

DOI:10.13350/j.cjpb.240105

• 论著 •

# 十二指肠贾第虫 Rab11 互作蛋白的筛选\*

高梦遥,赵志腾,李璐,张西臣,王晓岑,李新,张楠,宫鹏涛\*\*

(吉林大学动物医学学院,吉林长春 130062)

**【摘要】** 目的 Rab11 属于 Rab 小分子 GTP 酶家族,主要参与贾第虫外泌体样囊泡的产生。研究贾第虫囊泡运输中的分子机制,探寻贾第虫 Rab11 蛋白的互作蛋白至关重要。方法 通过分子克隆技术构建含 His 标签的原核表达质粒 pET-32a-Rab11,经诱导表达和纯化,获得 Rab11 融合蛋白(rGdRab11)。用该蛋白免疫小鼠,制备抗血清,以此为抗体采用免疫荧光法观察 Rab11 蛋白的亚细胞定位。应用 His-pull down 联合质谱技术筛选贾第虫全虫蛋白中与 Rab11 蛋白互作的候选蛋白,并在 GiardiaDB 数据库和 Revigo 中对筛选的候选蛋白进行生物信息学分析。结果 成功表达和纯化出 Rab11 融合蛋白,并制备鼠源抗 Rab11 多克隆抗体。免疫荧光法观察 Rab11 蛋白定位于贾第虫滋养体细胞膜区域和细胞质中。共筛选出 528 个与 Rab11 特异性结合的候选互作蛋白,其中蛋白质评分大于 20 分的候选互作蛋白有 517 个,包括 124 个未知蛋白,393 个已知蛋白。GO 分析上述蛋白涉及组蛋白修饰、组蛋白单泛素化、代谢过程、建立或维持细胞骨架极性以及内吞等多种生物进程。结论 成功表达和纯化出 Rab11 融合蛋白,并制备了鼠抗 Rab11 多克隆抗体。筛选出贾第虫中与 Rab11 互作的候选蛋白 528 个,为研究贾第虫 Rab11 的分子机制奠定了理论基础。

**【关键词】** 十二指肠贾第虫;rGdRab11;His-pull down;LC-MS/MS;互作蛋白

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2024)01-0025-07

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jan;19(1):25-31.]

## Screening of interaction proteins of Rab11 in *Giardia duodenalis*

GAO Mengyao,ZHAO Zhiteng,LI Lu,ZHANG Xichen,WANG Xiaocen,LI Xi,ZHANG Nan,GONG Pengtao (College of Veterinary Medicine,Jilin University,Changchun 130062,China)

**【Abstract】** **Objective** Rab11,as a small GTPase,belongs to the Rab family,which is mainly involved in exosome-like vesicles production in *Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*). It is crucial to explore the molecular mechanism involved in *G. duodenalis* extracellular vesicles trafficking and to probe the Rab11 interaction proteins in *G. duodenalis*. **Methods**

A prokaryotic expression plasmid pET-32a-Rab11 containing His-tag was constructed by molecular cloning,and Rab11 fusion protein (rGdRab11) was obtained after protein induction,expression and purification. Mice were immunized and polyclonal antibodies were prepared. The subcellular localization of Rab11 protein was observed by immunofluorescence. His-pull down combined mass spectrometry was used to screen candidate proteins in *G. duodenalis* total proteins which interacted with Rab11,and the screened candidate proteins were analyzed bioinformatically in GiardiaDB and Revigo.

**Results** rGdRab11 was successfully expressed and purified,and the murine anti-Rab11 polyclonal antibody was prepared. Rab11 was localized in membrane regions and cytoplasm of *Giardia* trophozoite by immunofluorescence observation. A total of 528 candidate proteins interacting with Rab11 were screened,among which 517 candidate interaction proteins with protein score greater than 20 points,including 124 unknown proteins and 393 known proteins. GO analysis of the above proteins involved multiple biological processes,such as histone modification and ubiquitination,metabolic process,establishment or maintenance of cytoskeleton polarity,endocytosis,etc. **Conclusion** We expressed and purified Rab11 fusion protein successfully,and a murine anti-Rab11 polyclonal antibody was prepared. 528 candidate proteins that interact with Rab11 in *G. duodenalis* were screened,which lays a theoretical foundation for the study of the molecular mechanism of Rab11 in *G. duodenalis*.

**【Key words】** *Giardia duodenalis*;rGdRab11;His-pull down;LC-MS/MS;interacting proteins

\*\*\* 十二指肠贾第虫(*Giardia duodenalis*)简称贾第虫,是一种危害严重的寄生性人兽共患原虫<sup>[1-2]</sup>。贾第虫的生命周期主要包括迅速增殖的滋养体和抵抗环境变化的包裹。宿主主要因摄取了十二指肠贾第虫包裹污染的水或食物而被感染。经胃酸处理脱囊形成的滋养体附着在十二指肠上皮细胞上,可引起以恶心、呕

\* **【基金项目】** 吉林省科技发展计划项目(No. 20220508047RC,20220508101RC);国家重点研发计划资助项目(No. 2022YFE0114500)。

\*\* **【通讯作者】** 宫鹏涛,E-mail:gongpt@jlu.edu.cn

**【作者简介】** 高梦遥(1999-,女,吉林通化人,硕士,主要研究方向:预防兽医学。E-mail:2788847095@qq.com

吐、腹痛、水样腹泻,体重减轻以及婴幼儿发育迟缓等症状为主的贾第虫病(Giardiasis)<sup>[3-4]</sup>,是全球常见的腹泻疾病之一,在发展中国家,有着非常高的人群感染率和发病率<sup>[5]</sup>。此外,贾第虫是处在原核生物和真核生物之间的低等真核生物,被誉为“生物活化石”,同时也是一种研究真核生物的重要的“模式生物”<sup>[6]</sup>。

胞外囊泡是细胞间物质传递的载体,囊泡运输对细胞功能和生物体的正常发育至关重要。研究发现,贾第虫分泌的胞外囊泡携带多种贾第虫相关蛋白,参与宿主细胞免疫反应,以及细胞杀伤、转运等过程<sup>[7]</sup>。此外,贾第虫的胞外囊泡能调节树突状细胞,使其参与发病过程<sup>[7-8]</sup>。在这些过程中,Ras样GTP酶超家族中的Rab蛋白起关键作用,如与囊泡运输、跨膜信号转导和细胞骨架重排等一系列生物学过程<sup>[9-10]</sup>。Rab基因在进化过程中相对保守,在哺乳动物细胞中大约鉴定出70种Rab蛋白,在果蝇中已发现33种<sup>[11]</sup>,在秀丽隐杆线虫中有29种。在贾第虫已预测出3个Rab蛋白,分别为Rab1、Rab2和Rab11<sup>[12-13]</sup>,其中Rab11参与贾第虫中腔内囊泡(intraluminal vesicles)生物发生和外泌体样囊泡(exosome-like vesicles)的生产<sup>[14]</sup>。

多项研究表明Rab11是外泌体释放所必需的。在人类细胞中,Rab11参与胞外囊泡与质膜连接和外泌体的释放<sup>[15]</sup>。在秀丽隐杆线虫,Rab11和转运蛋白所需的内体分选复合物在TAT-5胚胎的质膜处富集,为胞外囊泡生产所必需。在果蝇,Rab11有助于外泌体的产生<sup>[16-18]</sup>。然而对于贾第虫Rab11协调囊泡运输的机制及其所需的不同分子成分尚不十分清楚。本研究旨在通过筛选Rab11相关蛋白,为进一步探究Rab蛋白及其互作蛋白在贾第虫囊泡运输中的作用奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 虫株、菌株、细胞株、质粒及实验动物** 十二指肠贾第虫WB株,HEK293T细胞及原核表达载体pET-32a均由吉林大学动物医学学院保存;感受态大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 和BL21(DE3)购自北京康为世纪生物有限公司。BALB/c小鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司。

**1.2 主要试剂** Taq酶,限制性内切酶EcoR I、Kpn I、HindIII、Xba I、Cla I,以及DL2000 DNA Marker和DL10000 DNA Marker均购自北京宝日生物技术有限公司;无缝克隆酶和预染蛋白Marker购自武汉赛维尔生物科技有限公司;PCR产物纯化试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒小提试剂

盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Ni-Agarose,His Resin和蛋白5 $\times$ Loading buffer购自北京康为世纪生物有限公司。

### 2 方法

**2.1 贾第虫的培养及cDNA提取** 从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出贾第虫WB虫株,置于37 $^{\circ}$ C水浴锅快速融解,在超净台中将贾第虫滋养体转接于盛有改良TYI-S-33培养液的培养管中,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养24~48h,显微镜下观察虫体生长状态。若虫体贴壁生长状态良好,生长至对数生长期即可进行传代培养。

将生长状态良好的贾第虫滋养体进行纯化,采用Trizol法提取贾第虫总RNA并反转录为cDNA,于-40 $^{\circ}$ C保存。

**2.2 Rab11基因克隆及原核表达载体构建** 根据GenBank中登录的贾第虫Rab11基因序列(GenBank:AF460175),运用SnapGene软件设计特异性引物。上游引物序列:5'-GCTGATATCGGATCCGAATTCATGACTGACGCGTACGACCAT-3'(下划线部分为EcoR I酶切位点),下游引物序列:5'-CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTGCAACGCTTCTTTTGCTTAGTCT-3'(下划线部分为HindIII酶切位点)。引物由库美生物有限公司合成。以贾第虫cDNA为模板,PCR扩增Rab11基因序列。反应体系:98 $^{\circ}$ C 2 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 5 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物置-20 $^{\circ}$ C保存。使用限制性内切酶EcoR I和HindIII对原核表达载体pET-32a进行双酶切,酶切产物保存于-20 $^{\circ}$ C备用。通过同源重组方式将目的基因片段与线性化载体进行连接。将连接产物转化至感受态DH5 $\alpha$ 中,转化菌均匀涂布于含氨苄青霉素的固体LB培养板上,倒置于37 $^{\circ}$ C培养箱培养12h。挑取单克隆菌落并扩大培养,提取重组质粒pET-32a-Rab11,经EcoR I和HindIII双酶切鉴定后委托库美生物有限公司测序。

**2.3 rGdRab11蛋白的诱导表达及纯化** 将pET-32a-Rab11重组质粒转化至BL21感受态细胞,培养后挑取单克隆菌落至300 mL LB液体培养基中于37 $^{\circ}$ C、160 r/min摇床培养至菌液A<sub>600</sub>值为0.6时加入终浓度1 mmol/L异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),37 $^{\circ}$ C、160 r/min诱导表达6h。离心收集菌体,加入20 mL 1 $\times$ PBS,超声破碎,离心取上清,沉淀用20 mL 1 $\times$ PBS重悬,采用SDS-PAGE检测蛋白表达情况。试验以pET-32a空载体作为对照。

取2 mL Ni-Agarose填料装入10 mL层析柱,用5倍柱体积ddH<sub>2</sub>O洗涤填料,5倍柱体积Binding buffer平衡层析柱。将蛋白溶液加入层析柱并控制流速,结合目的蛋白,随后用5倍柱体积Binding buffer

洗涤以除去杂蛋白,用5 mL洗脱液洗脱目的蛋白,采用SDS-PAGE分析蛋白纯化情况。

**2.4 鼠抗 Rab11 多克隆抗体血清的制备** 纯化的 rGdRab11 与弗式完全佐剂按 1:1 的比例乳化后皮下注射 BALB/c 小鼠,蛋白剂量为 100~200  $\mu\text{g}/\text{只}$ 。分别于首次免疫后第二周和第三周进行加强免疫,免疫剂量均为首次免疫的一半。末次免疫后 7 d 眼球采血,分离血清,采用间接 ELISA 测定血清抗体效价。

**2.5 Rab11 在贾第虫体内的定位** 将贾第虫滋养体悬液滴加于经多聚赖氨酸处理的细胞爬片上,37  $^{\circ}\text{C}$  静置 20 min;加入 4%多聚甲醛,室温固定 20 min,PBS 清洗 3 次;加入 0.25% Triton-X-100 透化处理 15 min,吸弃多余液体,PBS 清洗 3 次,3%BSA 室温封闭 2 h;加入用 PBST 作 1:100 稀释的鼠抗 Rab11 多克隆抗体血清,4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜,PBS 清洗 3 次;加入鼠源荧光二抗(1:100),室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 次后滴加抗荧光淬灭封片剂,倒置共聚焦激光扫描显微镜(型号 LSM700 显微镜;Carl Zeiss AG)下观察 Rab11 在贾第虫滋养体中的定位情况。

**2.6 His-pull down 筛选 rGdRab11 的互作蛋白** 将生长状态良好的贾第虫冰浴后 3 000 g 离心 10 min,弃去培养基,PBS 清洗沉淀 3 次。在沉淀中加入含 1%蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,提取贾第虫总蛋白,分别与结合 pET-32a 或 rGdRab11 蛋白的 His-Tag 蛋白纯化磁珠共孵育 12 h(融合蛋白已亲和固定在 Mag-Beads His-Tag Protein Purification),然后用 TBST 对共孵育过的 Mag-Beads His-Tag Protein Purification 进行清洗,再用 TBST 进行洗脱,收集蛋白溶液,采用 SDS-PAGE 电泳检测洗脱蛋白,分别用 0.25%考马斯亮蓝 G-250 和银染试剂盒染色后进行分析。试验设 pET-32a 对照组。

**2.7 LC-MS/MS 分析** 向 pull down 获得的 rGdRab11 互作蛋白(rGdRab11 IPs)与 His-Tag 互作蛋白(His IPs)中加入胰蛋白酶进行酶解,使还原烷基化后暴露出酶切位点的蛋白消化成肽段,然后使用 LC-MS/MS(nanoLC-QE)进行质谱分析,使用 Mascot 等质谱匹配软件分析 LC-MS/MS 数据,获得与 rGdRab11 相结合的候选蛋白质的信息。通过 Mascot 软件在 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库(<http://www.uniprot.org>, UniProt Knowledgebase)中对 rGdRab11 蛋白进行肽段指纹图谱蛋白的检索。

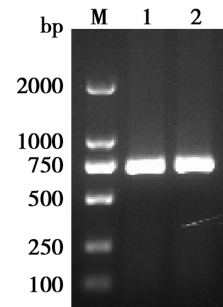
**2.8 生物信息学分析** 从检索的 rGdRab11 IPs 和 His IPs 中挑选差异化的蛋白,对差异蛋白进行 uniprotID 到 GeneID 的转换。获取的差异基因在 GiardiaDB(<https://giardiadb.org/giardiadb/app>)数据库中进行分析,即可对差异蛋白做 GO 注释。

在 Revigo 上作进一步分析,通过对 GO 项的 *P* 值进行关联分析,并剔除冗余的 GO 术语,与 uniprot 数据库进行比对得出更精简的 GO 功能富集。

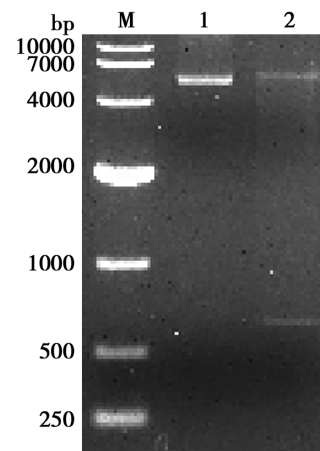
## 结果

### 1 贾第虫 Rab11 基因原核表达质粒的构建及鉴定

Rab11 基因 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,大小为 651 bp,与预期一致(图 1)。将目的基因片段与线性化载体进行连接,构建重组质粒 pET-32a-Rab11,经 EcoR I 和 HindIII 双酶切鉴定,插入目的片段与预期 Rab11 大小(651 bp)一致(图 2)。重组质粒测序后进行比对分析,与 Rab11 基因序列一致,pET-32a-Rab11 构建正确。



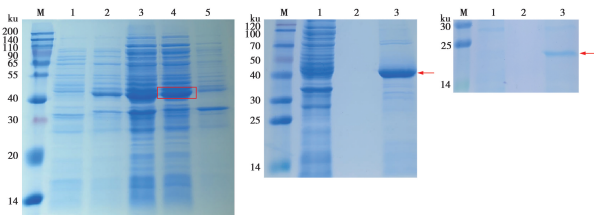
M DNA 标志物(DL2000) 1,2 Rab11 基因 PCR 产物  
图 1 Rab11 基因 PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析  
M DNA Marker DL2000 1,2 PCR amplification product of Rab11  
Fig. 1 PCR amplification of Rab11



M DNA 标志物(DL2000) 1 pET-32a-Rab11 2 pET-32a-Rab11 双酶切  
图 2 pET-32a-Rab11 原核表达载体双酶切鉴定  
M DNA Marker DL2000 1 Undigested plasmids 2 Double enzyme digestion of pET-32a-Rab11 vector  
Fig. 2 Double enzyme digestion of pET-32a-Rab11 vector

### 2 rGdRab11 蛋白的诱导表达及纯化

将 pET-32a-Rab11 转化宿主菌后用 IPTG 进行诱导,采用 SDS-PAGE 检测表达产物,结果显示重组蛋白分子质量为 43 ku(图 3A),与预期一致,且菌液的上清和沉淀中均有存在,以上清中含量较高。



A rGdRab11 蛋白表达形式的鉴定 M 蛋白分子质量标准 1 诱导空载体菌液 2 未诱导空载体菌液 3 诱导重组菌全菌液 4 诱导后重组菌裂解上清 5 诱导后重组菌裂解沉淀 B 镍柱纯化 rGdRab11 的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 流穿液 2 洗涤液 3 洗脱液 C 纯化 pET-32a 的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 流穿液 2 洗涤液 3 洗脱液

图 3 贾第虫 Rab11 蛋白的表达和纯化

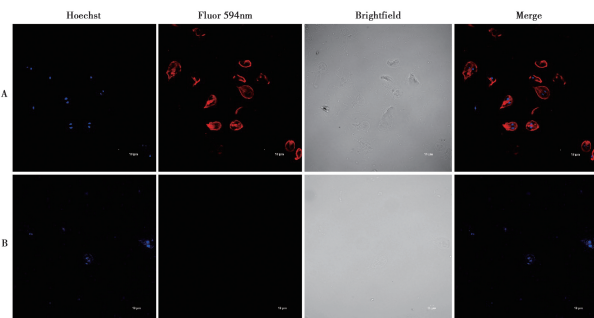
A Identification of rGdRab11 protein expression forms M Pre-stained protein Marker 1 Induced empty vector bacterial solution 2 Uninduced bacterial fluids 3 Induction of rGdRab11 bacterial solution 4 Supernatant ultrasound after rGdRab11 induction 5 Sediment ultrasound after rGdRab11 induction B Purified rGdRab11 SDS-PAGE analysis M Pre-stained protein Marker 1 Flow-through fluid 2 Washing liquid 3 Elution fluid C. Purification of pET-32a M Pre-stained protein Marker 1 Flow-through fluid 2 Washing liquid 3 Elution fluid

Fig. 3 Expression and purification of Rab11 from *G. duodenalis*

表达产物经 His-Tagged Protein Kit (Soluble Protein) 纯化后得到单一电泳条带的 rGdRab11 蛋白 (图 3B)。表明成功纯化出贾第虫 rGdRab11 蛋白。制备的 His 重组蛋白分子质量为 19 ku (图 3C)。

### 3 Rab11 在贾第虫体内的定位

以鼠抗 Rab11 多克隆血清为抗体进行免疫荧光试验,在倒置共聚焦激光扫描显微镜下可见贾第虫滋养体含有两个细胞核。Rab11 主要富集于贾第虫滋养体细胞膜区域和细胞质中(图 4)。



A Rab11 在贾第虫体内的定位 B 阴性对照

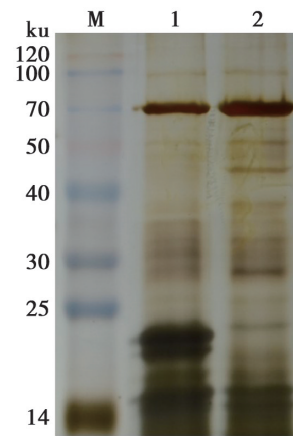
图 4 免疫荧光法检测 Rab11 在贾第虫体内的定位

A Subcellular localization of Rab11 in *G. duodenalis* B Negative control.

Fig. 4 Subcellular localization of Rab11 in *G. duodenalis* by immunofluorescence

### 4 His-pull down 联合质谱筛选 rGdRab11 的互作蛋白

pull down 的蛋白沉淀复合物经 SDS-PAGE 电泳后进行银染和考马斯亮蓝染色,结果如图 5 和图 6。与对照组相比,实验组在 14~100 ku 范围内存在大小不等的蛋白,且主要集中在 30~60 ku 处。

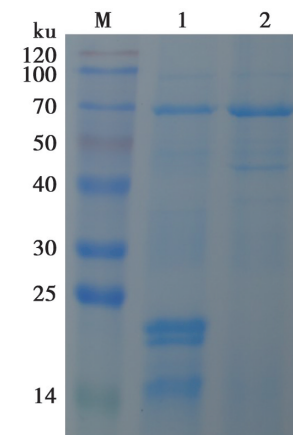


M 蛋白分子质量标准 1 pET-32a 与全虫蛋白共孵育 2 pET-32a-Rab11 与全虫蛋白共孵育

图 5 pET-32a-Rab11 和 pET-32a SDS-PAGE 银染分析

M Pre-stained protein Marker 1 Co-incubation of pET-32a and *G. duodenalis* total proteins 2 Co-incubation of pET-32a-Rab11 and *G. duodenalis* total proteins

Fig. 5 SDS-PAGE silver stain analysis of pET-32a-Rab11 and pET-32a



M 蛋白分子质量标准 1 pET-32a 与全虫蛋白共孵育 2 pET-32a-Rab11 与全虫蛋白共孵育

图 6 与全虫蛋白共孵育 pET-32a-Rab11、pET-32a 的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色分析

M Pre-stained protein Marker 1 Co-incubation of pET-32a and *G. duodenalis* total proteins 2 Co-incubation of pET-32a-Rab11 and *G. duodenalis* total proteins

Fig. 6 SDS-PAGE Coomassie Blue Staining analysis of pET-32a-Rab11 and pET-32a

### 5 贾第虫 Rab11 互作蛋白的 LC-MS/MS 分析

经质谱分析,实验组中共检测到 1 225 个 rGdRab11 互作蛋白,对照组中共检测到 1 470 个 pET-32a 互作蛋白。将对照组与实验组中都检测到的蛋白从实验组数据中删除,去除背景,得到 528 个可能与 rGdRab11 互作的候选蛋白(图 7)。

### 6 贾第虫 Rab11 的互作蛋白功能分析

根据质谱结果,有 528 个可能与 rGdRab11 互作的候选蛋白,其中蛋白质评分大于 20 分的有 517 个,包括 124 个未知蛋白和 393 个已知蛋白。对 393 个已

知蛋白进行 GO 功能分类分析, Level 2 级别 GO 功能富集词条总计 43 个, 其中生物学过程 15 个, 占总数 46.8%; 分子功能 12 个, 占总数 37.5%; 细胞组成部分 5 个, 占总数 15.7%(图 8)。在 Revigo 上作进一步分析, 发现在生物过程中这些差异蛋白大致与五大功能相关, 包括建立或者维持细胞极性、内吞作用、组蛋白修饰、建立或者维持微管细胞骨架极性和含氨基葡萄糖化合物代谢过程。在细胞组分中主要与组蛋白甲基转移复合物和质膜区域相关。在分子功能上主要与核糖体大亚基结合、微管加末端结合、赖氨酸 t-RNA 连接酶活性、脂肪酶活性和硫胺素二磷酸激酶活性相关(图 9)。GO 分析显示, 贾第虫 Rab11 可能通过与多种蛋白质相互作用参与上述多种生物学过程。



注: 绿色为 pET-32a 互作蛋白; 黄色为 rGdRab11 互作蛋白。

图 7 韦恩图分析 pET-32a 和 rGdRab11 互作蛋白的差异分析

Notes: "Green" pET-32a interacting proteins; "yellow" rGdRab11 interacting proteins.

Fig. 7 Venn Diagram analysis of the pET-32a and rGdRab11 interacting proteins

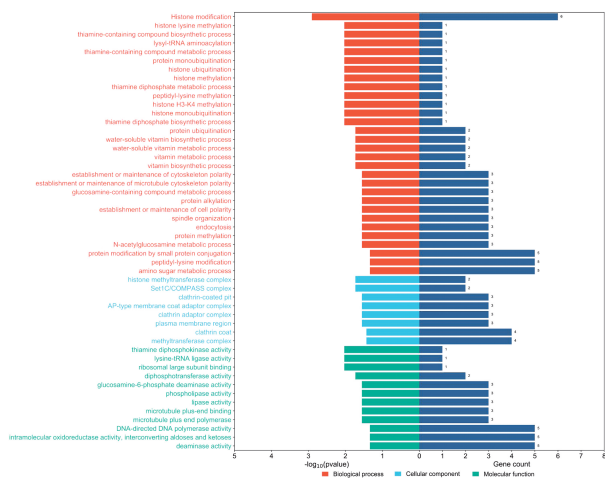


图 8 rGdRab11 互作蛋白 GO 功能富集

Fig. 8 GO function enrichment of rGdRab11 interacting proteins

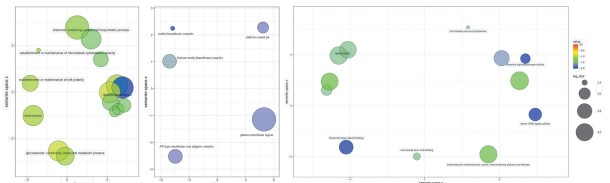


图 9 rGdRab11 互作蛋白气泡图

Fig. 9 Bubble chart of rGdRab11 interacting proteins

根据 prot\_hit\_num 即质谱过程中每个蛋白检测到的肽段数对所有 pull-down 结果蛋白进行排序, 得到 5 个检测丰度较高的蛋白(表 1)。GiardiaDB 数据库中的功能注释表明, 丰度最高的蛋白是丙酮酸磷酸二激酶(Pyruvate, phosphate dikinase), 它具有 ATP 结合、催化活性、激酶活性、金属离子结合、丙酮酸磷酸二激酶活性、转移酶活性等功能, 也参与磷酸化及丙酮酸代谢过程。第二个是 Tr 型 G 结构域蛋白 Tr-type (G domain-containing protein), 该蛋白是能与鸟苷二磷酸结合、具有 GTP 水解酶活性的一类信号传导蛋白。第三个是 CoA\_binding 结构域蛋白 (CoA\_binding domain-containing protein), 具有 ATP 结合和连接酶活性; 第四个是 LSU 核糖体蛋白 (LSU ribosomal protein L4/L1 family protein), 作为核糖体的结构成分, 在细胞内蛋白质生物合成中发挥重要作用; 第五个是锚蛋白 (Ankyrin, ANK) 重复序列, 为最常见的保守蛋白结构域之一, 可充当蛋白质相互作用的支架, 并在多种细胞学和生物学过程中发挥关键作用, 例如细胞间信号转导、转录和细胞周期调控等。此外, 还筛选到 3 个跨膜转运相关蛋白, 2 个磷脂转运相关蛋白以及 4 个与分泌途径相关的蛋白(表 1)。

## 讨论

Rab 蛋白调控囊泡运输的过程是复杂且多层次的。与其他小 GTP 酶相同, Rab 蛋白可以在不活跃的 GDP 结合形式和活跃的 GTP 结合形式之间进行转换, 这有助于驱动相互作用的蛋白质解码的可逆构象变化<sup>[19]</sup>。鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF)和 GTP 酶激活蛋白(GAP)通过调节 GTP/GDP 交换和内在 GTP 酶活性来调节其功能<sup>[20]</sup>。在 GTP 结合形式下, Rab 蛋白与不同的蛋白复合物相互作用, 促进运输囊泡到达不同的受体膜上。Rab 蛋白通常在功能上相互连接, 以调节细胞内隔室间的物质流动<sup>[21]</sup>。效应器、GEF 和 GAP 可以混杂结合, 并在不同的 Rab 蛋白之间共享。其中一些效应器、GEF 以及 GAP 通过相同的结合部位与 Rab 蛋白结合, 另一些也可通过不同的结合域与不同的 Rab 蛋白结合。例如, Rabaptin-5 是第一个被证明通过不同的结合位点与不同的 Rab 蛋白结合的效应器, 从而将物质进入早期内体连接到再

循环<sup>[22]</sup>。

**表 1 His-pull down 筛选的 rGdRab11 互作蛋白**  
**Table 1 rGdRab11 interacting proteins screened by His-pull down**

| 项目<br>Item | 蛋白编号<br>Protein No. | 蛋白分子<br>质量(ku)<br>Protein mass | 蛋白注释<br>Protein annotation   | 肽段得分<br>Peptide<br>score |
|------------|---------------------|--------------------------------|--|--------------------------|
| 高丰度<br>蛋白  | V6THZ0              | 98.822                         | Pyruvate, phosphate dikinase<br>丙酮酸、磷酸二激酶  | 4951                     |
|            | V6TBX0              | 100.332                        | Tr-type G domain-containing protein<br>Tr 型 G 结构域蛋白                                | 1080                     |
|            | V6THC3              | 100.551                        | CoA binding domain-containing protein<br>酰基 CoA 结合蛋白                               | 947                      |
|            | V6TH18              | 35.280                         | LSU ribosomal protein<br>LSU 核糖体蛋白   | 596                      |
|            | A8B440              | 88.068                         | ANK<br>锚蛋白   | 554                      |
| 跨膜转运       | DHA2_3470           | 126.001                        | ABC transporter domain-containing<br>protein<br>ABC 转运蛋白结构域                        | 116                      |
|            | GLP15_3377          | 119.987                        | ABC transporter domain-containing<br>protein<br>ABC 转运蛋白结构域                        | 39                       |
|            | GL50581_3254        | 123.176                        | MRP-like ABC transporter<br>MRP 样 ABC 转运蛋白   | 33                       |
| 磷脂转运       | GL50581_3968        | 41.153                         | Phosphatidylinositol transfer protein<br>alpha isoform<br>磷脂酰肌醇转移蛋白 α 亚型           | 157                      |
|            | QR46_0666           | 244.987                        | Phosphoinositide-3-kinase/<br>catalytic/<br>alpha polypeptide<br>磷酸肌醇-3-激酶/催化/α 多肽 | 62                       |
|            | QR46_4582           | 54.554                         | Sec61 alpha subunit<br>Sec61α 亚基   | 43                       |
| 分泌途径       | GMRT_15591          | 233.352                        | Sec7 family protein<br>Sec7 家族蛋白   | 34                       |
|            | GLP15_5017          | 239.678                        | Sec7 domain-containing protein<br>含 Sec7 结构域的蛋白                                    | 25                       |
|            | GMRT_13424          | 66.875                         | Vacuolar protein sorting 26<br>囊泡蛋白分选 26   | 33                       |

研究发现, Rab 蛋白除了参与内吞再循环, 还与胞质分裂、代谢作用、吞噬作用、病毒侵染以及信号传递等细胞内重要的生命活动有关, 一些研究表明 Rab 蛋白及其效应因子的突变和缺失还与多种疾病的发生密切相关。在寄生虫中, Rab11 同样有上述 Rab 蛋白功能。在秀丽隐杆线虫, Rab11 被募集至分裂沟并在胞质分裂中发挥重要作用<sup>[23]</sup>。在阿米巴原虫, Rab11 可能参与铁和血清饥饿诱导阿米巴形成包囊这一过程。在贾第虫, Rab11 和肌动蛋白细胞骨架参与贾第虫成囊, 引导特定囊泡到达囊壁<sup>[24]</sup>。此外, 贾第虫 Rab11 还参与贾第虫中腔内囊泡生物发生和外泌体样囊泡的生产。然而关于贾第虫 Rab11 在发挥其功能过程中的分子机制尚不十分清楚, Rab11 相关的分子机制仍是研究的重点。

本研究同源克隆了贾第虫 Rab11 基因并在体外原核表达了 rGdRab11 融合蛋白。原核表达的原理是

指通过基因克隆技术, 将外源目的基因, 通过构建表达载体并导入表达菌株, 使其在特定的原核生物内表达。其优点在于能够短时间获得基因表达产物, 操作简便, 价格低廉。但其缺乏转录后加工系统, 只能表达 cDNA, 且表达的蛋白未经过修饰, 往往不具有天然活性。本研究制备的 rGdRab11 蛋白是否具有天然活性尚不确定。蛋白质作为生命活动的执行者, 其功能往往体现在与其他蛋白质的相互作用中, 蛋白质之间的互作网络对调控细胞及其信号具有重要意义。本研究通过 His-pull down 与质谱技术鉴定了贾第虫中与 Rab11 可能互作的蛋白。His-pull down 技术是一种广泛应用于研究蛋白质互作的方法, 其中基于体外相互作用的洗脱技术具有简单易行、操作方便、特异性强、减少假阳性率等特点。该方法联合 LC-MS/MS 可以更好地捕获瞬时或弱蛋白质间的相互作用, 并实现高通量。

通过对筛选出的蛋白进行 GO 功能分析, 发现这些互作蛋白涉及组蛋白修饰、组蛋白单泛素化、代谢过程、内吞作用等多种生物进程。尽管目前对贾第虫 Rab11 蛋白的研究主要集中在囊泡转运上, GO 分析展现出和以往认知不同的结果, Rab11 可能和在哺乳动物体内一样在贾第虫中具有更多的功能, 包括在一项对于贾第虫甲硝唑耐药性的蛋白质组学分析中发现耐药虫株 Rab11 有着更低的表达水平<sup>[25]</sup>。本研究筛选到的 3 个 ABC 转运蛋白具有多种功能, 属于分布极为广泛的膜蛋白家族, 已被证明是恶性疟原虫多效性耐药的決定因素, 并在疟原虫的脂质代谢中发挥作用<sup>[26-27]</sup>, 两者之间是否有联系有待进一步研究。此外, 本研究筛选到两个磷脂转运相关蛋白。研究表明在秀丽隐杆线虫中 Rab11 与香叶基香叶基结合, 影响 NHR-49 的核质分布和转录活性。它们的动态相互作用使细胞能够感知由于脂质耗竭而产生的代谢需求, 并通过增加营养吸收和脂质代谢来做出反应<sup>[28]</sup>。因此猜测贾第虫 Rab11 在脂质代谢中是否也发挥类似的作用。筛选出的其他潜在互作蛋白是否在贾第虫中与 Rab11 一起参与囊泡运输等相关进程有待进一步实验验证。本研究使用的 His-pull down 是一种筛选互作蛋白质的体外试验技术, 但是体内蛋白互作要比体外蛋白互作更加复杂。体外蛋白互作无法模拟细胞内天然的互作环境, 需要通过免疫共沉淀技术或双分子荧光互补实验进行验证。

本研究成功表达和纯化出 Rab11 融合蛋白, 并制备了鼠抗 Rab11 多克隆抗体。筛选出贾第虫中 528 个与 Rab11 互作的候选蛋白, 为进一步探寻贾第虫 Rab11 的分子机制和生物学功能奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Adam RD. Biology of *Giardia lamblia* [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(3): 447-475.
- [2] Dixon BR. *Giardia duodenalis* in humans and animals-Transmission and disease [J]. Res Vet Sci, 2021, 135(20): 283-289.
- [3] Jacobson C, Williams A, Yang R, et al. Greater intensity and frequency of *Cryptosporidium* and *Giardia* oocyst shedding beyond the neonatal period is associated with reductions in growth, carcass weight and dressing efficiency in sheep [J]. Vet Parasitol, 2016, 228: 42-51.
- [4] Leung AKC, Leung AAM, Wong AHC, et al. Giardiasis: An overview [J]. Recent Patents on Inflammation Allergy Drug Discovery, 2019, 13(2): 134-143.
- [5] Lee S, Ngui R, Tan T, et al. Understanding *Giardia* infections among rural communities using the one health approach (Article) [J]. Acta Tropica, 2017, 176: 349-354.
- [6] Lenka C, Carmen F, Hehl AB. Five facts about *Giardia lamblia* [J]. PLOS Pathogens, 2018, 14(9): e1007250.
- [7] 赵盼盼. 贾第虫胞外囊泡激活小鼠巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的分子机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [8] Evans-Osses I, Mojoli A, Mongui M, et al. Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response *in vitro* [J]. Europ J Cell Biol, 2017, 96(2): 131-142.
- [9] Pfeffer S, Aivazian D. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(11): 886-896.
- [10] Ali B R, Seabra M C. Targeting of Rab GTPases to cellular membranes [J]. Biochem Soc Transact, 2005, 33(4): 652-656.
- [11] 邵佳瑶. Rab35 蛋白对果蝇肠道干细胞增殖和分化的影响 [D]. 东北林业大学, 2022.
- [12] Langford TD, Silberman JD, Weiland MEL, et al. *Giardia lamblia*: identification and characterization of Rab and GDI proteins in a genome survey of the ER to Golgi endomembrane system [J]. Experim Parasitol, 2002, 101(1): 13-24.
- [13] Hardin WR, Li R, Xu J, et al. Myosin-independent cytokinesis in *Giardia* utilizes flagella to coordinate force generation and direct membrane trafficking [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2017, 114(29): E5854-E5863.
- [14] Moyano S, Musso J, Feliziani C, et al. Exosome biogenesis in the protozoa parasite *Giardia lamblia*: A model of reduced interorganellar crosstalk [J]. Cells, 2019, 8(12): 1600.
- [15] Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11 [J]. J Cell Sci, 2002, 115(Part 12): 2505-2515.
- [16] Hyenne V, Apaydin A, Rodriguez D, et al. RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion (Article) [J]. J Cell Biol, 2015, 211(1): 27-37.
- [17] Ann W, Corey P, Peter S, et al. The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos (Article) [J]. Current Biol, 2011, 21(23): 1951-1959.
- [18] Corrigan L, Redhai S, Leiblich A, et al. BMP-regulated exosomes from *Drosophila* male reproductive glands reprogram female behavior (Article) [J]. J Cell Biol, 2014, 206(5): 671-688.
- [19] Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system [J]. Cold Spring Harbor Perspectives Biol, 2014, 6(11): a022616.
- [20] Barr FA. Rab GTPases and membrane identity: Causal or inconsequential? (Review) [J]. J Cell Biol, 2013, 202(2): 191-199.
- [21] Pfeffer SR. Rab GTPase localization and Rab cascades in Golgi transport [J]. Biochem Soc Transact, 2012, 40(6): 1373-1377.
- [22] Gaetano V, Vladimir R, Savvas C, et al. Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5 [J]. EMBO J, 1998, 17(7): 1941-1951.
- [23] Aisa S, Miyuki S, Katsuya S, et al. REI-1 Is a guanine nucleotide exchange factor regulating RAB-11 localization and function in *C. elegans* embryos [J]. Developmental Cell, 2015, 35(2): 211-221.
- [24] Araceli CR, Gloria LA, Ching CWang, et al. Rab11 and actin cytoskeleton participate in *Giardia lamblia* encystation, guiding the specific vesicles to the cyst wall [J]. PLoS Neg Trop Dis, 2010, 4(6): e697.
- [25] Sascha Krakovka UR, Yukiko M, Lars E, et al. Characterization of metronidazole-resistant *giardia intestinalis* lines by comparative transcriptomics and proteomics [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 834008.
- [26] Murithi J M, Deni I, Pasaje C F A, et al. The Plasmodium falciparum ABC transporter ABCI3 confers parasite strain-dependent pleiotropic antimalarial drug resistance [J]. Cell Chem Biol, 2022, 29(5): 824-839(e6).
- [27] Tran PN, Brown SHJ, Mitchell TW, et al. A female gametocyte-specific ABC transporter plays a role in lipid metabolism in the malaria parasite [J]. Nature Communications, 2014, 5: 4773.
- [28] Watterson A, Tatge L, Wajahat N, et al. Intracellular lipid surveillance by small G protein geranylgeranylation [J]. Nature, 2022, 605(7911): 736-740.

【收稿日期】 2023-08-14 【修回日期】 2023-11-04