences that are removed during macronuclear development. Gene, 1999, 233(1/2): 131 - 140.
- [14] Quevillon E, Spielmann T, Brahim K, et al. The *Plasmodium falciparum* family of Rab GTPases. Gene, 2003, 306: 13 - 25.
- [15] Ackers J P, Dhir V, Field M C. A bioinformatic analysis of the RAB genes of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, 2005, 141(1): 89 - 97.
- [16] Pereira-Leal J B, Seabra M C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. J Mol Biol, 2001, 313(4): 889 - 901.
- [17] Stenmark H, Olkkonen V M. The Rab GTPase family. Genome Biol, 2001, 2(5): 1 - 7.
- [18] Eisen J A, Coyne R S, Wu M, et al. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. PLoS Biol, 2006, 4(9): e286.
- [19] Cetkovic H, Mikoc A, Muller W E, et al. Ras-like small GTPases form a large family of proteins in the marine sponge *Suberites domuncula*. J Mol Evol, 2007, 64(3): 332 - 341.
- [20] Lal K, Field M C, Carlton J M, et al. Identification of a very large Rab GTPase family in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol, 2005, 143(2): 226 - 235.
- [21] 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 Mol Biol, 2000, 301(4): 1077 - 1087.
- [22] Joseph J. Ran at a glance. J Cell Sci, 2006, 119(17): 3481 - 3484.