

文章编号: 1004 - 7271(2008)03 - 0263 - 05

## 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因 cDNA 片段的 克隆及序列分析

叶旻玉<sup>1</sup>, 刘利平<sup>1</sup>, 戴习林<sup>2</sup>, 沈默忱<sup>1</sup>, 徐 灿<sup>1</sup>

(1. 上海水产大学省部共建种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 200090;

2. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

**摘 要:**对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) Toll 样受体基因的 cDNA 片段进行了克隆。从凡纳滨对虾提取肌肉、鳃和肝胰腺中的总 RNA, 根据黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) Toll 样受体的 TIR 区设计引物, 从鳃中逆转录扩增得到 cDNA 序列, 进行测序。所得序列结果与其他物种的已知 TIR 及 TLR 氨基酸序列进行聚类分析建立系统进化树, 并进行氨基酸序列同源性比较。结果表明所得序列与斑节对虾(*Penaeus monodon*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的 Toll 样基因 TIR 区域的氨基酸序列有较高的相似性。

**关键词:**凡纳滨对虾; Toll 样受体; 基因克隆

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Cloning and Sequence Analysis of cDNA encoding toll-like receptor in *Litopenaeus vannamei*

YE Min-yu<sup>1</sup>, LIU Li-ping<sup>1</sup>, DAI Xi-lin<sup>2</sup>, SHEN Mo-chen<sup>1</sup>, XU Can<sup>1</sup>

(1. Key Open Laboratory of Aquatic Genetic Resources Excavation and Utilization Jointly Constructed by the University, the Municipality and the Ministry of Education, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Key Open Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecology by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** In this paper, cDNA encoding Toll-like receptor was isolated from total RNA of haemocytes, hepatopancreas, muscle, gill of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Degenerate primers were designed based on the highly conserved TIR domain. Sequence was compared with other species, including *Penaeus monodon*, *Tribolium castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Caenorhabditis elegans* and *Strongylocentrotus purpuratus* by constructing phylogenetic tree. The comparison showed that there is high similarity between the shrimp TIR domain and the known TIR sequences in other species. The paper supplies fundamental data for better understanding of the immune system of the shrimp *Litopenaeus vannamei*.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; Toll-like receptor; gene cloning

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国重要的养殖种类,近年来,各种病害的流行,给对虾养殖

收稿日期: 2007-03-01

基金项目: 上海市科技登山行动计划重点攻关项目[2006(063919112)]

作者简介: 叶旻玉(1984-),女,浙江定海人,硕士研究生,专业方向为生物技术。E-mail: myye5496@126.com

通讯作者: 戴习林, E-mail: xldai@shfu.edu.cn

业带来了严重损失。为降低病害发生,减少经济损失,国内外围绕对虾免疫机制和对虾基因组展开了大量研究并取得了一系列成果,包括 EST 数据库中免疫基因的发现<sup>[1-2]</sup>以及一系列免疫相关因子的分离纯化与基因克隆和表达研究,例如酚氧化酶<sup>[3]</sup>、抗菌肽<sup>[4]</sup>、溶菌酶<sup>[5]</sup>、蛋白酶抑制剂<sup>[6]</sup>、凝集素<sup>[7]</sup>、其它模式识别受体等,对虾的免疫调控机制也开始受到人们的重视。

先天性免疫应答是机体防御感染性疾病的第一道防线, Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)是先天性免疫模式识别的主要受体,是一类重要的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)。TLR 通过识别病原相关模式分子,激活先天免疫系统产生炎症因子、抗微生物肽抵御入侵病原,同时作为预警信号,向抗原呈递细胞发出警报,从而启动获得性免疫系统。到目前为止,TLR 家族在人类和鼠类中发现了 11 个,在果蝇中发现了 9 个。然而,对虾类免疫系统的研究主要集中在一些应急系统、抗菌肽和模式识别受体,如酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase activating system)<sup>[8-9]</sup>,对免疫的调节研究甚少。本文克隆了凡纳滨对虾 Toll 样受体基因的 cDNA 片断,为今后深入研究虾类免疫调节机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

凡纳滨对虾(体长 13~15 cm)购于广东省湛江中联水产有限公司,实验前用盐卤配制海水充气暂养 7 天(盐度至 7~8,水温 26 ℃),使其适应实验室内养殖环境。

#### 1.1.2 主要试剂

TRNzol Total RNA Reagent(总 RNA 提取)试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(普通离心柱型),DNA Marker 2000 购自上海天根生物公司;pMD-19T 载体连接体系购自宝生物工程公司(TAKARA,大连);DEPC、氨苄青霉素购自上海生工生物工程公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 提取总 RNA

利用 TRNzol 试剂盒提取凡纳滨对虾肌肉、血淋巴、肝胰腺和鳃的总 RNA。操作步骤参照使用说明书。取适量总 RNA 样品,用 DEPC 水稀释后,用紫外分光光度计测量样品的纯度。变性琼脂糖电泳检查 RNA 的完整程度。确认 RNA 完整无降解后,-80 ℃保存备用。

#### 1.2.2 引物设计

根据果蝇(*Drosophila melanogaster*) Toll/IL-1R (TIR) 的保守序列,利用 Primer 5.0 软件结合 BLAST 分析软件设计了随机引物用来扩增不同的基因片段(表 1)。同时设计凡纳滨对虾  $\beta$ -Actin 引物,作为内标。引物合成由上海生工生物工程公司完成。

#### 1.2.3 cDNA 的合成

以获得的总 RNA 为模板进行反转录,合成 cDNA。

#### 1.2.4 PCR 扩增基因片段

反应条件为:94 ℃变性 2 min,然后 94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 8 min,1 个循环;4 ℃保温。产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根)回收纯化,连接到 pMD19-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑选阳性克隆,由上海生物工程技术公司测序。

### 1.3 分析方法

采用 PRIMER PREMIER 5.0 设计引物;利用 NCBI 网站搜索 TIR 序列;CLUSTAL W 和 MEGA 3.0

表 1 实验中用到的引物及序列

Tab.1 Primers and sequences referred in the experiments

引物 primers	
$\beta$ -Actin-F	5'-AGTAGCCGCCCTGTTGTAGAC-3'
$\beta$ -Actin-R	5'-TTCTCCATGTCGTCCAGT-3'
TIR-F	5'-GAYAARGAYAARAARTTYGAYGC-3'
TIR-R	5'- RTCCARAACCANGGRTCNCCCCA -3'
TLR-F	5'-GCTAATCTGACCATTCCTA-3'
TLR-R	5'-TCTCGTCCAACCTCGCTCT-3'

分析不同生物 TLR 序列的分子进化树及分子遗传距离。

## 2 结果

### 2.1 提取的总 RNA 浓度

分光光度计测定 TRIzol 提取的虾各组织样品总 RNA 的 OD 值,  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.8 以上。琼脂糖凝胶电泳检测, 28S、18S 条带清晰。表明已经获得纯度和质量都较好的总 RNA。

### 2.2 以 cDNA 为模板 PCR 扩增产物电泳图

所取的肌肉、肝胰腺和鳃样品中仅样品鳃通过电泳检测有 PCR 扩增产物。TLR 和 TIR 基因扩增产物经克隆测序, 分别得到 615 bp 的 TLR 基因和 583 bp 的 TIR 基因序列。

### 2.3 TIR 基因系统进化树及序列同源性对比

#### 2.3.1 系统进化树

利用推导的氨基酸序列, 在 NCBI 上搜索此序列的同源序列, 并与之进行比较, 利用 CLUSTAL W 进行排序。利用 MEGA 3.0 软件对所有比对的 TIR 氨基酸序列进行分子系统学分析, 将氨基酸序列转化成遗传距离, 进行聚类分析。

从 Genbank 中查取斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、紫海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 克隆出的 TIR 基因的氨基酸序列, 与本实验克隆出的凡纳滨对虾 TIR 基因, 用 CLUSTAL W 和 MEGA 3.0 软件构建系统发育树 (图 2), 显示不同动物物种间和不同属种间虾类的进化及其亲缘关系。

#### 2.3.2 核苷酸及其推导的氨基酸序列同源性比较

凡纳滨对虾 TIR 核酸及推导氨基酸序列同其它种类已知 TIR 基因的比对结果如图 3 所示。

## 3 讨论

Toll 样受体 (Toll like receptor) 一词源于 Toll 受体, 后者是在 1980 年研究果蝇胚胎发育时发现的一种蛋白<sup>[10]</sup>, Hashimoto 等 1988 年首先报道了 Toll 基因的分离及其特性<sup>[11]</sup>。5.3 kb cDNA 序列分析结构显示 Toll 基因编码一个跨膜蛋白, 由 803 个氨基酸组成的富含亮氨酸重复序列的胞外区 (leucine-rich repeats, LRR)、跨膜区和 269 个氨基酸组成的胞内区构成。其中, 潜在的糖基化位点和半胱氨酸残基均分布于胞外。Toll 基因产物是跨膜蛋白的发现为人们推测其功能提供了框架。而直到 1996 年才发现 Toll 不仅参与果蝇的天然免疫, 更为重要的是它还可

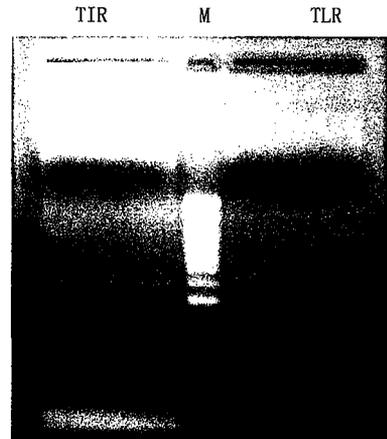


图 1 电泳检测样品鳃的 PCR 扩增产物  
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products amplified  
M (600 bp), TIR 基因, TLR 基因

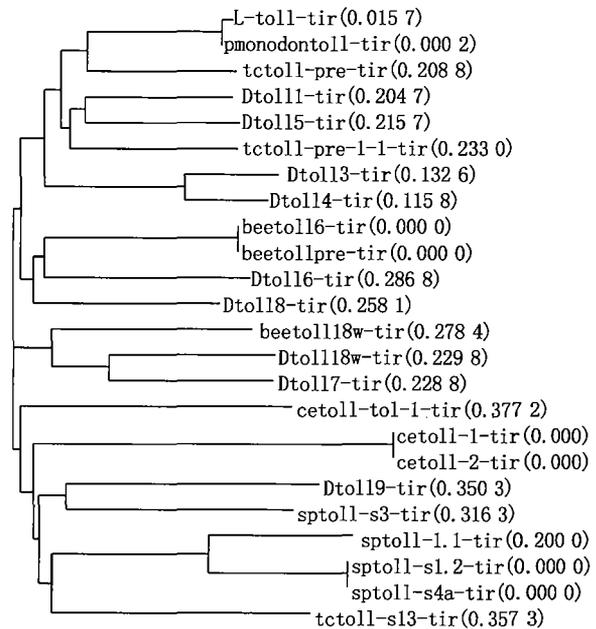


图 2 采用邻位相连法构建系统发育树  
Fig. 2 The sequences aligned by CLUSTAL W program  
and the phylogenetic tree constructed by neighbour  
joining methods with MEGA version 3.0

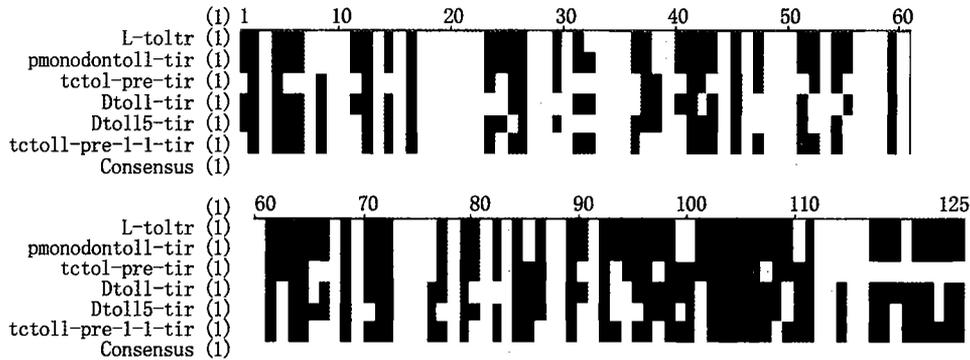


图3 凡纳滨对虾中结构域第1~125个位点的氨基酸与其他物种 *TIR* 基因氨基酸序列的比较

Fig.3 The comparison of amino acid 1 - 125 site of *TIR* structure region in *L. vannamei* with other species

其中黄色突出显示表示相同的氨基酸,蓝色突出显示表示部分相同的氨基酸。用于比较的 *TIR* 基因的物种为: 凡纳滨对虾 (*L. vannamei*)、斑节对虾 (*P. monodon*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)。

以区分不同的微生物(甚至同种微生物的不同结构)并诱发相应的效应<sup>[12]</sup>。1994年, Nomuria 等<sup>[13]</sup>发现在哺乳动物有一种与果蝇 Toll 蛋白相似的蛋白,该蛋白胞膜外结构域富含亮氨酸的重复序列; Taguchi 等<sup>[14]</sup>于1996年克隆并定位了编码这种蛋白的基因,此蛋白即现在的 TLR1,这是发现的人类第一个果蝇 Toll 的同源物。1997年和1998年, Medazhitov 和 Rock 等在人体中克隆出了另外一种 Toll 的同源物,称为 hToll,后改名为 Toll 样受体 (TLR),即如今的 TLR4 蛋白<sup>[15-16]</sup>。目前已被确认的 TLRs 家族成员至少13种,并分别命名为 TLR1 - TLR13。

TLRs 是一类跨膜蛋白受体,其胞外段有17~31个富含亮氨酸的重复序列 (leucine-rich repeats, LRRs),参与 PAMPs 的识别;胞内区存在一段序列保守区,该序列与 IL-1 受体的胞内区的保守序列有高度同源性,被称为 TIR (Toll/IL-1-receptor homologous region) 结构域。因此,TLRs 也属于 IL-1 受体超家族的成员。TIR 区域是 TLRs 与其下游蛋白激酶相互作用的关键部位。该结构与髓样分化因子 88 (MyD88)<sup>[17]</sup>相互作用,参与信号传递。凡纳滨对虾依靠天然免疫反应系统来防御病原入侵,对异物的识别是免疫应答的第一部研究表明在其他无脊椎动物中存在识别的结合细菌,真菌和病毒细胞成分的蛋白因子,这些蛋白因子可以识别并结合微生物的脂多糖及葡聚糖等并且激发一系列的免疫反应,但这类蛋白因子的基因,尤其是在免疫识别中起重要作用的 Toll 样受体,目前在对虾中被成功克隆的报道甚少。

在昆虫和哺乳动物中,Toll 及 TLRs 保存受体的关键在先天免疫和炎症反应<sup>[18]</sup>。TLRs 已经在不同的动物,例如线虫<sup>[19]</sup>,紫海胆 (GenBank accession no. AAK25761),昆虫<sup>[20-21]</sup>,斑马鱼<sup>[22]</sup>,鸡<sup>[23]</sup>和哺乳动物<sup>[24]</sup>被识别。然而,迄今为止没有和 Toll 相同的组织在虾上被识别。在这项研究中,我们从凡纳滨对虾组织中克隆了 Toll 相关基因片段。

凡纳滨对虾 Toll 内含 Toll 蛋白质的特征区域:一个胞内 TIR 区域<sup>[25]</sup>。凡纳滨对虾中结构域第1~125和34~158个位点的氨基酸序列与斑节对虾、赤拟谷盗和果蝇 *TIR* 基因序列比较显示出较高的相似性。说明昆虫,与虾比较接近。

在疾病的监控和诊断中,通常疾病的发生发展会伴随着病原的变化及机体免疫系统成分的改变,仅有病原的检测是不够的,需结合机体本身的免疫因子的检测,才能得出更合理,更可靠的结论。因 Toll 样受体对病原体的识别是机体免疫防御的第一道防线,只有将免疫识别成分的检测、病原的检测和疾病的发生发展结合起来,才能真正做到早诊断早治疗。

相信随着对海洋生物 Toll 样受体家族的深入研究,更多更有效的药物将被进一步开发和利用,从而为海水养殖特别是病害防治作出应有的贡献。

## 参考文献:

- [1] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25:565 - 577.
- [2] Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, *et al.* Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 13(1):69 - 83.
- [3] Söderhäll K, Cerenius L, Johansson M W. The prophenoloxidase activating system in invertebrates [M]//Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta G R (editors). *New Directions in Invertebrate Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, 1996:229 - 253.
- [4] Destoumieux D, Bulet P, Loew D, *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda) [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:28398 - 28406.
- [5] Millar D A, Ratcliffe N A. *Invertebrates* [M]//Turner R J (editor). *Immunology, a comparative approach*. England: John Wiley & Sons Ltd, 1994:29 - 68.
- [6] Jiménez-Vega F, Vargas-Albores F, Soderhall K. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18(2):101 - 108.
- [7] Cominetti M R, Marques M R F, Lorenzini D M, *et al.* Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26:715 - 721.
- [8] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity [J]. *Curr Opin Immunol* 1998, 10:23 - 28.
- [9] Lee M H, Osaki T, Lee J Y, *et al.* Peptidoglycan recognition proteins involved in 1,3-beta-D-glucan-dependent prophenoloxidase activation system of insect [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:3218 - 3227.
- [10] Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, *et al.* A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 283:476 - 486.
- [11] Hashimoto C, Hudson K L, Anderson K V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein [J]. *Cell*, 1988, 52:269 - 279.
- [12] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults [J]. *Cell*, 1996, 86:973 - 983.
- [13] Nomuria N, Miyajima N, Sazuka T, *et al.* Prediction of the coding sequences of unidentified human genes (I): the coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1 [J]. *DNA Res*, 1994, 1:27 - 35.
- [14] Taguchi T, Mitcham J L, Dower S K, *et al.* Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4 p14 [J]. *Genomics*, 1996, 32(3):486 - 488.
- [15] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptor immunity [J]. *Nature*, 1997, 388:394 - 397.
- [16] Rock F L, Hardium G, Timans J C, *et al.* A family of human receptor structurally related to *Drosophila* Toll [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:588 - 593.
- [17] O'Neill L A. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31:643 - 647.
- [18] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124:783 - 801.
- [19] Pujol N, Link E M, Liu L X, *et al.* Reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Curr Biol*, 2001, 11:809 - 821.
- [20] Luna C, Hoa N T, Zhang J, *et al.* Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Insect Mol Biol*, 2003, 12:67 - 74.
- [21] Naitza S, Ligoxygakis P. Antimicrobial defences in *Drosophila*: the story so far [J]. *Mol Immunol*, 2004, 40:887 - 896.
- [22] Meijer A H, Krens S F G, Rodriguez I A M, *et al.* Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish [J]. *Mol Immunol*, 2004, 40:773 - 783.
- [23] Fuku A, Inoue N, Matsumoto M, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of chicken Toll-like receptors—a single chicken Toll covers multiple molecular patterns [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:47143 - 47149.
- [24] Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system [J]. *Int. Immunopharmacol*, 2001, 1:625 - 635.
- [25] Arts J A J, Cornelissen F H J, Cijssouw T, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23:504 - 513.