

文章编号: 1674 - 5566(2014)03 - 0338 - 07

罗氏沼虾 Toll 样受体基因 cDNA 片段的克隆及序列分析

苏 建¹, 戴习林¹, 刘 红¹, 刘伟利¹, 高 翔¹, 刘 洁¹, 丁福江²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海申漕特种水产开发公司, 上海 201516)

摘 要: 提取罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 上海养殖群体活体鳃、肌肉、肝胰腺、血液和雄性腺 5 种组织的总 RNA; 应用 RT-PCR 技术, 从鳃组织中克隆到 Toll 样受体 (TLR) 基因部分 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析。基因序列分析表明: 所得罗氏沼虾 TLR 基因 cDNA 序列长 1 875 bp, 包含 1 728 bp 的开放阅读框, 可编码 575 个氨基酸残基; 该部分 TLR 是一个跨膜蛋白, 存在胞外区 LRR、LRR-CT、LRR-NT 结构域及关键的胞内区 TIR 结构域, 具备 Toll 样受体家族的典型结构特征; TIR 结构域与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosian*) Toll 样受体基因 TIR 区域的氨基酸序列具有很高的相似性。

研究亮点: Toll 样受体是一类重要的模式识别受体, 能特异性识别病原微生物的 PAMP 分子而引发先天性免疫反应, 使免疫细胞释放细胞免疫因子, 在水生甲壳动物免疫系统中占有重要地位。研究罗氏沼虾 Toll 样受体基因, 可为随后开展虾类免疫基因的结构功能、基因表达、细菌或病毒免疫以及育种的相关研究提供理论基础。

关键词: 罗氏沼虾; Toll 样受体; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S 917

文献标志码: A

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 是先天性免疫模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 中一类重要模式识别受体, 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中, 在引发免疫和炎症反应中发挥关键性作用, 是连接先天性免疫与获得性免疫的桥梁。至今, 已在人、小鼠等脊椎动物和海洋动物等无脊椎动物中发现存在 Toll1 ~ 13 不同类型的同系物, 其功能主要是通过特异性识别病原微生物存在的病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 分子, 从而激活先天性免疫系统, 使免疫细胞释放细胞因子, 发挥免疫调节作用, 相关 PAMP 分子主要有蛋白、糖类、脂质、核酸及某些内源性分子等^[1-2]。

海洋节肢动物主要依靠先天性免疫应答防御感染性疾病, TLR 蛋白是先天性免疫系统的重要组成部分。至今, 已对几种具有重要经济价值

的虾、蟹 TLR 基因先后进行过基因克隆和表达研究, 如凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[3-4]、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[5]、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[6] 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)^[7] 及中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[8] 等。此外, 近年来也报道过一些有关罗氏沼虾 Toll 通路组成方面的研究, 如作为 Toll 相关基因群成员的 *Crustin* 基因^[9], 以及 LGBP、LBP、PGBP、BGBP 等模式识别蛋白基因^[10], 结果表明他们在先天性免疫应答中发挥十分重要作用。但到目前为止, 国内外有关罗氏沼虾 TLR 基因方面研究报道甚少。本研究从罗氏沼虾上海养殖群体的活体鳃组织中, 克隆到一段罗氏沼虾 TLR 基因 cDNA 序列, 并进行了生物信息学分析, 以期为进一步研究罗氏沼虾的先天性免疫系统功能提供理论基础。

收稿日期: 2013-11-17 修回日期: 2014-02-16

基金项目: 上海市科学技术委员会重点攻关项目 (11391901400); 上海市科技兴农重点攻关项目 [沪农科攻字 (2010) 第 1-6 号]; 上海市教育委员会重点学科建设项目 (J50701)

作者简介: 苏 建 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产育种。E-mail: 55me@163.com

通信作者: 戴习林, E-mail: xldai@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用虾于 2013 年 8 月采自上海申漕特种水产开发公司上海养殖群体,健康无病,体长 7 ~ 9 cm,体重 13 ~ 20 g,实验前在实验室暂养一周(水温 28 ℃),使其适应实验室环境,实验结束时间为 2013 年 10 月。

TRNzol 试剂、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(普通离心柱型)、DNAMarker2000 和 Top10 感受态细胞购自天根生物科技(北京)有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒,pMD-19T 载体连接体系购自宝生物工程有限公司(TaKaRa,大连);DEPC、X-gal、IPTG 和氨苄青霉素等购自上海生物工程服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

按 TRNzol 试剂操作使用说明书提取罗氏沼虾活体的鳃、肌肉、肝胰腺、血液和雄性腺 5 种新鲜组织的总 RNA。所提取总 RNA 经紫外分光光度计浓度测定和琼脂糖电泳完整程度检验后,置 -80 ℃ 保存备用。

取 2 μL 各组织的总 RNA 为模板,以 Oligo dT 为引物,用 PrimerScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 cDNA 第一条链,方法按说明书进行,并用罗氏沼虾 β-actin 内参引物验证 cDNA 第一条链,合格后置 -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计

根据本实验室获得的罗氏沼虾雄性腺组织转录组数据中 TLR 基因片段,利用 Primer 5.0 软件设计基因特异引物(表 1)进行扩增;再结合验证后序列重新设计引物扩增相应基因片段;同时用罗氏沼虾 β-actin 引物作为内参^[11]。引物合成由上海生物工程服务有限公司完成。

1.2.3 基因片段的克隆

PCR 反应体系为:19 μL ddH₂O,25 μL 2 × Tap PCR MasterMix,10 μmol/L Primer Forward 及 Reverse 各 2.5 μL,cDNA 模板 1 μL。反应条件为:94 ℃ 4 min,94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,36 个循环;72 ℃ 延伸 8 min,4 ℃ 保温。

扩增 PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化,连接于 pMD19-T 载体,4 ℃ 过夜(16 h)并转染到 Top10 感受态细胞。涂布平板,进行

蓝白斑筛选,挑取阳性克隆接种于含 Amp 的新鲜 LB 培养基,37 ℃ 过夜培养后抽取质粒。重组质粒经 PCR 扩增鉴定,选阳性质粒送上海生物工程服务有限公司测序,所得 cDNA 片段根据重叠区域进行拼接。

表 1 罗氏沼虾 Toll-like receptor 基因克隆所用引物
Tab.1 Primer used for cloning of Toll-like receptor gene in *Macrobrachium rosenbergii*

引物	序列(5' - 3')
TLR-1F	CCAAATACAAGCTCTGCCTTCA
TLR-1R	CAACAACCAACCCTGAGATT
TLR-2F	CTTCGTTGACTGTFCTACCG
TLR-2R	CGATGAGTAAACAGCCAAACC
TLR-3F	TCTCATACAGCAGCCATTCTGT
TLR-3R	CAGCAGGTAAGTCCTTGTGGTA
TLR-4F	TCCAAACTCTACGCTAATGTC
TLR-4R	AAGTCCATCCAAGGAGGTAAT
β-actinF	GAGACCTTCAACACCCCGC
β-actinR	TAGGTGGTCTCGTGGATGCC

按照以上扩增体系和扩增条件对肌肉、肝胰腺、血液和雄性腺 4 种组织进行相应 cDNA 片段扩增。

1.3 序列分析

所得 cDNA 序列片段,用 DNAMAN 软件分析推导氨基酸序列;用 GenBank 在线 BLASTP 进行 TIR 区域氨基酸序列同源性比对;用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线分析蛋白保守区、信号肽和跨膜区;用 CLUSTALW 和 MEGA 5.0^[12] 软件进行多重比对和系统进化树构建。

2 结果与分析

2.1 鳃总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

紫外分光光度计测定罗氏沼虾鳃总 RNA 的 OD 值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8 ~ 2.0 之间,用 1% 的琼脂糖电泳检测,28S、18S 条带清晰,说明提取到高质量的 RNA(图 1)。以 cDNA 第一链为模板,β-actin 做内参引物进行特异性扩增,获得一条与目标大小一致的特异性条带,证明 cDNA 第一链合成成功。

2.2 TLR 基因的 cDNA 片段克隆

以鳃总 RNA 逆转录的 cDNA 第一链为模板,TLR-1F 和 TLR-1R 为引物,通过 RT-PCR,扩增到一条特异性条带,经克隆、测序,长 529 bp,与雄

性腺转录组中 *TLR* 基因片段比对,结果一致;在相同的条件下,对肌肉、肝胰腺、血液和雄性腺 4 种组织总 RNA 进行逆转录扩增,也检测到相同大小的特异性条带(图 2),推测罗氏沼虾 *TLR* 基因可能广泛分布于这些组织中。结合该段序列,重新设计引物扩增、克隆和测序,最终拼接得到长为 1 875 bp 的 cDNA 片段。

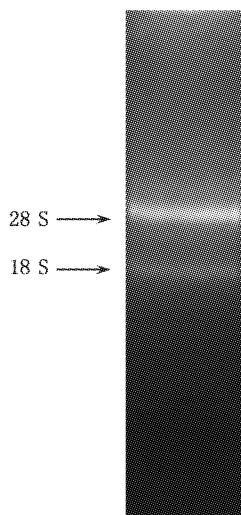


图 1 鳃总 RNA 电泳图
Fig. 1 Electrophoresis profile of the total RNA in gill tissue

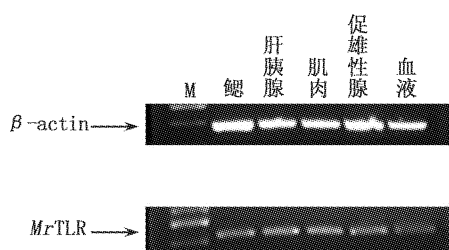


图 2 罗氏沼虾不同组织中 *TLR* 的扩增
Fig. 2 *MrTLR* mRNA amplification products in different tissues

2.3 *TLR* 基因 cDNA 片段推导氨基酸序列的基本特征

经 DNAMAN 软件分析,所克隆到罗氏沼虾 *TLR* 基因 cDNA 片段,含 1 728 bp 的开放阅读框,为可编码 575 个氨基酸残基的 Toll 样受体蛋白;经 SMART 在线分析,结果显示该部分罗氏沼虾 *TLR* 为跨膜蛋白,包括胞外区 2 个富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRR)、2 个 LRR-CT(LRR-C-terminal)和 1 个 LRR-NT(LRR-N-terminal)结构域,其中 LRR 由 24 个氨基酸组成,

含由 23 个氨基酸组成的一次跨膜区;胞内区为典型的 TIR 结构域(Toll/IL-1 receptor homologous region),这与 *TLRs* 家族蛋白包含的结构基本一致(图 3)。

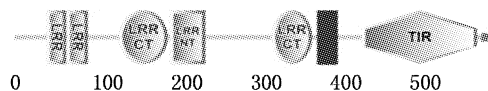


图 3 部分罗氏沼虾 *TLR* 蛋白结构域分析结果
Fig. 3 Domain prediction of the part of *M. rosenbergii* Toll-like receptor protein

2.4 TIR 结构域氨基酸序列同源性比较及系统发生树构建

将罗氏沼虾 Toll 样受体 TIR 区域进行在线 BLASTP 氨基酸序列同源性比对,结果显示与日本囊对虾 Toll(79%, $E = 4e - 70$,)和凡纳滨对虾 Toll2(80%, $E = 7e - 70$, *Lvtoll2*)的同源性最高,其次是中国明对虾(76%, *Fctoll*)、斑节对虾(76%, *Pmtoll*)、日本囊对虾 Toll2(76%, *Mjtol2*)、中华绒螯蟹 Toll(74%, *Estoll*)、凡纳滨对虾 Toll(74%, *Lvtoll*)、拟穴青蟹 Toll(74%, *Sptoll*)和中华绒螯蟹 Toll2(72%, *Estoll2*),随后是凡纳滨对虾 Toll3(57%, *Lvtoll3*);对以上物种的 TIR 区域氨基酸序列用 CLUSTALW 软件进行多重比对,结果如图 4 所示,说明罗氏沼虾 Toll 样受体的 TIR 区域与其他种类的十足目动物具有很高的相似性。

选择已克隆其他种类的十足目动物、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、佛罗里达弓背蚊(*Camponotus floridanus*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、达氏按蚊(*Anopheles darlingi*)及埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的 TIR 序列构建分子系统进化树。结果显示,在系统树中罗氏沼虾 TIR 与日本囊对虾 Toll 和凡纳滨对虾 Toll2 聚在一起,而与凡纳滨对虾 Toll3 位于不同分枝上,说明克隆到的罗氏沼虾 *TLR* 蛋白同日本囊对虾 Toll 和凡纳滨对虾 Toll2 关系最近(图 5)。

3 讨论

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)作为一种大型经济虾类,在我国水产养殖业中占有重要地位。但近年来,由于常受到诺达病毒(*Macrobrachium rosenbergii* noda virus, *MrNV*)和卫星病毒(extrasmall virus, *XSV*)引发的病毒性感染^[13],以及由溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*) 和木糖型葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*) 等病原引起的细菌性疾病的威胁^[14-17],一定程度上影响着罗氏沼虾养殖业的发展。甲壳动物和其他无脊椎动物类似,在感染疾病后,缺乏像脊椎动

物那样完备的获得性免疫系统,而主要依靠先天性免疫系统抵御病毒和细菌等病原微生物入侵^[18]。先天性免疫系统的激活,主要是通过自身的模式识别受体与病毒和细菌上存在的 PAMP 分子特异性结合来实现^[19-20]。

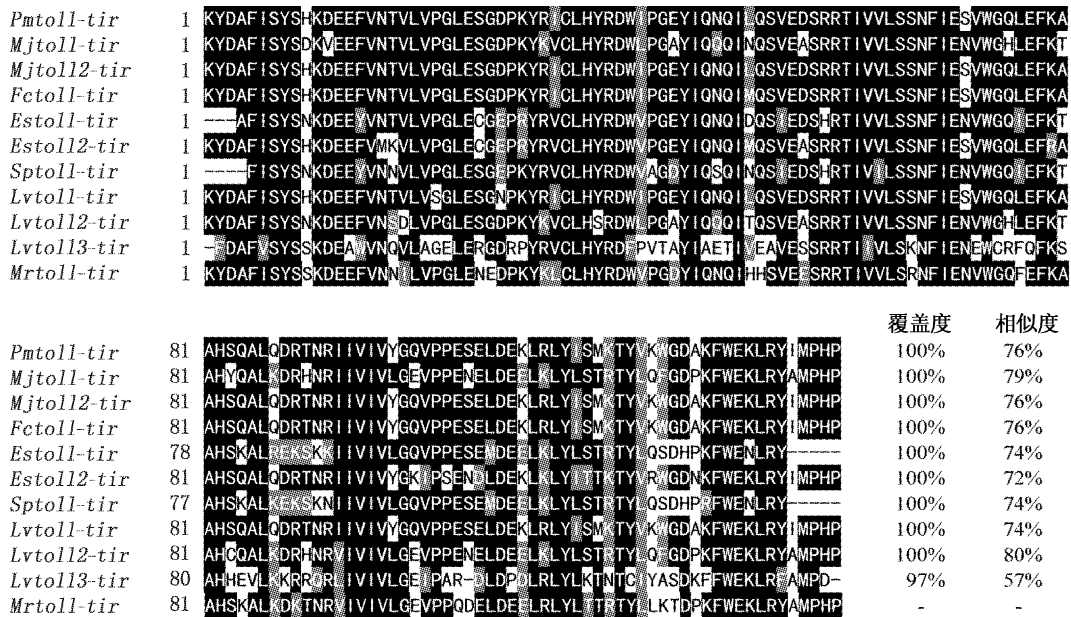


图 4 罗氏沼虾与其他种类的十足目动物的 TIR 区域多重比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of TIR domains of *Mrtoll* and other types of toll genes in decapoda

相同的标为黑色,相似的标为灰色。

Toll 样受体家族作为先天性免疫系统中重要的模式识别受体,是甲壳动物免疫学研究的重要组成部分,在进化过程中高度保守,属于 I 型跨膜蛋白,分为胞外区、跨膜区和胞内区三部分^[21]。胞外区存在富含亮氨酸重复基序,称为 LRR 功能域,而跨膜区富含半胱氨酸,其胞内区存在一段高度保守的序列,因与 IL-1 (Interleukin-1) 受体胞内区十分相似而被称为 Toll/IL-1 受体同源区 (Toll/IL-1-receptor homologous region, TIR)。对克隆到的罗氏沼虾 TLR 的 cDNA 片段进行氨基酸序列分析,在其胞外区找到 2 个 LRR、2 个 LRR-CT (C-terminal LRR) 和 1 个 LRR-NT (N-terminal LRR) 结构域;含由 23 个氨基酸组成的一次跨膜区;胞内区含完整的 TIR 结构域,具有 TLRs 家族典型结构特征。TLRs 胞外区一般有

19~25 个 LRR,每个 LRR 由 24~29 个氨基酸组成,常以串联的方式分布于胞外区域,参与识别各种病原体,并与相应的配体结合进而激活 TLRs,而配体识别主要由 LRR 序列决定^[22]。从昆虫和哺乳动物的 TLR 研究中发现其结构和功能存在差异,关键在于胞外区的 LRR 序列不同^[23],TLRs 根据胞外区 LRRs 结构差异,可分脊椎动物类 TLR (Vertebrate-like TLR, V-TLR) 和原口动物类 TLR (Protostome-like TLR, P-TLR) 两大类,P-TLR 胞外区除了具有 V-TLR 胞外区含有的“LRRNT-LRRs-LRRCT”基序外,还含有一组“LRRCT-LRRNT”序列^[24-25]。目前已知罗氏沼虾 TLR 胞外区的 2 个 LRR 结构都由 24 个氨基酸残基组成,但 LRRs 结构组成尚不清楚,因此,需要进一步研究确认。

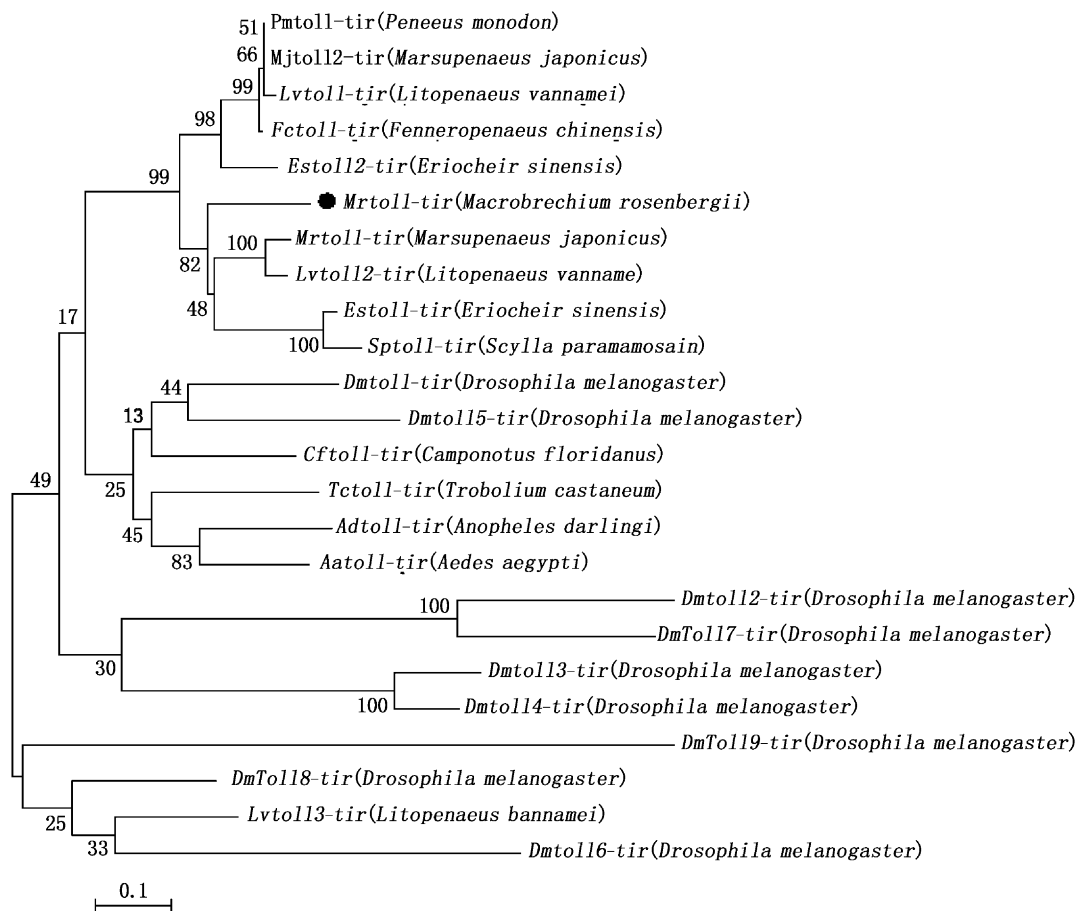


图5 采用邻位相连法构建系统发育树

Fig. 5 The sequences aligned by CLUSTALW program and the phylogenetic tree constructed by neighbor joining methods with MEGA version 5.0

TLRs 家族所介导信号转导机制与果蝇 Toll 类似,其 TIR 结构域作为 TLRs 的关键结构,当 PAMPs 分子作用于细胞膜表面 TLRs 后,TIR 结构域能与下游髓样分化蛋白 88 (Myeloid differentiation protein 88, MyD88) 相结合,经一系列反应最终启动细胞内炎症因子合成释放而达到免疫目的。此外,发现 TLRs 家族胞内 TIR 结构十分保守,这非常有助于配体和受体间信号识别与转导,现已知主要有 MyD88、Mal、TRIF、TRAM 和 SARM 等 5 种接头蛋白存在^[26]。LI^[27]等在锯缘青蟹中发现一种 MyD88 同系物,受到哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染刺激后,血液组织中 MyD88 与 TLR 表达量显著提升,但受到金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 侵染,仅 MyD88 表达量提高,这说明甲壳动物在应对革兰氏阴性菌感染时两者相互作用。

模式识别受体研究对揭示甲壳动物非特异

性免疫反应及调控机制具有重大意义。根据序列特征和系统进化分析,可将目前所知虾类的 TLRs 分为 Toll1、Toll2 和 Toll3 三种不同类型的同系物,凡纳滨对虾 Toll1 参与抗菌免疫反应^[4]。对罗氏沼虾 TLR 基因 TIR 结构域氨基酸序列与其他种类的无脊椎动物进行多重比对,结果显示与虾、蟹的同源性在 57% ~ 80% 之间,说明 TIR 结构域在进化上表现出很高的保守性,其中与日本囊对虾 Toll1 和凡纳滨对虾 Toll2 的同源性最高,且系统进化树分析同样显示三者之间的关系最近,因此推测罗氏沼虾 TLR 应具备与 Toll1 和 Toll2 两种同系物相似的免疫功能。本实验从上海养殖群体活体鳃组织中克隆到罗氏沼虾 TLR 的部分 cDNA 序列并进行生物信息学分析,同时在肌肉、血液、肝胰腺及雄性腺 4 种组织中扩增到相应的罗氏沼虾 TLR 基因片段,为随后深入开展罗氏沼虾 TLR 基因表达、结构功能、细菌或病

毒免疫及育种的相关研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] ADEREM A, ULEVITCH R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. *Nature*, 2000, 406: 782 – 787.
- [2] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses [J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(10): 987 – 995.
- [3] YANG L S, YIN Z X, LIAO J X, et al. A Toll receptor in shrimp [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(8): 1999 – 2008.
- [4] WANG P H, LIANG J P, GU Z H, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Toll-like receptors (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 359 – 371.
- [5] ARTS J A J, CORNELISSEN F H J, CIJSOUW T, et al. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 504 – 513.
- [6] YANG C, ZHANG J, LI F, et al. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 564 – 574.
- [7] MEKATA T, KONO T, YOSHIDA T, et al. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 122 – 133.
- [8] YU A Q, JIN X K, GUO X N, et al. Two novel Toll genes (EsToll1 and EsToll2) from *Eriocheir sinensis* are differentially induced by lipopolysaccharide, peptidoglycan and zymosan [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(4): 1282 – 1292.
- [9] JESU A, ANNIE J G, DHANARAJ M, et al. Crustin, a WAP domain containing antimicrobial peptide from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Immune characterization [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 109 – 118.
- [10] DU J, ZHU H X, LIU P, et al. Immune responses and gene expression in hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* challenged by a novel pathogen *Spiroplasma MR-1008* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 315 – 323.
- [11] HSU P I, LIU C H, TSENG D Y, et al. Molecular cloning and characterisation of peroxinectin, a cell adhesion molecule, from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(1): 1 – 10.
- [12] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731 – 2739.
- [13] RAVI M, NAZEER B A, TAJU G, et al. Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3): 428 – 433.
- [14] 樊星, 赵笑笑, 李阳阳, 等. 罗氏沼虾仔虾病原菌的分离鉴定及耐药性试验 [J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(5): 1008 – 1011.
- [15] 姜兰, 邓国成. 罗氏沼虾肌肉白浊病原研究 [J]. *水生生物学报*, 2002, 26(5): 477 – 482.
- [16] JAYAPRAKASH N S, PAI S S, PHILIP R. Isolation of a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus* from necrotic larvae of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(3): 187 – 191.
- [17] 徐洋, 沈锦玉, 姚嘉赞, 等. 罗氏沼虾主要病害研究概况 [J]. *生物学杂志*, 2012, 29(6): 74 – 76.
- [18] LOKER E S, ADEMA C M, ZHANG S M, et al. Invertebrate immune system: not homogeneous, not simple, not well understood [J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 10 – 24.
- [19] MEDZHITOV R, JANEWAY C A. Innate immune recognition: mechanisms and pathways [J]. *Immunological Reviews*, 2000, 173(1): 89 – 97.
- [20] MEDZHITOV R, JANEWAY C A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system [J]. *Science*, 2002, 296(5566): 298 – 300.
- [21] MASAHIRO Y, SHIZOU A. TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2005, 560: 1 – 9.
- [22] LOIARRO M, GALLO G, FANT N, et al. Identification of critical residues of the MyD88 death domain involved in the recruitment of downstream kinases [J]. *Biological Chemistry*, 2009, 284(41): 28093 – 28103.
- [23] GAY N J, GANGLOFF M. Structure and function of Toll receptors and their ligands [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, 76: 141 – 165.
- [24] HUANG S F, YUAN S C, GUO L, et al. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity [J]. *Genome Research*, 2008, 18(7): 1112 – 1126.
- [25] TAKU H, MARIANO L C, CYNTHIA M, et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome [J]. *Development Biology*, 2006, 300(1): 349 – 365.
- [26] LUKE A J, ANDREW G B. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(5): 353 – 364.
- [27] LI X C, ZHU L, LI L G, et al. A novel myeloid differentiation factor 88 homolog, SpMyD88, exhibiting SpToll-binding activity in the mud crab *Scylla paramamosain* [J].

Cloning and sequence analysis of cDNA encoding Toll-like receptor in *Macrobrachium rosenbergii*

SU Jian¹, DAI Xi-lin¹, LIU Hong¹, LIU Wei-li¹, GAO Xiang¹, LIU Jie¹, DING Fu-jiang²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shencao Special Aquatic Product Development Company, Shanghai 201516, China)

Abstract: In this study, we cloned a novel partial cDNA of toll-like receptor (TLR) gene from total RNA of gill of living giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) of Shanghai population by RT-PCR by using primers designed from the partial sequence from transcriptome sequencing result, then it was sequenced and bioinformatically analyzed. Sequence analysis showed that the part of TLR cDNA was 1 875 bp in length and the open reading frame encoded a deduced protein with 575 amino acids residues. The part of TLR is a transmembrane protein that contains several domains like LRR, LRR-CT, LRR-NT motif in the extracellular domain and a TIR domain in the intracellular region, the common structural features of TLRs. The results of the amino acids sequence of TIR were compared with other species, indicating a highly conserved similarity among *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus monodon*, *Eriocheir sinensi* and *Scylla paramamosian*. Besides, similar RF PCR products of TLE gene were also amplified from total RNA of other different tissues including haemocytes, hepatopancreas, muscle and androgenic gland.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Toll-like receptor; gene cloning; sequence analysis