

doi: 10.7541/2016.59

罗氏沼虾*Rab11*基因cDNA克隆及其组织表达分析

夏正龙 黄雪娜 黄振远 陈雪峰 高 强 濮剑威 慎佩晶 彭 菲 杨国梁

(浙江省淡水水产研究所, 国家罗氏沼虾遗传育种中心, 浙江省淡水水产遗传育种重点实验室, 湖州 313001)

摘要: 为了发掘罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)免疫相关基因, 研究Rab蛋白(Ras-related proteins in brain)在罗氏沼虾免疫应答中发挥的作用, 研究采用RACE-PCR技术克隆了罗氏沼虾*Rab11*基因全长cDNA序列, 记为*MrRab11*。全长1381 bp, 包括226 bp的5'UTR, 511 bp的3'UTR和645 bp的开放阅读框, 编码214个氨基酸, 含有一个Rab结构域。氨基酸序列比对显示, 罗氏沼虾与冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、蚤状溞(*Daphnia pulex*)、叶蝉(*Homalodisca vitripennis*) *Rab11*一致性分别为82%、83%和82%。软件预测, *MrRab11*编码的蛋白分子量约为23.75 kD, 等电点约为5.34。实时荧光定量表达分析表明, *MrRab11*基因在罗氏沼虾各组织中都有表达, 肝胰腺中的表达量最高, 其次是肌肉和肠道。在阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)感染12h后, 罗氏沼虾肝胰腺中*MrRab11*的表达量上升, 显著高于对照组($P<0.05$), 推测这是*MrRab11*对阴沟肠杆菌的应激表达, *MrRab11*在肝胰腺中参与了罗氏沼虾免疫应答过程。

关键词: 罗氏沼虾; *Rab11*; 组织表达; 免疫应答

中图分类号: Q344+.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2016)03-0443-08

Rab蛋白(Ras-related proteins in brain)是小分子GTP结合蛋白家族中的最大亚族, 分子量介于20—25 kD, 由180—200个氨基酸构成^[1]。研究表明Rab蛋白存在于所有真核生物中, 进化过程比较保守, 但不同物种间Rab蛋白种类差别较大: 如裂殖酵母(*Fission yeast*)中Rab蛋白种类最少, 只有7种^[2], 人类基因组中Rab蛋白种类最多, 有60多种^[3]。不同的Rab蛋白定位于不同的细胞器上, 通过结合和水解GTP来调节不同的膜泡运输过程^[4], 是膜泡运输的重要调节因子, 在膜泡的形成、转运、黏附、融合及信号传导等过程起重要作用^[5-7]。

目前对Rab蛋白的研究, 很多集中在动植物的病害和免疫方面。转基因水稻中高度表达的*Rab11*能通过诱导茉莉酸应答基因的表达显示出对病原的抗性^[8]。提高*Rab11*的活性有助于对患有亨丁顿舞蹈症小鼠的治疗^[9]。*Rab11a*还与人类癌细胞的增殖和运动有关^[10], 有望成为各种癌症的检测指

标以及恶性肿瘤新的治疗靶点^[11]。在水产动物中: 被爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) *Rab11a*^[12]、*Rab11b*^[13]的表达量均显著上调, 表明这两种Rab蛋白参与了胞吞途径的免疫应答。被鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) *Rab*基因表达水平也显著上调, 且在感染1.5h后达到最高水平, 提示Rab蛋白可能与虾蟹的免疫调节有关^[14]。RNA干扰沉默*Rab*基因后, 吞噬细胞比率和吞噬指数都显著下降; 而*Rab*基因高度表达的日本对虾(*Penaeus japonicus*)吞噬细胞比例及吞噬指数都显著上升, 表明Rab蛋白在吞噬中有重要作用, 推测机体中Rab蛋白主要通过调节吞噬作用来抵抗细菌感染, 可以通过提高Rab蛋白表达量来达到加强对细菌的抵抗力^[15]。而沉默*Rab9*和*Rab11*基因后, HIV病毒的繁殖会受到抑制^[16, 17]; 沉默*Rab7*基因后, 可以抑制斑节对虾(*Penaeus monodon*)感染白斑综合征(WSSV)

收稿日期: 2015-04-30; 修订日期: 2016-01-20

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY12C19008); 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B04); 浙江省重大科技专项(2012C12907); 浙江省科研院所专项(2014F50002)资助 [Supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY12C19008); National Key Technologies R & D Program of China (2012BAD26B04); Major Science and Technology Projects of Zhejiang Province (2012C12907); Scientific Research Institutes Special Project of Zhejiang Province (2014F50002)]

作者简介: 夏正龙(1987—), 男, 浙江龙泉人; 硕士研究生; 主要从事水产遗传育种工作。E-mail: zjhill@126.com

通信作者: 杨国梁, E-mail: yg10572@163.com

以及黄头病毒(YHV)^[18]。体外抗体试验也表明Rab7蛋白或其抗体能显著降低对虾感染WSSV后的死亡率,推测Rab蛋白是病毒在体内复制所必需的细胞因子,可以通过沉默Rab基因抑制病毒在体内繁殖^[19]。综上研究表明Rab基因参与了机体对细菌和病毒免疫,且Rab基因对细菌和病毒的免疫机制可能存在差异。

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)为世界上个体最大的淡水虾,是重要的经济水产品种^[20, 21]。随着养殖规模的扩大,其病害也越来越多,给养殖行业造成巨大的损失^[22, 23]。近年来多地罗氏沼虾育苗过程中疾病频发,幼体出膜几天后就大批死亡,本实验室连续跟踪研究发现,阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)是引发幼体此类病害的主要病原。发掘罗氏沼虾免疫相关基因,研究其免疫机制,对病害防治等方面将会有重要作用。本研究克隆了罗氏沼虾Rab11基因全长cDNA序列,分析其生物信息学特征并研究其对阴沟肠杆菌的免疫应答,为进一步研究该基因的功能和罗氏沼虾免疫抗病机制等方面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

150尾罗氏沼虾取自浙江嘉兴养殖户,在实验室暂养(水温25℃),每天换水10%,定时投喂饲料2次。试验用阴沟肠杆菌从高邮2014年初发病的幼体中分离得到。罗氏沼虾暂养一周后进行细菌感染试验,挑选健康、规格统一[体重:(15.5±1.1)g]的个体70尾,平均分成两组:试验组在肌肉注射100 μL经生理盐水稀释的阴沟肠杆菌(2.5×10^8 cfu/mL),对照组注射等量生理盐水,两组分别饲养在两个相同的水箱中。注射前取样一次,作为空白对照,记为0样品,注射后0.5h、1.5h、3h、6h、12h、

24h、48h和96h分别从对照组和试验组取样(每组取样3尾),取罗氏沼虾肝胰腺、肌肉、鳃、心脏、肠道、胃等组织立即放入液氮中,然后保存于-80℃冰箱,用于RNA提取。

1.2 总RNA提取和cDNA第一链合成

用柱式动物RNAout试剂盒(北京天恩泽)提取罗氏沼虾总RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量,NanoDrop 2000分光光度计(Thermo)测定RNA浓度,以2 μg总RNA为模板通过反转录试剂盒(Takara)合成cDNA第一链。

1.3 罗氏沼虾Rab11全长cDNA克隆

根据NCBI数据库获得的罗氏沼虾EST序列(登录号:EL695849),和数据库中相近物种序列比对分析保守性,用Primer 5.0 软件设计Rab11基因特异性引物(表1)扩增基因的3'末端,其中APOL和AP为通用引物。以反转录的cDNA第一链为模板,MrRab11 3'F1和AOLP分别为上下游引物进行第一轮PCR,反应体系为25 μL,反应条件为:94℃ 3min;94℃ 45s,56℃ 30s,72℃ 1min,30个循环;72℃ 8min。以第一轮PCR扩增产物稀释10倍后为模板,MrRab11 3'F2和AP为上下游引物进行第二轮巢式PCR,退火温度为60℃,其他条件同第一轮。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,切下目的条带,用DNA 胶回收试剂盒(Axygen)回收,回收产物与pMD19-T 载体(Takara)连接,转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α敏感态细胞中,于LB Amp+平板上培养过夜,通过菌液PCR验证,阳性克隆送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.4 MrRab11 cDNA及其编码氨基酸序列分析

用SeqMan软件分析测序结果,去掉载体序列,拼接即得MrRab11全长cDNA 序列,查找开放阅读框(ORF)并推测其氨基酸序列。通过Blast在线工具查找数据库中同源序列,ClastalW2对同源序列比对

表1 试验中用到的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
MrRab113'F1	GTTTGCCACCAGAAGCATAGAG	56
MrRab113'F2	TTTGCCGANAAGGAGGGACT	60
AOLP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTT	
MrRab11-qF	ACAAATCTGACTTGCGTCACCTGC	60
MrRab11-qR	GGGTTCATTGCTCCACTCTCG	60
Mrβ-actinF	GTCGCATTGGACTTCGAGCAG	60
Mrβ-actinR	GGCATAACAGGTCCTTACGGATGTC	60
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	

分析; 用EXPASY工具分析蛋白的基本物理化学参数分析及功能结构; SignalP 预测编码蛋白信号肽; TMHMM 查找预测蛋白跨膜区域; PredictProtein工具预测MrRab11编码蛋白的二级结构; SWISS-MODEL工具预测其三级结构; Blastx从数据库检索MrRab11同源序; MAGE6.0软件, NJ邻接法构建系统进化树。

1.5 MrRab11基因组织表达和免疫应答分析

根据罗氏沼虾 β -actin基因序列(登录号: AY626840.1) 设计荧光定量PCR内参引物Mr β -actinF、Mr β -actinR, 产物长度为193 bp。在所得罗氏沼虾*Rab11*基因序列的开放阅读框内设计引物MrRab11-qF和MrRab11-qR, 产物长度为197 bp。以正常罗氏沼虾肝胰腺、肌肉、鳃、心脏、肠道和胃组织的样品cDNA为模板, 检测*Rab11*基因在各个组织的表达情况; 以试验组和对照组在注射后不同时间点的组织样品分析MrRab11对阴沟肠杆菌的免疫应答。组织表达分析根据SYBR[®] Green qPCR预混液(Applied Biosystems)说明书, 在ABI7300荧光定量PCR仪上进行, 反应程序为: 95℃ 10min; 95℃ 15s, 60℃ 1min, 40 cycles; 绘制溶解曲线。试验设置3个生物学重复, 每个样品进行3个技术性重复, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法结合SPSS19.0对试验数据比较分析。

2 结果

2.1 MrRab11 cDNA序列分析

将3'RACE获得的*Rab11*片段和EST序列用SeqMan软件进行拼接后得到1381 bp的*Rab11*全长cDNA序列, 经BLAST和同源比对分析确认为罗氏沼虾*Rab11*基因。该序列包含226 bp的5'非编码区(Untranslated Region, UTR), 511 bp的3'非编码区和645 bp的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。在3'UTR, 有一个RNA不稳定模体(RNA instability motif)ATTTA结构, 但没有典型的polyA加尾信号AATAAA。

MrRab11编码214个氨基酸, DNASTAR软件预测蛋白分子量约为23.75 kD, 等电点约为5.34。BLASTX分析显示该序列与GenBank中已知的冈比亚按蚊(XP_001238828.3)、蚤状溞(EFX80521.1)、叶蝉(AAT01087.1) *Rab11*氨基酸序列一致性分别为82%、83%、82%。其二级结构组成为 α 螺旋36.45%, β 折叠17.29%, 无规卷曲46.26%。SMART软件分析显示, MrRab11有1个Rab结构域; SignalP软件分析表明其不存在信号肽序列; TMHMM软件分析显示MrRab11蛋白不存在跨膜区域; Swiss-Model软件预测MrRab11的三维结构, 与其他Rab蛋

白一样, MrRab11含有一个由6个 β 折叠和5个 α 螺旋构成的核心区域(图1)。



图1 罗氏沼虾*Rab11*预测蛋白三级结构

Fig. 1 Tertiary Structure of MrRab11

2.2 罗氏沼虾*Rab11*系统进化树构建

BLAST检索得到MrRab11同源序列: 叶蝉(*Homalodisca vitripennis*, AAT01087.1)、大西洋鲑(*Salmo salar*, ACI68958.1)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus furcatus*, ADO28360.1)、人(*Homo sapiens*, CA G46492.1)、蚤状溞(*Daphnia pulex*, EFX80521.1)、野牦牛(*Bos mutus*, ELR60022.1)、原鸽(*Columba livia*, EMC77353.1)、大鼠(*Rattus norvegicus*, NP_116006.1)、果蝇(*Drosophila melanogaster*, NP_477170.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_001002555.1)、鸡(*Gallus gallus*, NP_001005827.1)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*, XP_001238828.3)、小蜜蜂(*Apis florea*, XP_003692576.1)、绿头鸭(*Anas platyrhynchos*, XP_005015582.1)、扬子鳄(*Alligator sinensis*, XP_006032658.1)、绿海龟(*Chelonia mydas*, XP_007064684.1)、叶吻银鲛(*Callorhynchus milii*, XP_007906492.1)以及凡纳滨对虾部分序列(*Litopenaeus vannamei*, AER34937.1), 用MAGE6.0软件, 以NJ邻接法构建系统进化树(图2)。结果显示MrRab11与凡纳滨对虾*Rab11*在进化关系上最近, 并和蚤状溞*Rab11*聚为一支, 其余*Rab11*以哺乳类、鱼类、鸟类、昆虫类、爬行类为单位形成5个分支, 与传统的分类方法所得结果一致。

2.3 MrRab11组织分布

实时荧光定量PCR 检测了MrRab11在罗氏沼

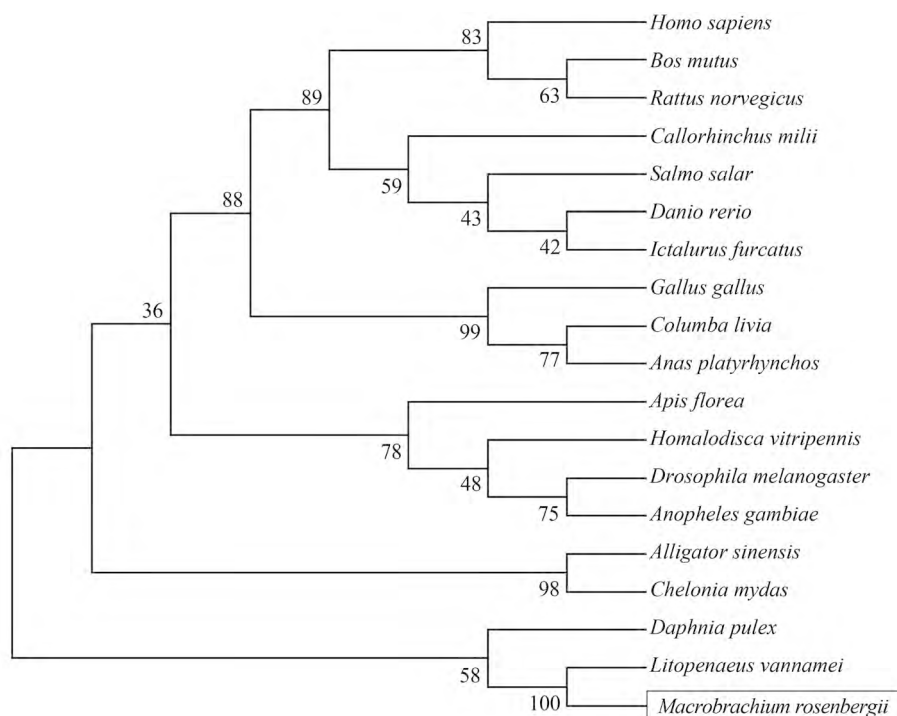


图2 Rab11系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Rab11

虾肝胰腺(Hepatopancreas)、肌肉(Muscle)、鳃(Gill)、心脏(Heart)、肠道(Intestine)、胃(Stomach)、血液(Hemocytes)等组织的表达水平,结果每个扩增曲线走势正常,熔解曲线显示单峰且峰值单一,说明引物的特异性较好,检测体系比较稳定,可靠性高。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算MrRab11的相对表达量,在检测的组织中都有表达,肝胰腺中表达量显著高于其他组织($P<0.05$),其次是肌肉、肠道,其他组织表达量较低,无显著差异(图3)。

2.4 MrRab11在不同组织对阴沟肠杆菌的应激表达

为了探究MrRab11在细菌感染后的应激表达,分别检测了其在罗氏沼虾感染阴沟肠杆菌后各组织不同时间点(0、0.5h、1.5h、3h、6h、12h、24h、48h和96h)的表达情况(图4)。与空白对照组相比0,罗氏沼虾注射阴沟肠杆菌后,0.5h时肝胰腺中Rab11的表达量显著上调($P<0.05$),但试验组和对照组没有显著差异;12h时再次升高,且试验组显著高于对照组($P<0.05$)。在肌肉中,0.5h时MrRab11表达量上调,3h时回到正常水平0h;24h时再次上升,试验组与对照组无显著差异。肠道中,注射0.5h后Rab11表达量显著上升($P<0.05$),试验组和对照组无显著差异,48h后回到正常水平。鳃、心脏、胃等组织表达量低,注射后无显著变化,且试验组与对照组也无显著差异。

3 讨论

本研究从罗氏沼虾基因组中成功克隆MrRab11基因,该基因序列和其他物种Rab11序列相似度在80%左右,具有较高的同源性。MrRab11含有Rab GTP酶家族所特有的5个氨基酸序列,该模板序列是鉴别Rab蛋白一种较为准确的方法^[24]。预测蛋白包含有1个Rab结构域和5个G结构域(G1-G5),Rab结构域是Rab蛋白家族共有的保守区,G结

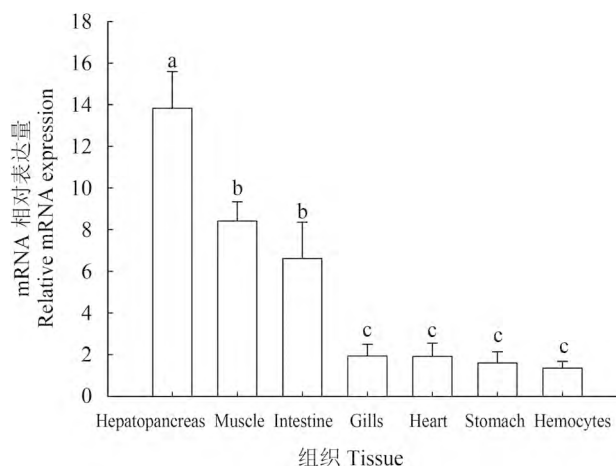
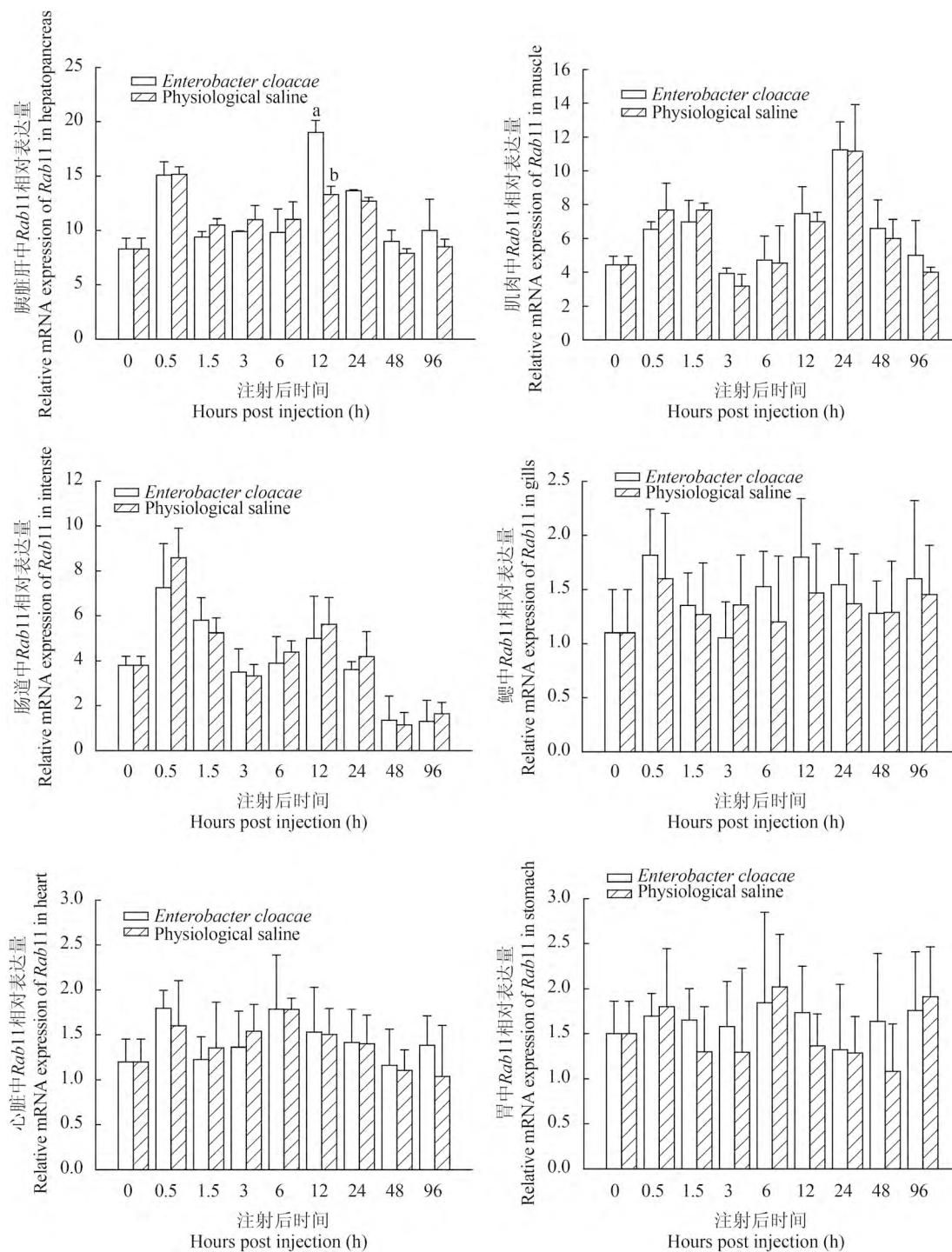


图3 MrRab11在不同组织的相对表达

Fig. 3 Relative expression levels of MrRab11 in different tissues
不同字母表示差异显著($P<0.05$);下同
Different letters indicates a significant difference ($P<0.05$); the same applies below

图4 阴沟肠杆菌感染后*Rab11*在各组织的表达情况Fig. 4 Relative expression of *Rab11* in different tissues after *Enterobacter cloacae* challenges

构域是GTP结合和水解区域,在整个Ras小分子GTP酶超家族成员中都具有保守性。这些都印证了同源Rab基因结构上高度保守^[25]。同其他Rab11一样,MrRab11上有两个分别称作开关I和开关II的区域,是Rab11与GDP、GTP结合的两种状态之间构像发生变化的位置,当Rab11和GTP结合时处于活化状态,可以识别其效应因子并执行各种功

能,GTP水解变为GDP后变为无活性状态,这在Rab11与其调节蛋白的相互作用、免疫防御等发挥关键作用^[26]。蛋白预测分析表明MrRab11不存在跨膜结构区域,推测这是因为Rab11是一种胞内GTP酶,在细胞膜内调节生命活动。

多数Rab蛋白没有组织特异性,但也有研究发现少数Rab蛋白仅在特定的组织表达,如家蚕

Rab7只在脑、卵巢、精巢表达^[27], Rab3A只在神经分泌细胞表达^[28], 组织特异性表达暗示这些Rab蛋白具有独特的作用。本研究对*MrRab11*在罗氏沼虾各组织表达分析表明: *MrRab11*在肝胰腺、肌肉、肠道等组织表达量相对较高, 在鳃、心脏、胃、血液等组织少量表达, 没有明显组织特异性。类似的, *Rab*基因在日本对虾血淋巴、肝胰腺、肌肉、鳃、心脏、肠道等组织都有广泛表达^[29]。肝胰腺是虾类体液免疫和细胞免疫的重要场所^[30, 31], 很多与免疫相关基因已经被证实在肝胰腺中有很高的表达量^[32]。肠道是消化吸收的器官, 会有各种包含病原体的微生物随着食物进入, 同时Rab蛋白参与吞噬体的形成及成熟过程^[33], 因此推测*MrRab11*在罗氏沼虾肝胰腺、肌肉和肠道的高表达量与其先天性免疫过程有关。

在研究免疫应答试验中, 注射器及其他因素对生物体刺激都可能显著影响基因的表达水平^[34], 为了避免这些刺激带来的影响, 本试验设置了对照组, 相同时间分别对试验组和对照组取样。荧光定量PCR检测了罗氏沼虾注射阴沟肠杆菌后*MrRab11*的表达情况, 结果发现与空白对照相比0.5h, 注射0.5—1.5h后, 在肝胰腺、肌肉、肠道中*Rab11*的表达量都有一个先上升后下降的趋势, 在肌肉中24h时又显著上升, 但试验组和对照组变化同步, 没有显著差异, 推测这是由于*MrRab11*对注射时的刺激及生理盐水的应激反应, 从而试验组和对照组变化没有差异。而在注射后12h时, 试验组肝胰腺中*MrRab11*的表达量上升, 显著高于对照组($P<0.05$), 推测这是*MrRab11*对细菌感染的应激表达, 因为肝胰腺是重要的免疫器官^[35], 对细菌等病原感染会有明显的免疫应答反应; 而其他组织对外来病原的免疫应答功能可能不如肝胰腺, 只对针头注射等生理刺激才会有应答反应, 因此, 本试验在注射阴沟肠杆菌后, 肌肉、鳃、心脏等组织中试验组和对照组*MrRab11*的表达量没有显著差异。试验结果与斑点叉尾鲷^[12, 13]、中华绒螯蟹^[14]、日本对虾^[15]等感染细菌后*Rab*基因的应激表达结果相似, 推测在本试验中*MrRab11*参与了罗氏沼虾对阴沟肠杆菌的免疫应答, 下一步可以利用基因敲除等手段来验证其功能, 并展开对*Rab*家族其他相关基因的研究, 弄清它们在罗氏沼虾免疫应答中的作用机制和地位。

本研究根据EST序列, 以RACE-PCR方法克隆获得罗氏沼虾*MrRab11*全长cDNA序列, 该序列含

有*Rab*家族特有的结构特征。以qRT-PCR方法分析了*MrRab11*的组织表达情况, 结果显示*MrRab11*在肝胰腺的表达量最高, 其次是肌肉和肠道。通过病原刺激的方法, 诱导*MrRab11*的免疫应答, 结果显示注射12h后, 试验组肝胰腺中*MrRab11*相对表达量显著上调, 推测*MrRab11*参与了罗氏沼虾感染阴沟肠杆菌后的免疫应答过程。对于主要依赖自身的先天非特异免疫机制进行免疫防御的虾蟹来讲, 这在今后病害防治、良种培育等方面都有重要参考价值。

参考文献:

- [1] Schwartz L, Canhong C, Olena P, *et al.* Alexey Rak and Angela Wandinger-Ness. Rab GTPases at a glance [J]. *Journal of Cell Science*, 2007, **120**(22): 3905—3910
- [2] Pereira-Leal J B, Seabra M C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **313**(4): 889—901
- [3] Schwartz S L, Cao C, Pylypenko O, *et al.* Rab GTPases at a glance [J]. *Journal of Cell Science*, 2007, **120**(22): 3905—3910
- [4] Welter B H, Temesvari L A. A unique Rab GTPase, EhRabA, of *Entamoeba histolytica*, localizes to the leading edge of motile cells [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2004, **135**(2): 185—195
- [5] Ali B R, Seabra M C. Targeting of Rab GTPases to cellular membranes [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005, **33**(4): 652—656
- [6] Pfeffer S. A model for Rab GTPase localization [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005, **33**(4): 627—630
- [7] Jordens I, Marsman M, Kuijl C, *et al.* Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion [J]. *Traffic*, 2005, **6**(12): 1070—1077
- [8] Hong M J, Lee Y M, Son Y S, *et al.* Rice Rab11 is required for JA-mediated defense signaling [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, **434**(4): 797—802
- [9] Li X, Valencia A, McClory H, *et al.* Deficient Rab11 activity underlies glucose hypometabolism in primary neurons of Huntington's disease mice [J]. *Biophysical Research Communications*, 2012, **421**(4): 727—730
- [10] Palmieri D, Bouadis A, Ronchetti R, *et al.* Rab11a differentially modulates epidermal growth factor-induced proliferation and motility in immortal breast cells [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2006, **100**(2): 127—137
- [11] Chia W J, Tang B L. Emerging roles for Rab family GTPases in human cancer [J]. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 2009, **1795**(2): 110—116
- [12] Sun F, Peatman E, Li C, *et al.* Transcriptomic signatures of attachment, NF- κ B suppression and IFN stimulation in the catfish gill following columnaris bacterial infection

- [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, **38**(1): 169—80
- [13] Liu S, Zhang Y, Zhou Z, *et al.* Efficient assembly and annotation of the transcriptome of catfish by RNA-Seq analysis of a doubled haploid homozygote [J]. *BioMed Central Genomics*, 2012, **13**: 595
- [14] Wang L, Li L, Wang L, *et al.* Two Rab GTPases, EsRab-1 and EsRab-3, involved in anti-bacterial response of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **35**(3): 1007—1015
- [15] Zong R, Wu W, Xu J, *et al.* Regulation of phagocytosis against bacterium by Rab GTPase in shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **25**(3): 258—263
- [16] Murray J L, Mavrikakis M, McDonald N J, *et al.* Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus [J]. *Journal of Virology*, 2005, **79**(18): 11742—11751
- [17] Krzewski K, Cullinane A R. Evidence for defective Rab GTPase-dependent cargo traffic in immune disorders [J]. *Experimental Cell Research*, 2013, **319**(15): 2360—2367
- [18] Ongvarrasopone C, Chanasakulniyom M, Sritunyalucksana K, *et al.* Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp [J]. *Marine Biotechnology*, 2008, **10**(4): 374—381
- [19] Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo C F, *et al.* Pm-Rab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp [J]. *Journal of Virology*, 2006, **80**(21): 10734—10742
- [20] Yang G L, Luo K, Kong J, *et al.* Correlation of growth and survivorship for *Macrobrachium rosenbergii* in different culture conditions [J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, **29**(3): 74—79 [杨国梁, 王军毅, 孔杰, 等. 罗氏沼虾大规模家系构建与培育技术研究. 海洋水产研究, 2008, **29**(3): 74—79]
- [21] Yang G L, Chen X F, Wang J Y, *et al.* Social and economical factors of sustained growth of *Macrobrachium rosenbergii* industry in mainland China [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2011, **30**(5): 450—457 [杨国梁, 陈雪峰, 王军毅, 等. 罗氏沼虾产业在中国持续增长的经济与社会原因分析. 2011, 浙江海洋学院学报(自然科学版), **30**(5): 450—457]
- [22] Qian D, Shi Z L, Zhang S Y, *et al.* Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, **26**(9): 521—527
- [23] Qian D, Shi Z L, Cao Z, *et al.* Isolation and characterization of Nodavirus caused whitish muscle diseases in *Macrobrachium rosenbergii* larvae [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, **10**(6): 457—461 [钱冬, 石正丽, 曹铮, 等. 罗氏沼虾苗种肌肉白浊病诺达病毒的分离和特性研究. 中国水产科学, 2003, **10**(6): 457—461]
- [24] Pereira-Leal J B, Seabra M C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, **301**(4): 1077—1087
- [25] Kelly E E, Horgan C P, Goud B, *et al.* The Rab family of proteins: 25 years on [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2012, **40**(6): 1337—1347
- [26] Pasqualato S, Senic-Matuglia F, Renault L, *et al.* The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(12): 11480—11488
- [27] Uno T, Hata K, Hiragaki S, *et al.* Small GTPases of the Rab family in the brain of *Bombyx mori* [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2010, **134**(6): 615—622
- [28] Stenmark H, Olkkonen V M. The Rab GTPase family [J]. *Genome Biology*, 2001, **2**(5): 1—7
- [29] Wu W L, Zhang X B. Characterization of a Rab GTPase up-regulated in the shrimp *Peneaus japonicus* by virus infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, **23**: 438—445
- [30] Lee S Y, Wang R, Soderhall K. A lipopolysaccharide and b-1,3-glucan binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization and cDNA cloning [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**: 1337—1343
- [31] Sritunyalucksana K, Wongsuebsantati K, Johansson M W, *et al.* Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Peneaus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, **25**: 353—363
- [32] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of haemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *Litopenaeus setiferus* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, **25**(7): 565—577
- [33] Rupper A, Cardelli J. Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2001, **1525**(3): 205—216
- [34] Chutima S, Siwaporn L, Saengchan S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a Toll receptor gene from *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, **36**(2): 552—562
- [35] Ji P F, Yao C L, Wang Z Y. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**(4): 563—570

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EXPRESSION RESEARCH OF *RAB11* FROM GIANT FRESHWATER PRAWN, *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

XIA Zheng-Long, HUANG Xue-Na, HUANG Zhen-Yuan, CHEN Xue-Feng, GAO Qiang, PU Jian-Wei,
SHEN Pei-Jing, PENG Fei and YANG Guo-Liang

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Animal Genetic Breeding of Zhejiang Province, National Genetic Breeding Center for
Macrobrachium rosenbergii, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: Rabs play important role in vesicular transport in all eukaryotic cells. The current study successfully cloned the full-length cDNA of a *Rab* gene of *Macrobrachium rosenbergii* (named *MrRab11*) by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The full-length of *MrRab11* cDNA was 1381 bp, including a 226 bp 5'-terminal untranslated region (UTR), a 511 bp 3'UTR and a 645 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 214 amino acids residues that contain a Rab domain. The calculated molecular mass of deduced *MrRab11* polypeptide was 23.75 kD and the isoelectric point was 5.34. BLASTX analysis revealed that *MrRab11* had significant homology to *Anopheles gambiae*, *Daphnia pulex* and *Homalodisca vitripennis* with the identity of 82%, 83% and 82%, respectively. Quantitative real-time reverse transcription PCR analysis demonstrated a broad expression of *MrRab11* in many tissues with the highest level in hepatopancreas and then muscle and intestine. The expression level of *MrRab11* in hepatopancreas was significantly ($P<0.05$) induced by *Enterobacter cloacae* at 12h. These results suggest that *MrRab11* may play a role in the innate immunity of *M. rosenbergii*.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; *Rab11*; Tissue expressions; Immunological response