

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.01233

文昌鱼 *AmphiRab23b* 基因的克隆、进化分析及表达模式

李建伟, 林浴霜, 陈冬艳, 张红卫

山东大学生命科学院, 济南 250100

摘要: Hedgehog 信号通路在胚胎发育过程中发挥着重要作用, 同时与多种肿瘤的发生密切相关。Rab23 蛋白在 Hedgehog 信号通路中扮演着十分重要的角色。目前关于文昌鱼 *Rab23* 同源基因的研究仅局限于佛罗里达文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 基因组中的注释。文章首次克隆了中国文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) *Rab23b* 基因 (*AmphiRab23b*) cDNA 全序列, 对其演绎的蛋白序列进行了序列比对、进化树分析以及基因时空表达分析。研究结果显示, 文昌鱼 *AmphiRab23b* 基因的 cDNA 总长为 2 062 bp (包括 UTR 区), 其中开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 714 bp, 编码 237 个氨基酸; 虽然在进化树中不属于脊椎动物 Rab23 进化支, 但是 *AmphiRab23* 具有保守的 Rab23_lke 结构域, 暗示该基因在进化过程中可能在功能上是保守的。时空表达的研究结果进一步显示, *AmphiRab23b* 基因在胚胎发育中的神经板和消化道中表达, 与其脊椎动物同源基因的表达模式相似, 这说明该基因可能对文昌鱼神经系统和消化道的发育有重要作用。

关键词: 文昌鱼; *AmphiRab23*; 进化; 表达

Isolation, phylogenetic analysis and developmental expression pattern of *AmphiRab23b* in amphioxus

LI Jian-Wei, LIN Yu-Shuang, CHEN Dong-Yan, ZHANG Hong-Wei

School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: The hedgehog (Hh) pathway plays an important role during the embryonic development and is related to the progression of cancers. Rab23 is a crucial functional molecule in Hh pathway. However, there is no report about amphioxus Rab23 up to now except the annotations of two isoforms in the genome of Florida lancelet (*Branchiostoma floridae*). Here a 2062 bp full-length cDNA sequence of the *Rab23*, *AmphiRab23b*, was isolated from Chinese amphioxus (*Branchiostoma belcheri*), which included the UTRs and an open reading frame of 714 bp, encoding a protein of 237 amino acids. Phylogenetic analysis suggested that *AmphiRab23b* fall outside the vertebrate clade. But sequence analysis indicated that this putative *AmphiRab23b* protein contained a specific Rab23_lke domain, which implied that *Rab23* gene was functional conservative during evolution. And its developmental expression pattern showed that *AmphiRab23b* was expressed in the differentiating neural plate and alimentary canal, as the same as the expression pattern of the homologous vertebrate genes,

收稿日期: 2009-08-25; 修回日期: 2009-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30570967, 30671072, 30700434)和国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2007CB947100, 2007CB815800)资助

作者简介: 李建伟(1982-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 动物发育生物学。E-mail: jianwlee@gmail.com

林浴霜(1976-), 女, 博士, 讲师, 专业方向: 动物发育生物学。E-mail: linyushuang@sdu.edu.cn

李建伟和林浴霜同为第一作者。

通讯作者: 张红卫(1944-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物发育生物学。E-mail: zhw@sdu.edu.cn

which suggested that *AmphiRab23b* may function in the development of nervous system and alimentary canal.

Keywords: amphioxus; *Amphirab23b*; evolution; expression

小分子GTP(三磷酸鸟苷)结合蛋白家族由Ras、Rho/Rac/Cdc42、Ran、Sar/Arf、Rab等亚家族组成。Rab蛋白是该结合蛋白家族中最大的亚家族。Rab蛋白最早由Novick等^[1]在芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中发现,并以SEC系列命名(如SEC1等)。随后, Gallwitz等^[2]在肌球蛋白基因和微管蛋白基因之间发现了*YPT1*基因。Touchot等^[3]从大鼠(*Rattus norvegicus*)大脑cDNA文库中克隆到一个与*SEC4/YPT1*基因功能类似的同源物,并命名为Rab(ras-like in rat brain)。

研究表明, Rab蛋白在细胞内的信号传导中扮演着十分重要的角色, 它可以控制配体的分泌以及配体偶联受体的胞内化过程, 从而调节信号传导^[4,5]。同时还发现Rab蛋白在越来越多的信号通路下游起作用。如, Rab5通过控制APPL信号传导蛋白的亚细胞定位^[6]和调节细胞骨架中的肌动蛋白^[7]两个过程来介导EGF受体的下游细胞反应。

Rab23是Rab-GTPase家族的一个成员, 在小鼠中的研究发现, 敲除*Rab23*基因会产生一种open brain (opb)的表型。该表型和Hedgehog通路受体Patched (Ptch)的部分功能缺失时产生的表型相同。随后的遗传学研究证实, 该基因位于Sonic Hedgehog (Shh)通路的下游, 其编码蛋白是该信号通路的负调节因子^[8~10]。

在脊索动物中, Rab23不仅调节介导Sonic hedgehog信号通路中Gli2、Gli3两个转录因子的活性, 而且, 在Shh配体缺失的情况下, Rab23的主要作用是抑制Gli2的活性。此外, Rab23不是通过控制Ptch和Smoothened (Smo)的亚细胞定位来调节Shh通路的, 而是通过调节介导Smo激活Gli过程中的某一胞质信号传导通路来起作用的^[11]。Rab23不仅在Hedgehog信号通路中扮演着十分重要的角色, 而且与胚胎发育密切相关。

在文昌鱼中, 除了佛罗里达文昌鱼基因组注释信息之外, 目前尚无关于Rab23的任何报道。鉴于文昌鱼的特殊进化地位, 本研究首次克隆了中国文

昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)*Rab23*同源基因, 对其演绎的蛋白序列进行相似性、同源性和进化分析, 并对该基因在胚胎发育不同时期的表达进行系统分析。通过本研究, 我们可以确定文昌鱼是否具有*Rab23*的同源基因和该基因在文昌鱼胚胎发育中可能的功能, 这将有助于阐明文昌鱼胚胎发育的分子机制和Hedgehog信号通路分子的进化。

1 材料和方法

1.1 材料

中国文昌鱼性成熟个体采集于青岛附近沙子口海域和北海海域。实验室内人工养殖, 自然排精排卵并受精, 胚胎置于过滤海水中, 25℃正常发育。按照不同的发育时期, 取其胚胎及幼虫, 一部分用4%多聚甲醛固定后梯度酒精脱水至70%(DEPC水配制), -20℃保存, 另一部分离心收集后迅速加入裂解液裂解, 提取RNA备用。RNA可用于建库或反转录为cDNA作为基因克隆模板。

1.2 方法

1.2.1 文昌鱼*Rab23b*基因的克隆及全序列的获得

用18h RNA构建cDNA文库(本实验室之前的工作)。在对文库的分析过程中, 获得一个*Rab23*的EST。利用RACE技术扩增已知序列的上下游序列, 从而获得该基因的全序列。按照SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc.)试剂盒说明, 基于*Rab23*已知序列设计引物5'-GCTGGTCAGGAGGAGTTTGATGCTA-3', 用于扩增该基因的3'末端, 随后进行PCR扩增, 将获得的序列连入pGEM-T-Vector (Promega公司)并测序, 最后用Contig软件进行序列拼接得到完整的3'末端。然后根据拼接得到的序列设计特异性引物5'-CACTCGTCTTCAACCTTCCCCTTCCA-3', 扩增该基因的5'末端, 同上将获得的序列连入pGEM-T-Vector (Promega公司)并测序拼接, 从而得到*AmphiRab23b*的cDNA全序列。

1.2.2 *AmphiRab23b* 的系统进化学分析

利用在线分析工具 NCBI-blastx 从 NCBI 的 GenBank 中检索获得各个物种的 Rab23 同源序列, 利用 Clustalx 1.8 软件对这些序列进行比对及序列相似性分析。用 Tree-puzzle 5.2 以最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统进化树, 并利用 TreeView (Win32)软件显示构建好的进化树。

1.2.3 *AmphiRab23b* 在文昌鱼基因组中的拷贝数分析及实验验证

将已获得的 *AmphiRab23b* 的 cDNA 序列提交到佛罗里达文昌鱼基因组网站(<http://genome.jgi-psf.org/Braf11/Braf11.home.html>), 进行 Blastn 分析, 结合计算机自动分析结果, 确定佛罗里达文昌鱼的 *Rab23* 在基因组中的拷贝数。

利用比对结果中内含子大小的差异, 设计产物包含此段内含子在外的与此段内含子两侧外显子特异配对的引物, 以文昌鱼成鱼基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。理论上应该得到和拷贝数一致的条带数目。

DNA 提取的步骤和 PCR 体系参见《分子克隆实验指南》。设计的特异引物为 5'-GGAAGAAGCA GACACCTTAGCAAAA-3' 和 5'-CAATCTTGGGCT GGTGGTCTG-3'。复性温度为 60℃。

1.2.4 中国文昌鱼 *AmphiRab23b* 原位杂交

按Holland^[12]的方法, 用以上获得的中国文昌鱼 *AmphiRab23* 5' RACE片段为模板合成探针, 对中国文昌鱼早期发育各时期的胚胎和幼体进行原位杂交。

2 结果与分析

2.1 文昌鱼 *Rab23* 基因的克隆及全序列的获得

经 3' 和 5' RACE 扩增分别得到长度为 1 700 bp 和 740 bp 的片段 (图 1), 将这两个片段测序后发现均有一段序列与原有的序列一致, 因此利用 Contig 软件对所得测序结果进行拼接, 最后得到含有完整 ORF 的全长 cDNA 序列, 将其命名为 *AmphiRab23b* (图 2), 总长为 2 062 bp (包括 UTR 区), 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 为 714 bp, 位于 371~1 084 bp 之间, 5' 非翻译区 (5' UTR) 长 370 bp, 从

1 bp 到 370 bp, 3' UTR 长 978 bp, 位于 1085~2 062 bp 之间。在序列中, 起始密码子上游 13 bp 便有一个同框的终止密码子, 而序列自身的终止密码子下游也存在很多的同框终止密码子, 同时终止密码子下游存在加尾信号和 polyA 尾。

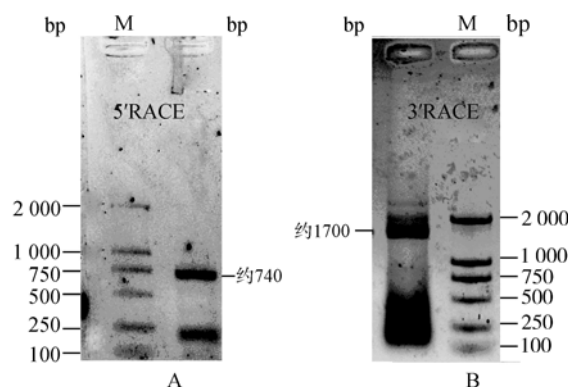


图 1 *AmphiRab23* RACE 结果

A: 5' RACE, 目的条带大小约 740 bp; B: 3' RACE, 目的条带大小约 1 700 bp。

2.2 *AmphiRab23b* 的系统进化学分析

2.2.1 *AmphiRab23b* 同源序列比对

将得到的中国文昌鱼 *AmphiRab23* cDNA 序列输入 NCBI 中的 Blastx 进行在线比对, 发现中国文昌鱼 *AmphiRab23* 与其他各物种的 Rab23 蛋白的氨基酸序列具有很高的序列一致性, 与佛罗里达文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri floridae*) Rab23b (gi|Braf11|61011; gi|219474114) 的一致性最高, 达到 99.58%; 其次是佛罗里达文昌鱼 Rab23a (gi|Braf11|62225; gi|219493633), 99.16%。与海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*, gi|72017227)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*, gi|21357169) 的一致性分别为 70%、64%; 与人 (*Homo sapiens*, gi|34485714)、猕猴 (*Macaca mulatta*, gi|109071599)、狗 (*Canis familiaris*, gi|73973432)、大鼠 (*Rattus norvegicus*, gi|109485852)、小鼠 (*Mus musculus*, gi|438162)、鸡 (*Gallus gallus*, gi|50744832) 的一致性分别为 67%、67%、68%、67%、66%、66%; 与热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*, gi|89271879)、斑马鱼 (*Danio rerio*, gi|66472226) 分别为 68% 和 70%。

同源蛋白比对结果见图 3, 图中的黑色和红色区均是高保守区, 这些区域恰好和 Rab23_like 结构域重合, 由此可以看到 Rab23 蛋白在功能域的进化上是高度保守的。

```

1   ACGCGGGACACCAAGAAAAATTCAGATCGTGAGGTGGGAAGTCAAGCAGATCCTCAGCGTTTCAACTCGTTTTCGCGTCATTAGTAGCC
91  TTTCAGGCCACTTTTACATCCCTAGTCTTACTTTAGATAGAGGAGAGATTTAGCGTAGTTTGTGAAAGGTTTTCGCGGAGAAGA
181 GAGAACTGGAAACCGGCAAGTGTGGACGAAGTGTGAGTGCCTGTCGCGGTCTCTCGGTCGGACCTGAGTTGAGGAAGACCTGCGTGTG
271 GCAACAGACCGTGACGGAAGTTTGAGAAATATCCTTCATCTGATATGAGACCTGTGGCCTGAAGTCTTGGATCACCCTGCAGTCGTGAGG
361 TCCAGCAGCTATGCGGAGGAGGATGTAGAGACAGCCATCAAGTTGTCGTGGTCGGCAATGGTGTCTGCGGGAAGTCCAGCATGATCCA
121      M R E E D V E T A I K V V V V G N G A V G K S S M I Q
451 GCGCTACTGTAAAGGCATCTTCACTAAGGACTACAAGAAAACATCGGGGTGCGACTTCCTTGAAGACAAATAGAAGTGAACATGAAGA
151      R Y C K G I F T K D Y K K T I G V D F L E R Q I E V N N E D
541 CATCCGGTTAATGCTGTGGGACACAGCTGGTCAGGAGGAGTTTGTATGCTATCACAAAAGCATATTACAGAGGTGCTCAGGCATGCGTGCT
181      I R L M L W D T A G Q E E F D A I T K A Y Y R G A Q A C V L
631 AGTCTTCTCCACAACAGACCGCCAGTCTTCGAGGCGATAGAATCTTGAAGGGGAAGGTTGAAGACGAGTGTGGCGACATCCCCACGGT
211      V F S T T D R Q S F E A I E S W K G K V E D E C G D I P T V
721 CCTGTACAGAACAGATTGACCTGTAGAGGACGCCAAAGTAGAGACGGAAGAAGCAGACACCTTAGCAAAAAGCTCAAACCTAGGTT
241      L V Q N K I D L L E D A K V E T E E A D T L A K K L K L R F
811 TTACCGGACATCCGTCAAGGATAATCTTAATGTTGATGACGTATTCAGGTATCTGGCCGACAAGTACCTGGAGAGGGTCCAGGCCATGGT
271      Y R T S V K D N L N V D D V F R Y L A D K Y L E R V Q A M V
901 GGAGGAGGAGCCACAGCCAAAGATTTGGCATGTTCACACTGTGACTAGCAATGCCAATCCTCAACVAGAGAGAGGAGGA
301      E E E P Q T N Q P K I G M F N T V T S N A N S S T K K K E D
991 CAATGGGACCATCCAGTTGTGAGGACCCAAACAGCGCAGAACCCCGGGAAGAAGAACCCGCTCTCCATGTTGGGGAAGTGCCAGCTGTT
331      N G T I Q L S G P N K R T H G K K N P L S M L G K C Q L L
1081 GTGATGTCCCGCCCCCACAGGCCATCATATTCAATGCTGCATCTGATTGGATAATTGGATAATTGGTTTAAATCCTATTTTCCAGA
1171 GAGACCTCTGTGTACAAAATATATCAAGAATTGGGCTCTCAAAAGGCTTCTCAGAGAACAGGCTGCAACATTTGCATACCAAACTTT
1261 TGTACATGTGCTTAAGCTTACTACTAGTCGCTGTGAGAGTTTTTTGTGAAGAACCTTTTATTATGCACTATAAAACAAATGTGCAGTT
1351 GTCCACATTTTGTCAATGTACTTATACAGTTTCAAAGTCATCTGTGAATGTCTAAATTTTATAACATTCATAAAACAGTTATTTT
1441 TATTGAATGAAATTGATTACATCCACATCAATGAAAGTCAGGAGTGTTCAAATGTAGAGCAGACTTTGAAGCTGTGTTCAAGCA
1531 GCATTAGTTGGGACAGTTAAGTTTGTACCTGAAGTTTATTGTATGAACAAAAGGTGGCTTTAAGTCATTAAGGAAGATGAGTTGAGAA
1621 AATGATCTGTGTGGACCCAGATATCGAGTACATGTGTATTCTTAAGAACCAAGCACAAGATGTGTAACCAACACCTATCTCTCCACA
1711 TCTTTCTCAGATATTTAGGTGGTAGGATGGACAGAAAGATAACTATTTGAGCCTTTTGGATCAAATGACATGGAAGACAGCCACCAG
1801 ACAATTACAAAACAAATACAACGTTTCGAGAGATTATCCTCAATAAACCCTGACATCATGAGTTTATCAACCTAATGCTGATAGAA
1891 AGATGGAATAATCCAAAAGTCTTCTTTTGTGTTGAAGTAACTATACCTGAGGTAATTTTAGGACCAATGATGCATTTCTTAGCTCAAT
1981 GAATGTTCAAATGTATGACTTTGATTGATTGATTCCAAATACATACATTTCTACTTACGGAAAAA

```

图2 *AmphiRab23b*基因的cDNA全序列及氨基酸序列

ATG显示蛋白的起始密码子; ATG上游TGA显示最靠近起始密码子上游的一个终止密码子; ATG下游TGA显示终止密码子; 所有的同框终止密码子均用下划线标示; AATAA示加尾信号。方框中所示的区域来源于cDNA文库, 阴影部分示 3 RACE特异引物, 其下游波浪线加阴影部分示 5 RACE特异引物。

2.2.2 Rab23 系统进化树的构建

根据图 3 中的结果, 选取节肢动物门的果蝇为外群, 以 ML 法构建系统进化树(图 4)。由图 4 可知, Rab23 的系统进化树可分为四大支: 第一大支为果蝇; 第二大支为棘皮动物门的海胆, 该动物门属于后口动物, 为无脊椎动物中最进化的类群; 第三大支为文昌鱼, 该分支处于脊椎动物分支的基部。本研究克隆得到的中国文昌鱼的 Rab23b 和佛罗里达文昌鱼的 Rab23b 分列同一小支, 进一步证明我们克隆得到的是中国文昌鱼的 Rab23b; 第四大支包括斑马鱼、鸡、大鼠、小鼠、人等在内的脊椎动物亚门。Rab23 的系统进化树符合传统的进化关系, 即文昌鱼处于无脊椎动物向脊椎动物的过渡阶段。

2.3 *AmphiRab23* 在文昌鱼基因组中的拷贝数分析及实验验证

将已获得的文昌鱼 *AmphiRab23b* 的全长 cDNA 序列提交到佛罗里达文昌鱼基因组网站上进行 Blastn 比对分析, 结果见图 5。

由图 5 可知, 有 3 个片段具有可比性, 经分析

发现最后一个同源性很低, 且不是 *Rab23*。然后分别点开前两个片段对应的链接, 得到相应的内含子、外显子图谱(图 6)及氨基酸序列。这两个蛋白已经由本实验室分别注释为: *Rab23b* (jgi|brafl1|61011|fgenes2_pm.scaffold_296000005) 和 *Rab23a* (jgi|Brafl1|62225|fgenes2_pm.scaffold_508000001)。从图 6 可以看到, 这两个蛋白都是全序, 都由 6 个大小相同的外显子组成, 但相应的 5 个内含子大小均有差异, 所以佛罗里达文昌鱼中 Rab23 可能是两个拷贝。

我们以佛罗里达文昌鱼第四外显子和第五外显子之间的内含子为依据, 分别在这两个外显子上设计引物, 两个产物预计分别为 725 bp (*Rab23b*) 和 816 bp (*Rab23a*)。以中国文昌鱼基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果见图 7。可以看到, 电泳结果显示 PCR 产物为两条长度不同的片段, 长度分别位于 680 bp 和 850 bp 左右。这说明中国文昌鱼的 *Rab23* 基因在基因组中很可能也有两个拷贝, 尽管电泳图上显示的片段大小与预期的佛罗里达文昌鱼稍有差异, 这可能是由电泳误差或者种间差异造成。

homoRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
mccRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
dogRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
musRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
rttsRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
gllsRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
xnptrRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
danioRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
strRab23MEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
flRab23aMEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
flRab23bMEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
qdRab23bMEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	64
drRab23	MRLIQATGGAASVLTGTHSCAQNYTSMEEEDDEAIKVVVGNCGVGKSSMIQRYCKGIFTKDYKKTIGVDFLERQIQVNDDEMRMLWD	92
Consensus	m e d e a i k v v g n c g v g k s s m i q r y c k g i f t k d y k k t i g v d f l e r q i e r m l w d	
homoRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
mccRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
dogRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
musRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
rttsRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
gllsRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
xnptrRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
danioRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
strRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
flRab23a	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
flRab23b	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
qdRab23b	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	156
drRab23	TAGQEEFDITKYYRGACQVLVFTSDRESFEAVSMREKVVAVGLIFTVLVQNKIDLDSCIKNEBAELAKRLKIRFYRSVKEDL	184
Consensus	tagqeefd itk yyrgaca vlvfst dr sf w kv e ip vqnkidl e lak r r svk	
homoRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
mccRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
dogRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
musRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
rttsRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
gllsRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
xnptrRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
danioRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
strRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
flRab23a	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
flRab23b	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
qdRab23b	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	237
drRab23	NNBVFRLAEKYLQKLKQQAEDPELTHSSNKIGVNTSGGSHSGQNSGLNG.GDVINLR.PAKQ.....RTKKNRNPSS...CSIP	268
Consensus	n v f y l n t b v r l a e k y l q k l k q q a e d p e l t h s s n k i g v n t s g g s h s g q n s g l n g . g d v i n l r . p a k q r t k k n r n p s s . . . c s i p	

图 3 Rab23 同源蛋白比对结果

从上到下依次代表人(homoRab23)、猕猴(mccRab23)、狗(dogRab23)、小鼠(musRab23)、大鼠(rttsRab23)、鸡(gllsRab23)、热带爪蟾(xnptrRab23)、斑马鱼(danioRab23)、佛罗里达文昌鱼 Rab23a (flRab23a)、佛罗里达文昌鱼 Rab23b (flSmadb)、中国文昌鱼(qdRab23b)、海胆(strRab23)、果蝇(drRab23)的 Rab23 蛋白序列, 图中下划线标注的是 Rab23_{like} 结构域。

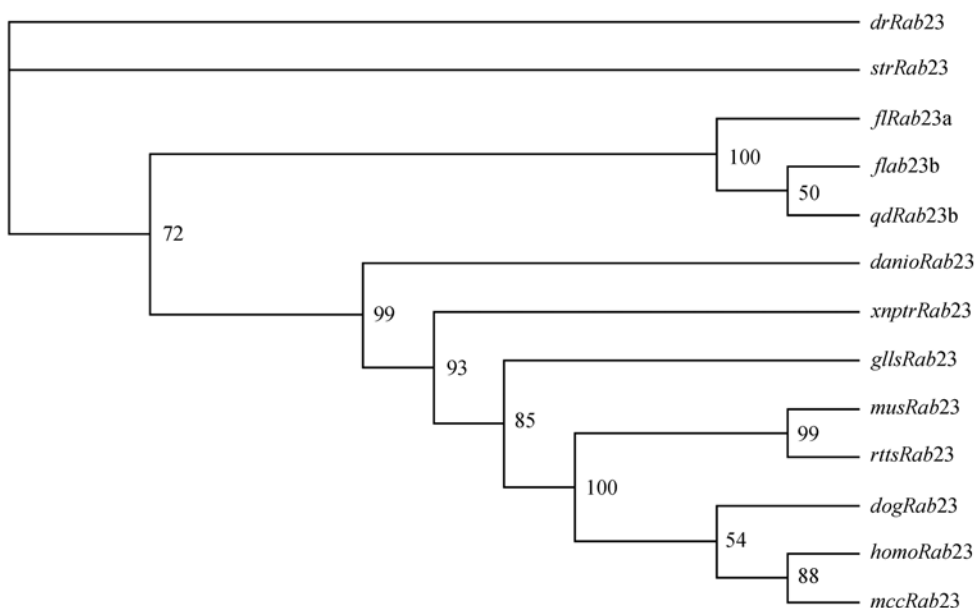


图 4 Rab23 蛋白的 ML 系统进化树

各符号代表的物种和图 3 中的一致。分支点的数字表示置信度值 (重复 1 000 次的结果)。

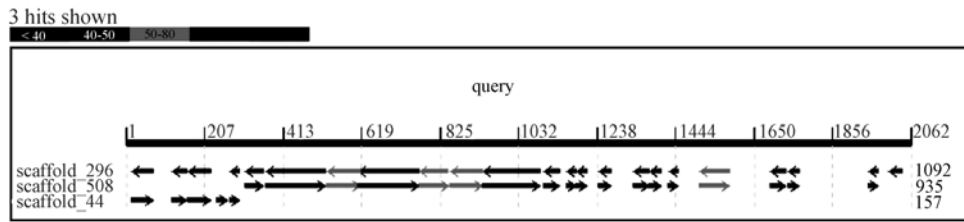


图 5 *AmphiRab23* 与佛罗里达文昌鱼基因组 Blastn 比对结果

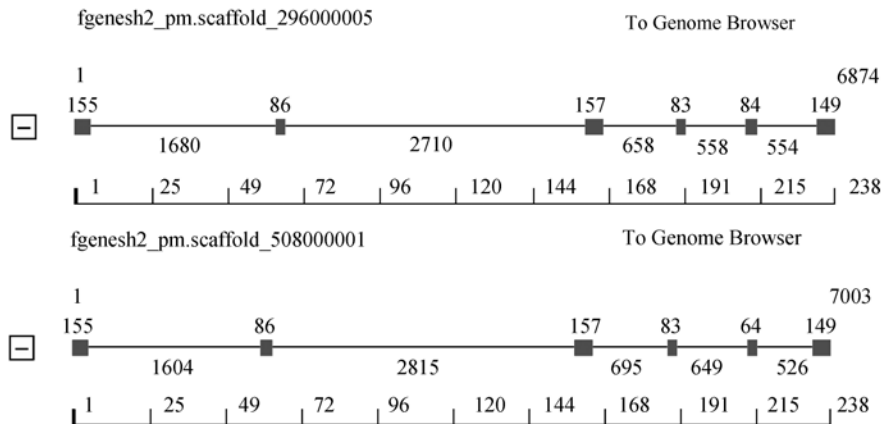


图 6 佛罗里达基因组中两个 *Rab23* 的外显子和内含子图谱
上面的是 *Rab23b*, 下面的是 *Rab23a*。

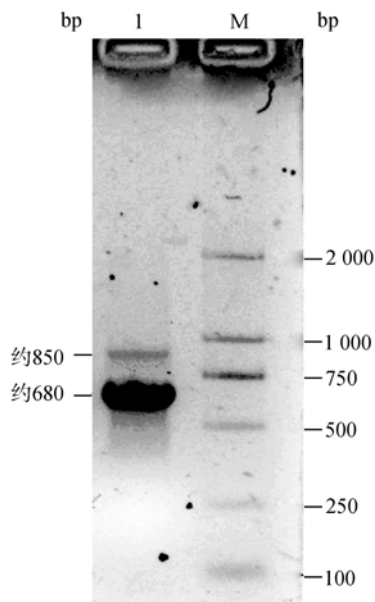


图 7 中国文昌鱼内含子的 PCR 结果
M: DL2000 Marker; 1: 内含子 PCR 的结果。

2.4 文昌鱼 *AmphiRab23b* 的表达模式分析

用原位杂交(*In situ* hybridization, ISH) 的方法检测 *AmphiRab23b* 在各胚胎发育时期的表达特异性, 结果见图 8。*AmphiRab23b* 从受精卵开始到原肠晚期

(图 8B), 一直没有检测到表达信号; 神经胚早期时, 在神经板和分化中的内胚层出现表达信号(图 8: C、D); 此后, 表达主要集中在分化中的消化道。在形成的神经管中表达下调(图 8: E~H); 从 22 h 开始(图 8: I~K), 消化道中的表达信号逐渐移至胚胎的前半部分, 即在形成中的咽鳃区和消化道前段表达。

从原位杂交结果可以看出, *AmphiRab23b* 的表达可能与文昌鱼神经管的形成、咽鳃区和消化道前段的分化密切相关。

3 讨论

AmphiRab23b 基因编码氨基酸序列与其他物种的同源分子一致性非常高, 不论是与较低等的无脊椎动物果蝇或者海胆, 还是与脊椎动物比较, 其一致性都在 64% 以上, 即使是与人类的 *Rab23* 其一致性也达到了 67%。另外, *AmphiRab23b* 序列还包含有一个 *Rab23_lke* 的结构域, 该结构域是 *Rab23* 蛋白序列特有的。在该结构域内氨基酸的一致性更高, 文昌鱼 *Rab23b* 与人的 *Rab23* 序列一致性可以达到 83.2%, 与斑马鱼可达 85.7%。序列的一致性及其保

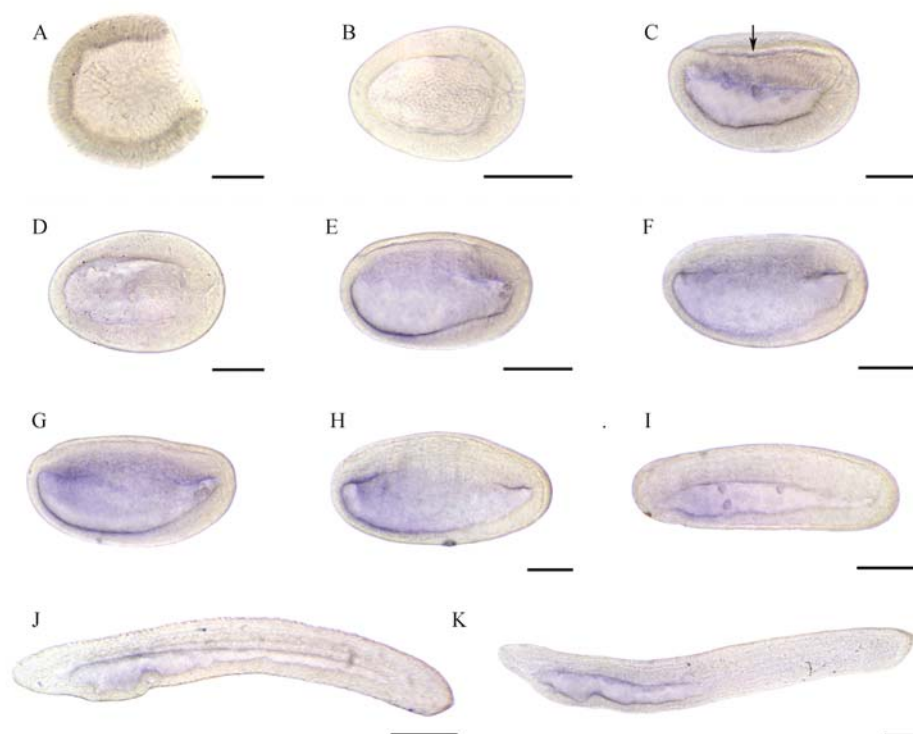


图 8 中国文昌鱼 *AmphiRab23b* 胚胎原位杂交结果

A 和 B 分别是中期和晚期原肠胚, B 为背部面观; C~I 为神经胚期, D 图为 C 的背面观, 其余图均为头朝左、背朝上的侧面观, C 中的箭头示神经板的表达; J 和 K 分别为 27 h 和 36 h 的幼虫; 右下角为比例尺, 代表 50 μm 。

守结构域的存在说明该基因的功能可能在进化过程中保守。另外, 进化树显示文昌鱼 *AmphiRab23b* 与其脊椎动物同源蛋白不属于同一姐妹群, 其分支位于脊椎动物分支的基部, 这与文昌鱼的进化地位一致, 即文昌鱼是无脊椎动物向脊椎动物过渡的头索动物类型。

通过 Blastp 比中国文昌鱼 *Rab23* 和已注释的两个佛罗里达文昌鱼 *Rab23* 蛋白时发现, 前者和佛罗里达文昌鱼 *Rab23b* 的同源性更高, 因此我们克隆到的应该是 *Rab23b*。此外, 基因组拷贝的验证实验更进一步说明, 中国文昌鱼的 *Rab23* 基因也存在两个拷贝。而佛罗里达文昌鱼 *Rab23a* 和 *Rab23b* 之间仅位于 126 位的氨基酸不同, 这暗示它们的功能可能相同。

原位杂交结果显示文昌鱼 *AmphiRab23b* 主要在分化中的神经板, 以及原肠腔壁细胞中表达, 并在胚胎发育晚期存在于消化道的前段。已有的研究表明在成体小鼠的脑部存在 *Rab23* 表达, 而缺失 *Rab23* 会严重影响小鼠胚胎神经管的发育和以后脑部的分

化^[9-11, 13, 14]。人类的卡彭特综合征 (Carpenter syndrome) 患者可能与 *Rab23* 和 Hedgehog 信号异常有关^[15]。现有的研究结果显示, 脊椎动物的 *Rab23* 与中枢神经早期发育, 神经元和神经胶质细胞分化有密切关系^[9, 16-18], 而 *AmphiRab23b* 恰好在文昌鱼发育早期形成中的神经板有表达, 提示文昌鱼 *AmphiRab23b* 与脊椎动物 *Rab23* 有相似的功能。另外在文昌鱼胚胎发育早期 *AmphiRab23b* 存在于分化中的原肠腔壁, 后期存在于咽鳃区和消化道前段, 且在小鼠的研究中发现 *Rab23* 存在于消化道的胃中, 但在小鼠肠中未检测到表达^[19], 这说明小鼠的 *Rab23* 与文昌鱼 *AmphiRab23b* 都与消化道前段的发育相关。这些数据进一步说明 *Rab23* 在进化过程中不仅在氨基酸组成上, 而且其功能上也可能是保守的。鉴于文昌鱼特殊的进化地位, 本实验所得的数据还表明深入研究文昌鱼 Hedgehog 信号通路同源分子的功能, 将有助于阐明文昌鱼胚胎发育的分子机制和理解 Hedgehog 信号通路分子的进化。

参考文献(References):

- [1] Novick P, Field C, Schekman R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 1980, 21(1): 205–215. [\[DOI\]](#)
- [2] Gallwitz D, Donath C, Sander C. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. *Nature*, 1983, 306(5944): 704–707. [\[DOI\]](#)
- [3] Touchot N, Chardin P, Tavitian A. 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 USA*, 1987, 84(23): 8210–8214. [\[DOI\]](#)
- [4] Entchev EV, Schwabedissen A, Gonzalez-Gaitan M. Gradient formation of the tgf-beta homolog dpp. *Cell*, 2000, 103(6): 981–991. [\[DOI\]](#)
- [5] Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, Christoforidis S, Scita G, Zerial M, Di Fiore PP. The eps8 protein coordinates egf receptor signalling through rac and trafficking through rab5. *Nature*, 2000, 408(6810): 374–377.
- [6] Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M. Appl proteins link rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*, 2004, 116(3): 445–456. [\[DOI\]](#)
- [7] Lanzetti L, Palamidessi A, Areces L, Scita G, Di Fiore PP. Rab5 is a signalling gtpase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature*, 2004, 429(6989): 309–314. [\[DOI\]](#)
- [8] Eggenschwiler JT, Anderson KV. Dorsal and lateral fates in the mouse neural tube require the cell-autonomous activity of the open brain gene. *Dev Biol*, 2000, 227(2): 648–660. [\[DOI\]](#)
- [9] Eggenschwiler JT, Espinoza E, Anderson KV. Rab23 is an essential negative regulator of the mouse sonic hedgehog signalling pathway. *Nature*, 2001, 412(6843): 194–198. [\[DOI\]](#)
- [10] Guo A, Wang T, Ng EL, Aulia S, Chong KH, Teng FY, Wang Y, Tang BL. Open brain gene product rab23. Expression pattern in the adult mouse brain and functional characterization. *J Neurosci Res*, 2006, 83(6): 1118–1127. [\[DOI\]](#)
- [11] Eggenschwiler JT, Bulgakov OV, Qin J, Li T, Anderson KV. Mouse rab23 regulates hedgehog signaling from smoothened to gli proteins. *Dev Biol*, 2006, 290(1): 1–12. [\[DOI\]](#)
- [12] Holland PW. Wholemount *in situ* hybridization to amphioxus embryos. *Methods Mol Biol*, 1999, 97: 641–644.
- [13] Gunther T, Struwe M, Aguzzi A, Schughart K. Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development*, 1994, 120(11): 3119–3130.
- [14] Olkkonen VM, Peterson JR, Dupree P, Lutcke A, Zerial M, Simons K. Isolation of a mouse cDNA encoding rab23, a small novel gtpase expressed predominantly in the brain. *Gene*, 1994, 138(1–2): 207–211. [\[DOI\]](#)
- [15] Jenkins D, Seelow D, Jehee FS, Perlyn CA, Alonso LG, Bueno DF, Donnai D, Josifova D, Mathijssen IM, Morton JE, Orstavik KH, Sweeney E, Wall SA, Marsh JL, Nurnberg P, Passos-Bueno MR, Wilkie AO. Rab23 mutations in carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. *Am J Hum Genet*, 2007, 80(6): 1162–1170. [\[DOI\]](#)
- [16] Evans TM, Ferguson C, Wainwright BJ, Parton RG, Wicking C. Rab23, a negative regulator of hedgehog signaling, localizes to the plasma membrane and the endocytic pathway. *Traffic*, 2003, 4(12): 869–884. [\[DOI\]](#)
- [17] Li N, Volff JN, Wizenmann A. Rab23 gtpase is expressed asymmetrically in hensen's node and plays a role in the dorsoventral patterning of the chick neural tube. *Dev Dyn*, 2007, 236(11): 2993–3006. [\[DOI\]](#)
- [18] Ng EL, Tang BL. Rab gtpases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res Rev*, 2008, 58(1): 236–246. [\[DOI\]](#)
- [19] 黄淑红, 杨凌, 谢国蕊, 张红卫. Rab23 在鼠不同器官中表达的研究. *山东大学学报(理学版)*, 2008, 43(1): 1–4.

• 综合信息 •

“遗传与基因组医学国际会议”通知

“遗传与基因组医学国际会议”将于 2010 年 5 月 2—5 日在台湾举办, 会议特邀报告人有 Dr. Arthur Beaudet (USA), Dr. David Goldstein (USA), Dr. Mark McCarthy (UK), Dr. David Russel (USA), 贺林, 杨焕明, 金力, 唐少华等。

中国遗传学会已正式收到邀请函, 欲参加会议的人员请关注中国遗传学会网站 <http://www.geneticsociety.cn/>