

水稻小 G 蛋白 OsRab5b 的亚细胞定位研究

邵军丽^{1, 2} 龙跃生^{2, 3} 徐增富^{2, 4}

(1. 广东医学院公共卫生学院, 东莞 523808; 2. 中山大学基因工程教育部重点实验室 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275; 3. 广州医科大学附属第二医院神经科学研究所, 广州 510260; 4. 中国科学院西双版纳热带植物园 热带植物资源可持续利用重点实验室, 昆明 650223)

摘要：旨在研究水稻 OsRab5b 亚细胞定位及第二位甘氨酸在蛋白定位中的作用。利用药物、细胞器标记物和示踪染料处理 OsRab5b-GFP 与 OsRab5b (Gly2Ala)-GFP 的转基因 BY-2 细胞, 然后用激光共聚焦显微镜观察。结果表明, OsRab5b-GFP 转基因细胞呈现出大量的分散点状结构和少量细胞质弥散信号; wortmannin 处理可以使 OsRab5b-GFP 标记的点状结构膨胀成小的环状结构; 采用 100 $\mu\text{g/mL}$ 布雷菲德菌素 A (BFA) 处理可使 OsRab5b-GFP 标记的结构聚集。大部分的 OsRab5b-GFP 信号都可以与前液泡区标记蛋白 VSR_{At-1} 共定位。在内吞示踪染料 FM4-64 摄取的第 60 min, OsRab5b-GFP 标记的结构大部分被 FM4-64 标记。突变体 OsRab5b (Gly2Ala)-GFP 弥散分布于细胞核和细胞质内, 而且不受 wortmannin 或 BFA 药物处理的影响。OsRab5b 定位于 BY-2 细胞的前液泡区, Gly2 在蛋白准确定位方面发挥重要作用。

关键词：OsRab5b; 亚细胞定位; 前液泡区; 内吞体

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.11.017

Subcellular Localization of Rice Small G Protein OsRab5b in BY-2 Cells

Shao Junli^{1, 2} Long Yuesheng^{2, 3} Xu Zengfu^{2, 4}

(1. School of Public Health, Guangdong Medical College, Dongguan 523808; 2. Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275; 3. Institute of Neuroscience, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260; 4. Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

Abstract: To investigate the subcellular localization of rice OsRab5b and the Gly2 role in the protein subcellular localization. OsRab5b-GFP and OsRab5b (Gly2Ala)-GFP plasmids were transformed into BY-2 cells. The laser confocal microscope was employed to observe the transgenic cells treated with drugs, a marker protein VSR_{At-1} or an endocytosis tracer dye FM4-64. Results showed Punctuate and diffuse signals were observed in the OsRab5b-GFP transgenic cells. Wortmannin at a concentration of 16.5 $\mu\text{mol/L}$ led to the change of the OsRab5b-GFP marked organelles into small vacuoles. The signals of OsRab5b-GFP were aggregated after the treatment of Brefeldin A (BFA) at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, but not at 10 $\mu\text{g/mL}$. Most of the OsRab5b-GFP positive signals colocalized with the VSR_{At-1} positive organelles in the cells with and without wortmannin or BFA treatment. Additionally, most of the OsRab5b-GFP marked organelles colocalized with the endosomal marker FM4-64 after 60-min incubation. The diffuse signals of the mutation protein OsRab5b (Gly2Ala)-GFP were observed in the nuclei and cytoplasm of the transgenic cells, which were not affected by the wortmannin or BFA treatment. OsRab5b is localized to the prevacuolar compartment of BY-2 cells and the Gly2 site is essential for the correct subcellular localization of OsRab5b.

Key words: OsRab5b; subcellular localization; prevacuolar compartment (PVC); endosome

收稿日期: 2015-03-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”计划) (2007AA02Z102)

作者简介: 邵军丽, 女, 博士, 研究方向: 基因功能和基因工程; E-mail: 327862795@qq.com

通讯作者: 徐增富, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 植物基因功能和基因工程; E-mail: zfxu@xtbg.ac.cn

小 GTP 结合蛋白 (20–25 kD), 简称小 G 蛋白, 是一个很大的蛋白超家族, 存在于所有的真核生物中, 其功能依赖 GTP 的水解, 是信号转导的分子开关^[1]。Rab 蛋白是小 G 蛋白超家族中最大的一个家族, 是 3 个 (Ras、Rho 和 Rab) 在羧基端存在翻译后脂类修饰的小 G 蛋白家族之一, 参与调节细胞内各个细胞器及内膜系统的运输^[1]。Rab 蛋白的羧基端包含两个半胱氨酸的高变区, 翻译后的脂类修饰发生在高变区末端的半胱氨酸上。这种脂类修饰是蛋白与膜结合必不可少的^[2], 在酵母及动物中没有发现例外。有意思的是, 在植物中除了在羧基端进行脂类修饰的 Rab5, 即传统的 Rab5 (植物中称作 Rab5a) 外, 还发现了植物特异的 Rab5b 类, 如冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum*) 的 McRab5b (m-Rab (mc))^[3], 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 Ara6/AtRabF1^[4], 轮藻 (*Chara australis*) 中的 CaARA6 (CaRABF1)^[5] 等。这类植物特异性的 Rab5b 羧基端缺少 24–33 个包括两个半胱氨酸的高变区序列。取而代之的是 N 端比传统的 Rab5a 多出 13–26 个保守的氨基酸序列。其中拟南芥的 Ara6 第二位甘氨酸在体外翻译修饰实验中可以豆蔻酰化, 并在一定程度上影响 Ara6 细胞定位^[6]。但其它植物中 Rab5b 第二位甘氨酸的作用还没有研究。

水稻小 G 蛋白 *OsRab5b* 基因由林慧贤等^[7] 克隆和鉴定, 它与冰叶日中花的 *McRab5b* (GenBank AJ 006225) 和百脉根的 *LiRab5b* (GenBank Z73939) cDNA 核苷酸序列相似程度分别为 74% 和 76%。在大肠杆菌中表达的 GST-*OsRab5b* 具有 GTP 结合活性^[8]。本实验研究 *OsRab5b* 在烟草 BY-2 细胞中的定位及 *OsRab5b* 第二位甘氨酸在其亚细胞定位中的作用, 旨在为深入研究 *OsRab5b* 的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 *OsRab5b* 原核表达质粒、GFP 植物表达质粒 pYS22 由本实验室保存, *OsRab5b*-GFP 与 *OsRab5b* (Gly2Ala) -GFP (将第二位甘氨酸突变为丙氨酸) 植物表达质粒为本实验构建。农杆菌 EHA105 为本实验室保存。烟草 BY-2

(Bright Yellow-2) 细胞由香港中文大学姜里文教授惠赠。

1.1.2 试剂与培养基 乙酰丁香酮: 少量 DMSO (二甲基亚砷) 溶解后, 再用蒸馏水定容配成 100 mmol/L 母液; wortmannin: Sigma 19545-26-7; DMSO 配成 1 mmol/L 贮存液; BFA: Sigma-Aldrich; B-6542; DMSO 配成 2.5 mg/mL 贮存液; FM4-64: Molecular probe (T316), 用氯仿配成 12 mmol/L 贮存液; 固定液: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH7.0, 5 mmol/L EGTA, 0.02% Azide, 4.5% 多聚甲醛; 磷酸钠-EGTA 缓冲液: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH7.0, 5 mmol/L EGTA, 0.02% Azide; 封闭缓冲液 1 (B1): 1 × PBS, 1% BSA; 封闭缓冲液 2 (B2): 1 × PBS, 0.25% BSA, 0.25% Gelatin, 0.05% NP-40, 0.02% Azide。VSR_{At-1} 抗体由香港中文大学姜里文教授惠赠。农杆菌 EHA105 培养基为 YEB。BY-2 细胞培养基为植物组织培养常规培养基 MS。

1.2 方法

1.2.1 *OsRab5b* 蛋白序列分析 利用软件 Clustal X 1.83 进行多重蛋白序列比对。进化树分析采用软件 MEGA 4.0^[9] (<http://www.megasoftware.net/>)。选用 N-J (Neighbor-Joining) 法, bootstrap 值通过 10 000 次的重复确定。蛋白序列比对用到的 Rab5 同源蛋白基因的 GenBank 序列号依次是: *OsRab5b* (AF323991), *LjRab5b* (Z73939), *McRab5b* (AJ006225), *Ara6* (NM_115341), *NtRab5* (X63875), *LjRab5a* (Z73938), *Rha1* (X59152), *OsRab5a* (AY029301), *HsRab5a* (M28215), *YeastYpt51* (P36017)。

1.2.2 载体构建及农杆菌转化 以 *OsRab5b* 原核表达质粒为模板, 扩增野生型的 *OsRab5b* 读码框和突变型的 *OsRab5b* (Gly2Ala) 读码框, 所用引物如下:

OsRab5b: 上游引物 (*Xho* I) 5'-TACTCGAGAA-TTCATGGGTTGCT-3', 下游引物 (*Kpn* I) 5'-TAGG-TACCAGACGCCGTTGGCCTG-3'。

OsRab5b (Gly2Ala): 上游引物 (*Xho* I): 5'-TACTCGAGAATTCATGGCCTTGCT-3', 下游引物 (*Kpn* I): 5'-TAGGTACCAGACGCCGTTGGCCTG-3'。

PCR 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 53℃ 40 s, 72℃ 50 s, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。回收扩增产

物。*Xho* I 和 *Kpn* I 酶切扩增产物和 GFP 植物表达载体 pYS22（含 CaMV35S 启动子），回收酶切后的扩增产物和线性载体。将酶切扩增产物与线性载体连接，得到 OsRab5b-GFP 与 OsRab5b（Gly2Ala）-GFP 质粒（图 1）。转化大肠杆菌，提取质粒经测序、酶切鉴定。经鉴定成功的质粒用于转化农杆菌，方法为电击转化法。电击仪（Eppendorf 公司生产的 2510

型）电击参数为电压 1 800 V，持续 5 ms。电击结束后，加入 YEB 液体培养基至电击杯中，于 28℃、100 r/min 培养 4 h。取 50 μL 菌液涂布含利福平（50 mg/L）和壮观霉素（100 mg/L）的 YEB 固体平板上培养 36 h。挑取菌落用 YEB 液体培养，提取质粒，酶切鉴定，鉴定成功的转化菌株用于 BY-2 细胞的转化。

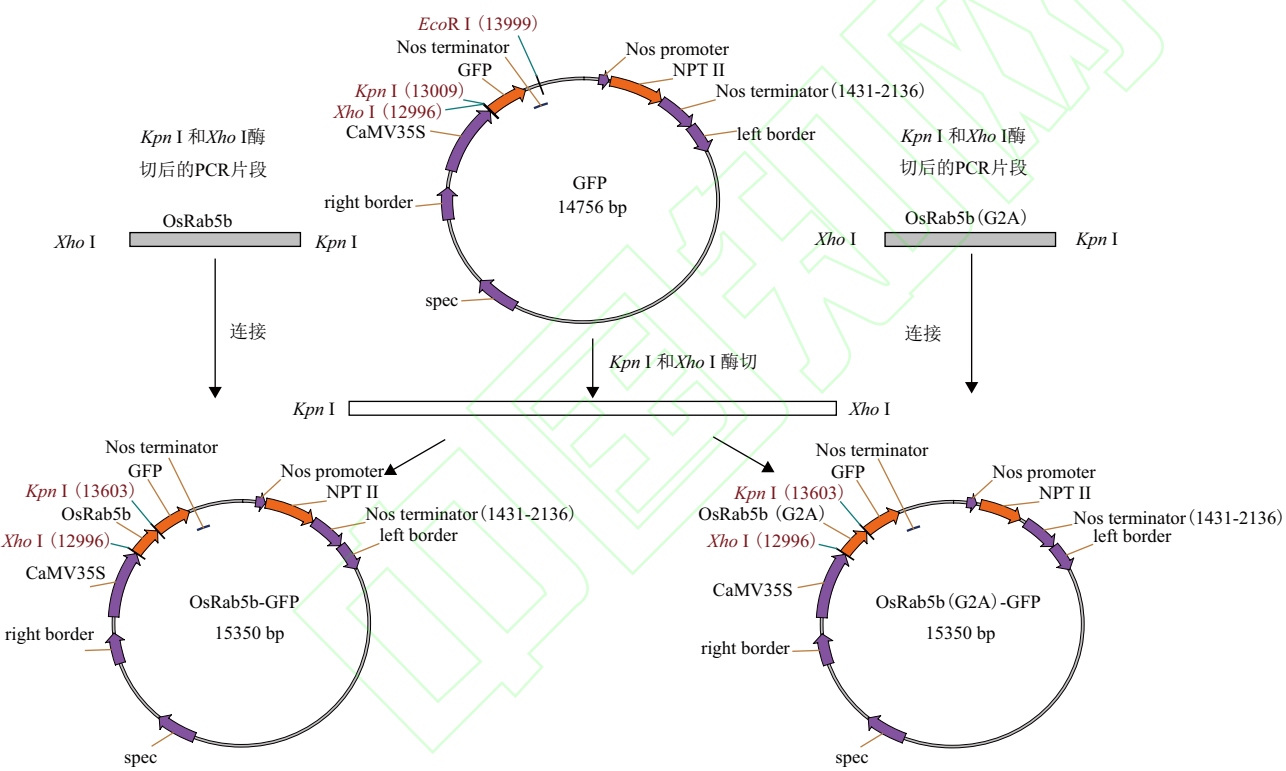


图 1 OsRab5b-GFP 与 OsRab5b（Gly2Ala）-GFP 质粒构建示意图

1.2.3 BY-2 细胞的转化、wortmannin 和 BFA 处理、免疫荧光标记、FM4-64 的摄取实验 均参照相关文献^[10, 11]进行，简述如下。

BY-2 细胞的转化：按 1：10 继代 BY-2 细胞，第 3 天，向培养皿加入 4 mL BY-2 悬浮细胞、4 mL MS 培养基及乙酰丁香酮（终浓度 50–100 μmol/L），反复吸打 20 次。加入 100 μL OD=0.6 左右的农杆菌，混匀，包上封口膜，28℃黑暗培养 3 d 后，将细胞转入 50 mL 离心管。在 50 mL 离心管中用 40 mL MS 液体培养基洗细胞，上下颠倒，自然沉降，弃上清，重复 3–5 次。1 mL MS 液体培养基重悬 BY-2 细

胞，涂于 MS 固体培养基（卡那霉素 100 μg/mL，羧苄青霉素 250 μg/mL），吸出所有液体。包上封口膜，28℃黑暗培养 3–5 周，即可见阳性克隆长出。

Wortmannin 和 BFA 处理：取 0.5 mL BY-2 悬浮细胞于 1.5 mL 离心管中，自然沉降，弃上清，加入新鲜 MS 液体培养基 0.5 mL，根据实验需要加入相应体积的 wortmannin 或 BFA 贮存液。避光放置 1 h，取样放于载玻片上，共聚焦扫描显微镜下观察拍照。

BY-2 细胞的免疫荧光标记：取 1 mL 的细胞沉淀装入 15 mL 离心管中，加 10 mL 固定液，混匀，常温过夜。用磷酸钠-EGTA 洗细胞，室温 1 h 或 4℃

过夜。用磷酸钠缓冲液配制的 1%–3% 细胞溶解纤维素酶 (cellulysin cellulase) 孵育细胞, 室温 20–30 min。磷酸钠-EGTA 洗 2 次。加 200–500 μ L 0.5% Triton X-100 孵育细胞, 室温 2 min。B1 洗细胞 2 次。B1 封闭细胞, 室温 30 min。离心弃去 B1。加 B2, 按 1 : 50 或 1 : 100 稀释加入多克隆抗血清或 4 μ g/mL 亲和纯化的一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。B2 洗细胞 3 次, 依次 10、10 和 30 min。离心弃去 B2, 加新鲜 B2, 1 : 100 稀释加入荧光标记的二抗, 室温放置 1 h。B2 洗细胞 3 次, 依次 15、15 和 20 min。免疫荧光标记完毕, 取样放于载玻片上, 共聚焦显微镜下观察拍照。

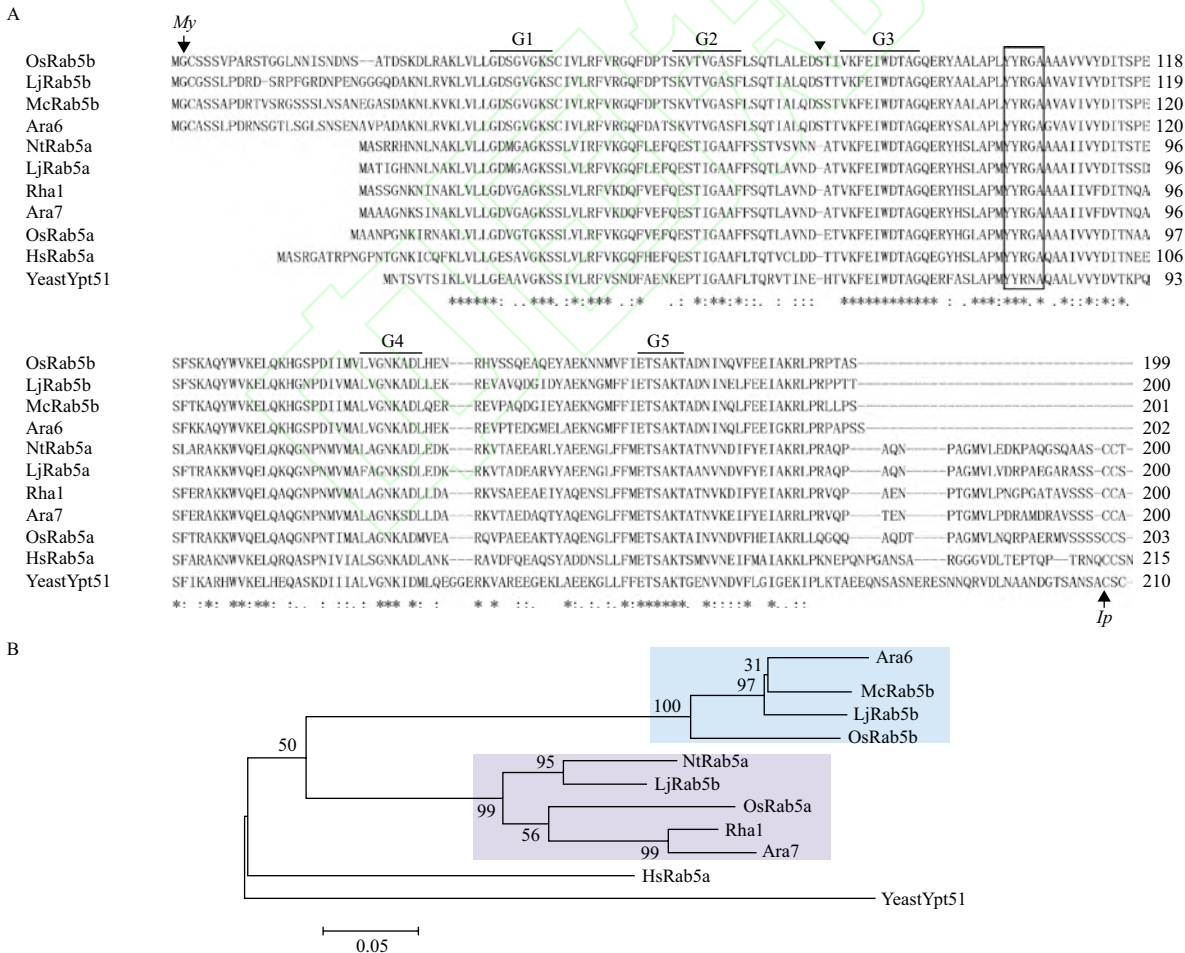
BY-2 细胞的 FM4-64 摄取 : 取 0.5 mL BY-2 悬

浮细胞于 1.5 mL 离心管, 自然沉降, 弃上清, 加入新鲜 MS 液体培养基 500 μ L, 加入 1 μ L FM4-64 (母液 : 12 mmol/L) 混匀, 冰上避光放置 5 min。MS 液体培养基洗 2 次 (冰上)。洗完放于室温, 开始计时, 15、30 和 60 min 取样放于载玻片上, 共聚焦扫描显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 OsRab5b 是一种植物特异性小 GTP 结合蛋白

将 OsRab5b 与植物、人及酵母中的同源蛋白序列进行比对分析, 结果 (图 2-A) 表明, Rab5b 与 Rab5a 家族的成员有较高的相似性, 两类 Rab5 都具



Lj : 百脉根 (*Lotus japonicus*) ; Mc : 冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum*) ; Os : 水稻 (*Oryza sativa*) ; Hs : 人 (*Homo sapiens*) ; Yeast : 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ; Ara : 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)。上划线为 GTP 结合蛋白的 5 个功能区 G1–G5。G1 和 G3–G5 参与 GTP 的结合与水解以及蛋白的构象变化 ; G2 是效应子区。方框中的 YYRGA 序列是 GTP 结合蛋白家族中 Rab/Ypt 所特有的。▲ 指示的是 Rab5b 比 Rab5a 多的一个丝氨酸。▲ 指示豆蔻酰化位点 (My) 和异戊烯化位点 (Ip) 。* 表示保守的氨基酸

图 2 OsRab5b 和其它物种同源蛋白序列比对分析 (A) 及系统进化分析 (B)

有在 GTP 结合蛋白家族中非常保守的 5 个结构域, 即 G1-G5。OsRab5b 与其它植物特异性的 Rab5b 一样, 也缺少羧基端的一段不保守的含半胱氨酸的高变区序列, 而氨基端多出一段氨基酸序列。采用程序 WolfPSORT (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/>) 预测时, 氨基端第二个甘氨酸会被豆蔻酰化。蛋白序列系统进化分析 (图 2-B) 也表明, 植物中存在两类 Rab5, 即 Rab5a 类和 Rab5b 类, OsRab5b 属于植物特异性的 Rab5b。

2.2 Wortmannin 和 BFA 对 OsRab5b-GFP 及其突变 (Gly2Ala) 蛋白分布的影响

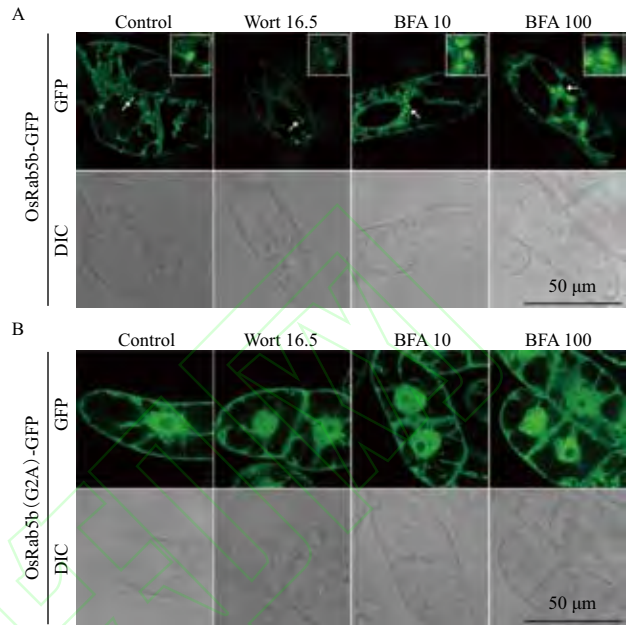
为了研究 OsRab5b 在细胞中的定位及第二位甘氨酸在定位中的作用, 分别构建了 *OsRab5b*、*OsRab5b* (Gly2Ala) 与报告基因 *GFP* 融合的植物表达质粒 (图 1), 并转化到农杆菌 EHA105。利用农杆菌介导法将 2 个 GFP 融合载体转化到烟草 BY-2 细胞, 通过共聚焦显微镜筛选得到 GFP 阳性克隆。OsRab5b-GFP 转基因细胞 GFP 大部分呈点状分布, 少部分在细胞质弥散分布。OsRab5b (Gly2Ala) -GFP 转基因细胞 GFP 全部弥散分布于细胞核和细胞质内 (图 3)。Wortmannin 处理使 OsRab5b-GFP 标记的细胞器膨胀成小的环状结构; BFA 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时使 OsRab5b-GFP 标记的细胞器聚集, 但在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时没有引起 OsRab5b-GFP 标记的细胞器形态发生变化 (图 3-A)。据此可以初步判断 OsRab5b-GFP 标记的细胞器是前液泡区 (prevacuolar compartment)。Wortmannin 和 BFA 处理没有引起 OsRab5b (Gly2Ala) -GFP 信号的任何变化 (图 3-B)。

2.3 OsRab5b 与前液泡区标记物 VSR_{At-1} 的共定位

为了进一步确证 OsRab5b-GFP 定位于前液泡区, 本研究选用拟南芥液泡分选受体 VSR_{At-1} 作为前液泡区标记物对 OsRab5b-GFP 转基因细胞进行了免疫荧光标记。如图 4 所示, 在没有药物 (图 4-A) 及有药物处理 (图 4-B, 4-C, 4-D) 时, OsRab5b-GFP 标记的细胞结构都有一部分被 VSR_{At-1} 抗体染色。

2.4 OsRab5b 与内吞示踪染料 FM4-64 的共定位

OsRab5b 定位于内吞途径的前液泡区 (晚期内吞体), 所以 OsRab5b 应该和内吞示踪染料 FM4-64 有共定位。为了验证这个假设, 本研究进行了转基



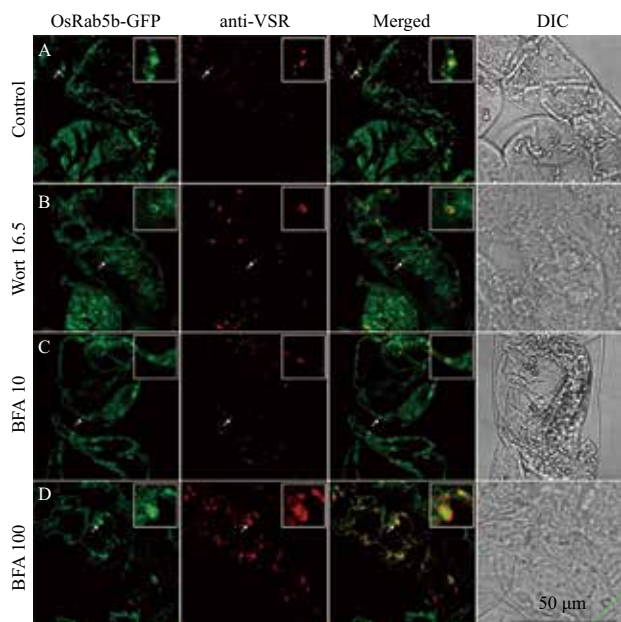
用 16.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 wortmannin (Wort) 或 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BFA 处理 OsRab5b-GFP (A) 和 OsRab5b (G2A) -GFP (B) 转基因细胞 1 h, 然后采用激光共聚焦显微镜观察拍照。A 中上面 4 个照片右上角的插图是箭头所示位置的放大图。DIC 图显示细胞的形态

图 3 OsRab5b-GFP (A) 和 OsRab5b (Gly2Ala) -GFP (B) 转基因细胞对药物 wortmannin 和 BFA 的反应

因 BY-2 细胞的 FM4-64 摄取实验。如图 5 所示, 在转基因细胞摄取 FM4-64 的 60 min, 而不是较早的 15 min 和 30 min 时, OsRab5b-GFP 标记的结构大部分被 FM4-64 标记。

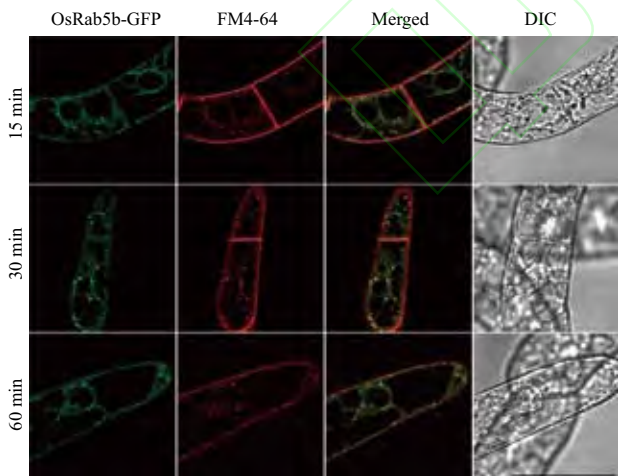
3 讨论

Wortmannin 可以使前液泡区 (晚期内吞体) 膨胀形成小的空泡 (small vacuoles), 荧光图上表现为小的环状结构, 但不会影响高尔基体^[11, 12]。BFA 低浓度时 (5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 使高尔基体形成聚集, 不影响前液泡区形态。但是, BFA 高浓度时 (50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 既可以使高尔基体也可以使前液泡区形成聚集^[10]。根据本研究药物处理的结果, 可以推断 OsRab5b-GFP 定位于前液泡区。拟南芥液泡分选受体 VSR_{At-1} 主要定位于烟草 BY-2 细胞的前液泡区^[11], 本研究将 VSR_{At-1} 作为前液泡区的标记物, 对 OsRab5b-GFP 转基因细胞进行了 VSR_{At-1} 抗体免疫荧光标记, 结果表明 OsRab5b 有一部分和 VSR_{At-1} 共定位于前液泡区。FM4-64 是一种苯乙基荧光染料, 可通过内吞进入细胞, 常被用作内吞示踪染



OsRab5b-GFP 转基因 BY-2 细胞没有药物处理 (A) 或用 16.5 $\mu\text{mol/L}$ wortmannin (Wort) (B)、10 $\mu\text{g/mL}$ (C)、100 $\mu\text{g/mL}$ (D) BFA 处理 1 h, 然后固定。固定的细胞用 VSR_{At-1} 抗体免疫荧光染色。红色的是 VSR_{At-1} 抗体对前液泡区的标记。绿色的就是 OsRab5b-GFP 标记的细胞器。黄色就表示红色和绿色的重叠, 即共定位。照片右上角的插图是箭头所示位置的放大图。DIC 图显示细胞的形态

图 4 OsRab5b-GFP 和前液泡区标记物 VSR_{At-1} 的共定位



OsRab5b-GFP 转基因细胞和 FM4-64 在冰上孵育 5 min, 洗涤后室温放置, 在所示时间点取样并在共聚焦显微镜下观察拍照。DIC 图显示细胞的形态

图 5 OsRab5b-GFP 定位于 FM4-64 标记的内吞途径上的晚期内吞体 (即前液泡区)

料^[13, 14]。OsRab5b-GFP 转基因细胞的 FM4-64 摄取实验表明 OsRab5b 主要定位于晚期内吞体, 即前液泡区^[11, 15]。综合上述 3 个亚细胞定位实验, 可以判

定 OsRab5b 定位于前液泡区。

在冰叶日中花中, McRab5b 除了大部分定位于 BP-80 和 AtPEP12p 标记的前液泡区, 还与 JIM84 和 ST 标记的高尔基体结构有一定程度的联系^[3]。同样, 轮藻 CaARA6 既有内吞体定位, 也有高尔基体定位^[5]。那么被 OsRab5b-GFP 标记而没有被 VSR_{At-1} 标记的结构也有可能是高尔基体结构。前液泡区, 也叫晚期内吞体, 是内吞途径的细胞器, 而高尔基体是分泌途径的细胞器。一种蛋白可以既定位于分泌途径又定位于内吞途径, 并不矛盾。因为已经有很多证据表明内吞途径和分泌途径可以在高尔基体^[16]、早期内吞体^[15]和前液泡区 (晚期内吞体) 汇合^[17]。这就提示, OsRab5b 可能在内吞途径和分泌途径都发挥功能, 这可作为下一步研究的方向。还有一部分 OsRab5b-GFP 信号弥散于细胞质中, 这与 Rab5 在膜与细胞质两个区域循环^[18]一致。

OsRab5b (Gly2Ala) -GFP 弥散分布于细胞核和细胞质内, 而且 wortmannin 和 BFA 处理没有引起 OsRab5b (Gly2Ala) -GFP 信号的任何变化, 所以可以推测第二位甘氨酸具有引导 OsRab5b 正确定位的功能。

从转基因细胞的激光共聚焦显微镜图片上看, 一个非常有趣的现象是 OsRab5b (Gly2Ala) -GFP 表达量远高于 OsRab5b-GFP, 这在植物中还未见报道。这可能是因为 OsRab5b (Gly2Ala) -GFP 定位错误, 功能丧失, 导致降解调节机制失灵, 最后造成了 OsRab5b (Gly2Ala) 蛋白的大量积累。在动物细胞中也存在类似的现象。Rab5、Rab7 羧基端的异戊烯化被药物洛伐他汀 (lovastatin) 抑制后, 其蛋白量增加 4 倍之多^[19]。因此, 对这一现象的分子机制进行深入研究具有重要意义。

4 结论

水稻小 G 蛋白 OsRab5b 属于植物特异性的 Rab5b 类。3 个定位实验都表明 OsRab5b 定位在 BY-2 细胞的前液泡区, 即晚期内吞体, 可能在内吞及分泌过程中发挥功能。突变体 OsRab5b (Gly2Ala) 弥散分布于细胞核和细胞质内, 所以 OsRab5b 的第二位甘氨酸在该蛋白的正确定位中具有重要作用。

致谢：本研究得到了香港中文大学姜里文教授和缪严松博士的大力帮助，在此表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Aloisi AL, Bucci C. Rab GTPases-cargo direct interactions : fine modulators of intracellular trafficking [J] . *Histol Histopathol*, 2013, 28 (7) : 839-849.
- [2] Khan AR, Menetrey J. Structural biology of Arf and Rab GTPases' effector recruitment and specificity [J] . *Structure*, 2013, 21 (8) : 1284-1297.
- [3] Bolte S, Brown S, Satiat-Jeunemaitre B. The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rabme is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells [J] . *J Cell Sci*, 2004, 117 (6) : 943-954.
- [4] Ebine K, Miyakawa N, Fujimoto M, et al. Endosomal trafficking pathway regulated by ARA6, a RAB5 GTPase unique to plants [J] . *Small GTPases*, 2012, 3 (1) : 23-27.
- [5] Hoepflinger MC, Geretschlaeger A, Sommer A, et al. Molecular and biochemical analysis of the first ARA6 homologue, a RAB5 GTPase, from green algae [J] . *J Exp Bot*, 2013, 64 (18) : 5553-5568.
- [6] Ueda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, et al. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana* [J] . *Embo J*, 2001, 20 (17) : 4730-4741.
- [7] 林慧贤, 刘筱斌, 李发强, 等. 水稻小 GTP 蛋白基因 Osrab5B 基因的克隆和鉴定 [J] . *高技术通讯*, 2001 (3) : 9-14.
- [8] 林慧贤, 刘筱斌, 梁承邨, 等. 水稻 rab5B 基因在大肠杆菌中的表达、纯化和 GTP 结合分析 [J] . *生物化学与生物物理进展*, 2002 (3) : 434-438.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. 0 [J] . *Mol Biol Evol*, 2007, 24 (8) : 1596-1599.
- [10] Tse YC, Lo SW, Hillmer S, et al. Dynamic response of prevacuolar compartments to brefeldin a in plant cells [J] . *Plant Physiol*, 2006, 142 (4) : 1442-1459.
- [11] Tse YC, Mo B, Hillmer S, et al. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells [J] . *Plant Cell*, 2004, 16 (3) : 672-693.
- [12] Wang J, Cai Y, Miao Y, et al. Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments [J] . *J Exp Bot*, 2009, 60 (11) : 3075-3083.
- [13] Paudyal R, Jamaluddin A, Warren JP, et al. Trafficking modulator TENin1 inhibits endocytosis, causes endomembrane protein accumulation at the pre-vacuolar compartment and impairs gravitropic response in *Arabidopsis thaliana* [J] . *Biochem J*, 2014, 460 (2) : 177-185.
- [14] Firdessa R, Oelschlaeger TA, Moll H. Identification of multiple cellular uptake pathways of polystyrene nanoparticles and factors affecting the uptake : Relevance for drug delivery systems [J] . *Eur J Cell Biol*, 2014, 93 (8-9) : 323-337.
- [15] Lam SK, Siu CL, Hillmer S, et al. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells [J] . *Plant Cell*, 2007, 19 (1) : 296-319.
- [16] Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, et al. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis* [J] . *Plant Cell*, 2006, 18 (3) : 715-730.
- [17] Lam SK, Tse YC, Jiang L, et al. Plant prevacuolar compartments and endocytosis [J] . *Plant Cell Monogr*, 2005, 1 : 37-61.
- [18] Charest PG, Firtel RA. Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement [J] . *Biochem J*, 2007, 401 (2) : 377-390.
- [19] Laezza C, Bucci C, Santillo M, et al. Control of Rab5 and Rab7 expression by the isoprenoid pathway [J] . *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248 (3) : 469-472.

(责任编辑 马鑫)