

中国对虾 *Rab7* 全长 cDNA 的克隆及原核表达

卢金凤^{1,2} 梁高峰² 梁 艳² 黄 捷^{2*}

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 本研究采用 RACE 方法克隆了中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis Rab 7* 基因 (*fcrab7*) 全长 cDNA (GenBank: JF742050)。生物信息学分析显示, *fcrab7* 的开放阅读框 615bp, 编码 205 个氨基酸, 分子量 23.2kD。FcRab7 的氨基酸序列具有 Rab 蛋白家族的共同特征, 与凡纳滨对虾和斑节对虾同源蛋白的同源性为 100%。构建重组表达载体 pBAD/gIIIa-*fcrab7* 转化到大肠杆菌 *E. coli* 进行诱导表达, 诱导产物经 SDS-PAGE 检测和 Western blot 验证。本研究结果为进一步研究 WSSV 与 FcRab7 的相互作用提供了基础。

关键词 中国对虾 *fcrab7* 克隆 原核表达

中图分类号 S945.4+6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0066-08

cDNA cloning and prokaryotic expression of *Rab7* from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

LU Jin-feng^{1,2} LIANG Gao-feng² LIANG Yan² HUANG Jie^{2*}

(¹College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, 201306)

(²Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Rab proteins are the largest subfamily in small GTP-binding proteins, which play important roles in vesicle formation, transportation, adhesion, anchoring, and fusion. As a member of this family, Rab7 protein is in charge of the delivery of internalised materials into degradative compartments and the acquisition of lysosomal hydrolases. Evidence from the previous studies showed that VP28 of white spot syndrome virus (WSSV) can bind with Rab7 in *Penaeus monodon* (PmRab7). By rapid amplification of cDNA ends (RACE) method, the full-length gene of *Fenneropenaeus chinensis Rab7* gene (*fcrab7*) was obtained. The total cDNA consists of a 615bp open reading frame (ORF), which encoded 205 amino acids with a predicted molecular mass of 23.2 kDa. The deduced amino acid sequence contained many conserved motifs and regions, and the entire protein has 100% homology with Rab7 of *Litopenaeus vannamei* and *P. monodon*. The recombinant vector of pBAD/gIIIa-*fcrab7* was constructed and transformed into *E. coli*. The fusion protein was successfully expressed by induction, which was

tested by SDS-PAGE and Western blot analysis. These results laid a basis for further studies on interaction between WSSV and FcRab7.

KEY WORDS *Fenneropenaeus chinensis* *fcrab7* RACE prokaryotic expression

Rab 是小分子 GTP 结合蛋白家族 (Small GTP-binding proteins) 中最大的亚家族,它在动物细胞囊泡的形成、转运、黏附、锚定和融合等过程中发挥重要作用 (Guan *et al.* 2005)。Rab7 蛋白作为 Rab 家族一员,能够特异识别晚期胞内体等囊泡,介导晚期胞内体与溶酶体的膜融合以完成溶酶体转运。当病毒、胞内寄生菌病原体进入宿主细胞后会与 Rab7 结合,避开溶酶体的消化,导致宿主感染 (Smith *et al.* 2004; Cossart *et al.* 2004)。因此,Rab7 在病原体入侵宿主过程中起着重要的作用。白斑综合征病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV) 是一种引起对虾大规模死亡的主要病毒性病原,自 1993 年暴发以来给对虾的养殖业带来了巨大的损失 (黄 捷等 1995; 罗 展等 2007; 许 华等 2008)。在 WSSV 分子致病机制的研究中发现,斑节对虾 Rab7 (PmRab7) 能与 VP28 特异结合,体外抗体中和实验表明 PmRab7 及其抗体都可以降低 WSSV 的致死率 (Sritunyalucksana *et al.* 2006); RNA 干扰结果表明,注射 dsRNA-PmRab7 沉默基因 *pmrab7* 的表达能够抑制 WSSV 和黄头病毒 (Yellow Head Virus, YHV) 感染对虾,推测 PmRab7 可能是参与了病毒复制过程中的内吞运输 (Ongvarrasopone *et al.* 2008)。这对缺乏像脊椎动物免疫系统的适应性和记忆能力,没有真正的抗体和特异性的免疫细胞的甲壳动物来讲,Rab7 所起的作用不容忽视。为了进一步了解 Rab7 在 WSSV 对宿主的感染中的作用机制,本研究采用 RACE 技术成功克隆了中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* Rab7 基因 (*fcrab7*) 全长 cDNA,并实现了 FcRab7 蛋白的原核表达,为研究其是否定位于细胞表面及 WSSV 与中国对虾细胞相互作用的提供了基础条件。

1 材料与方法

1.1 实验动物

活的中国对虾于 2010 年 7 月购自青岛宝荣水产科技发展有限公司,体长 16 cm,经 PCR 检测不带 WSSV,实验室暂养 3d 后使用。

1.2 中国对虾 Rab7 基因 (*fcrab7*) 全长 cDNA 的克隆

1.2.1 中国对虾总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

取中国对虾鳃约 50~100 mg 置于 1ml TRIzol 试剂 (Invitrogen) 中,用研磨棒研磨匀浆,氯仿抽提,异丙醇沉淀,加适量无 RNase 水溶解总 RNA。以提取的总 RNA (浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 为模板,采用 Trans Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix (TransGen) 试剂盒,以 Oligo(dT) 为反转录引物,按试剂盒操作手册合成 cDNA 第一链。

1.2.2 同源克隆扩增 *fcrab7* cDNA 部分片段

根据凡纳滨对虾 *L. vannamei* Rab7 基因 (*lvrab7*) 序列 (GenBank 检索号: FJ811529.1) 设计特异引物 P-S、P-A,以中国对虾 cDNA 为模板进行同源克隆,获取 *fcrab7* cDNA 的部分片段。25 μl 反应体系中含 2.5 μl $10\times$ Buffer, 5 nmol dNTP, 引物 P-S 和 P-A 各 25 pmol, 1U rTaq 酶 (TaKaRa), 500 ng cDNA 模板,于 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 40s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 40s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s 进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。将扩增产物经胶回收后送到上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

根据同源克隆获取的 cDNA 片段序列设计特异性引物,分别用于 RACE 实验,引物序列见表 1。

1.2.3 *fcrab7* 的 5'-RACE

fcrab7 的 5'-RACE 扩增使用了商品试剂盒 (SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit),以提取的总 RNA (浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 为模板,按其使用手册方法合成 5'-RACE-Ready cDNA。以基因特异性引物 GSP1 和 UPM (试剂盒提供) 为引物,5'-RACE-Ready cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物经 TA 克隆后送上海生

工生物工程有限公司测序,获取 *fcrab7* 基因的 5'末端。

1.2.4 *fcrab7* 的 3'-RACE

fcrab7 的 3'-RACE 扩增使用了商品试剂盒 (SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit),以提取的总 RNA(浓度为 1 μg/μl)为模板,并按其使用手册说明合成 3'-RACE-Ready cDNA。以基因特异性引物 GSP2 和 UPM(试剂盒提供)为引物,3'-RACE-Ready

cDNA 为模板,进行第一轮 PCR 反应;再以此扩增产物为模板,采用基因特异性引物 NGSP2 和 NUP(试剂盒提供)为引物进行套式 PCR,扩增产物经 TA 克隆后并测序,以获得 *fcrab7* 基因 3'端。

1.2.5 全长 *fcrab7* cDNA 序列拼接

将 5'-RACE 和 3'-RACE 获得的序列使用 Accelrys Gene 软件找出使用的引物序列,去除载体序列,去掉重叠区段,拼接获得 *fcrab7* 基因全长 cDNA 序列。

1.3 *fcrab7* 及其编码的氨基酸序列的生物信息学分析

利用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和在线 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de>)分析全长 *fcrab7* cDNA 序列及其编码的氨基酸序列,利用 MEGA 4.02 软件建立相关进化树。

1.4 中国对虾 *Rab7* (*fcrab7*) 的表达及纯化

1.4.1 PCR 扩增 *fcrab7* 基因

根据 *fcrab7* ORF 全长设计扩增 *fcrab7* 基因的特异引物。上游引物:5'-AA C CAT GGA AAT GGC ATC TCG CAA G-3' (划线处为 *Nco* I 酶切位点),下游引物:5'-CC T CTA GAC CGC AAG AGC ACG CAT C-3' (划线处为 *Xba* I 酶切位点),以中国对虾 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因 *fcrab7*。25 μl 反应体系中含 2.5 μl 10× Buffer,5 nmol dNTP,上游引物和下游引物各 25 pmol,1U *rTaq* 酶(TaKaRa),500 ng cDNA 模板,PCR 反应程序为:94 °C 5min;94 °C 40 s,50.9 °C 40 s,72 °C 30 s (10 个循环);94 °C 40 s,56.7 °C 40 s,72 °C 30 s (25 个循环);72 °C 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖胶电泳分析鉴定后用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化。

1.4.2 表达载体 pBAD/gIII A-*fcrab7* 的构建

用 *Nco* I 和 *Xba* I 分别对胶回收产物 *fcrab7* 基因片段和质粒 pBAD/gIII A 进行双酶切,凝胶回收目的条带。然后将胶回收的酶切片段经 T₄ DNA Ligase 在 16 °C 下连接 20 min 后转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞 (TransGen) 中。利用菌落 PCR 和酶切法筛选重组质粒 pBAD/gIII A-*fcrab7*,并提取重组质粒,对该重组质粒进行测序鉴定。

1.4.3 FcRab7 重组蛋白的诱导表达

挑取测序正确的单克隆接种到含 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养 8~10 h,按 1% 的比例将培养物接种到 LB 液体培养基中,37 °C 培养到 OD₆₀₀ 值为 0.6 时,加 L-阿拉伯糖至终浓度为 0.4 mmol/L,在 37 °C 诱导 6 h,离心收集菌体。悬浮于裂解 Buffer(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1 mmol/L EDTA,pH 8.0,10 mmol/L CaCl₂)中,冰浴超声波(80~100W)破碎 15 min 以裂解细胞,离心分别收集上清液和沉淀。

1.5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

对诱导表达的包涵体上清液和沉淀进行 SDS-PAGE,按 Laemmli(1970)的方法进行。Western-blot 分析是将 SDS-PAGE 结束后凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,用 1% BSA (溶解于 PBS,含 137 mmol/L NaCl,

表 1 实验中用到的引物及其序列

Table 1 Primers used in this study

编号 Primer	序列 Sequence(5'—3')
P-S	ATT GAA TTC ATG GCA TCT CGC AAG A
P-A	CTC CTC GAG GCA AGA GCA TGC ATC
GSP1	ATC AGG GTC CCT TGG TGA GGC TTG
GSP2	CAA GGC AAC CAT TGG GGC AGA TTT C
NGSP2	CAT CTC CCA ACA CCT TCA AGT CTC TCG

2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH_2PO_4 , 8 mmol/L Na_2HPO_4 , pH 7.5) 在 4 °C 下封闭过夜, 加入抗体 Anti-His-HRP (1 : 10 000) (Clontech), 在 37 °C 下孵育 2 h, PBST (PBS 含 0.05% 吐温) 漂洗 3 次, 每次 5 min, 然后用 DAB 显色。

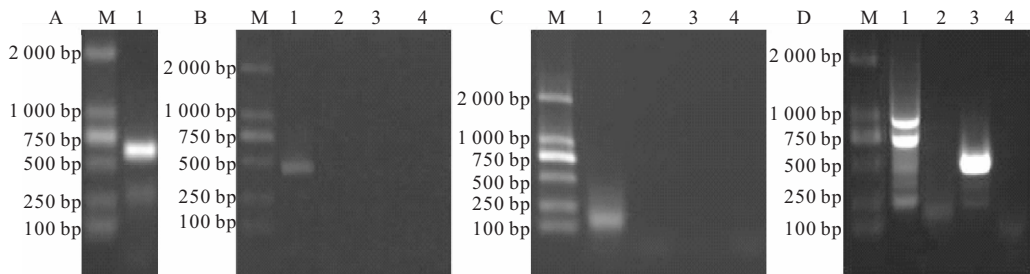
1.6 表达的 FcRab7 蛋白的纯化

将上述收集的经超声破碎的工程菌的沉淀重悬于 A 液 (6 mol/L 盐酸胍, 50 mmol/L 磷酸盐, 300 mmol/L NaCl, pH 7.4), 经 0.45 μm 滤膜过滤, 并用钴离子亲和层析柱 (Clontech) 纯化。上样流速 1 ml/min, 用 50~500 mmol/L 的咪唑缓冲液 (50~500 mmol/L 咪唑, 5.4 mol/L 盐酸胍, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH_2PO_4 , 8 mmol/L Na_2HPO_4 , pH 7.4) 进行梯度洗脱, 洗脱流速 1 ml/min, 收集 150 mmol/L 的咪唑缓冲液的洗脱峰。将洗脱的 FcRab7 蛋白装入到透析袋中, 置于复性缓冲液 (50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10% 甘油, 4 mol/L 盐酸胍, 1% 甘氨酸) 中, 于 4 °C 透析, 每 24 h 更换盐酸胍浓度逐级降低 (4 mol/L-2 mol/L-1 mol/L-0) 的复性缓冲液, 使蛋白复性。将复性后的蛋白用 10kDa 的超滤管 (Millipore) 超滤浓缩, 然后用 SDS-PAGE 检测目的蛋白 FcRab7 的纯化结果。

2 结果与分析

2.1 *fcrab7* 基因全长的 RACE 扩增

经同源克隆得到大小约为 600 bp 的 PCR 产物 (图 1-A), 经 TA 克隆后测序, 该扩增片段大小为 615bp。根据同源克隆已知的 615bp *fcrab7* 部分序列, 设计序列特异性引物 GSP1 进行 5'-RACE, 扩增出约 500bp 的特异条带 (图 1-B), 经 TA 克隆并测序, 获得 491bp 核苷酸序列。经序列比对分析, 确认此克隆片段为 *fcrab7* 基因的 5'-端。同时, 根据已知的 615 bp *fcrab7* 部分序列, 设计序列特异性引物 GSP2 和 NGSP2 进行 3'-RACE。用 GSP2 引物进行第一次扩增, 没有得到明显的特异条带 (图 1-C)。再以 10 倍稀释度的第一次扩增



A. 中国对虾 *Rab7* 基因的同源克隆结果的凝胶电泳图, M:DL2000 DNA marker, 1:PCR 产物;

B. 5'-RACE 扩增结果的凝胶电泳图, M:DL2000 DNA marker; 1:目的片段的扩增; 2:只加试剂盒引物 UPM; 3:只加特异引物 GSP1; 4:空白对照(无模板);

C. 3'-RACE 第一次扩增结果的凝胶电泳图, M:DL2000 DNA marker; 1:目的片段的扩增; 2:只加试剂盒引物 UPM; 3:只加特异引物 GSP2; 4:空白对照(无模板);

D. 3'-RACE 第二次扩增结果的凝胶电泳图, M:DL2000 DNA marker; 1:目的片段的扩增; 2:只加试剂盒引物 NUP; 3:只加特异引物 NGSP2; 4:空白对照(无模板)

A. PCR amplification of *Rab7* gene from *F. chinensis*, M. DL2000 DNA marker; 1. PCR production;

B. PCR amplification results of 5'-RACE, M. DL2000 DNA marker; 1. Amplification of target gene; 2. Only primer UPM; 3. Only primer GSP1; 4. Blank control (without template).

C. First round PCR amplification results of 3'-RACE, M. DL2000 DNA marker; 1. Amplification of target gene; 2. Only primer UPM; 3. Only primer GSP2; 4. Blank control (without template).

D. Second round PCR amplification results of 3'-RACE, M. DL2000 DNA marker; 1. Amplification of target gene; 2. Only primer NUP; 3. Only primer NGSP2; 4. Blank control (without template)

图 1 中国对虾 *Rab7* 基因 (*fcrab7*) 全长的分段扩增

Fig. 1 RACE amplification of *F. chinensis Rab7* gene

产物为模板,用 NGSP2 引物进行套式 PCR,扩增出约 750 和 1 000 bp 的两条条带(图 1-D),将凝胶回收产物进行 TA 克隆并测序,分别得到 741 和 1 047bp 核苷酸序列。经 DNA 序列比对分析,确认 1 047bp 核苷酸序列为 *fcrab7* 基因的完整 3'-端。

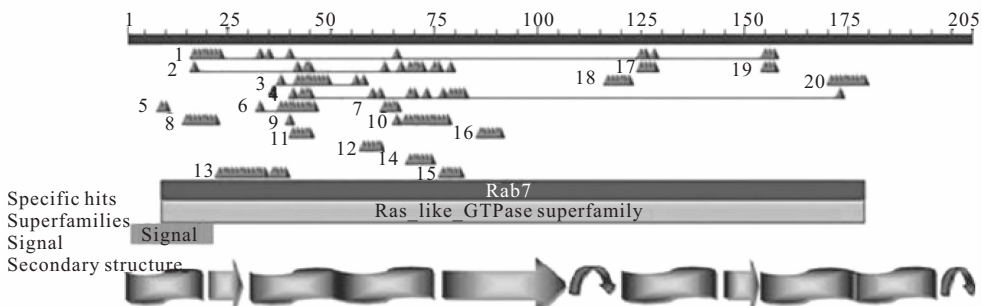
2.2 *fcrab7* 基因序列特征

根据 5'-RACE 和 3'-RACE 的结果拼接得到中国对虾 *fcrab7* 基因全长序列,并提交到 GenBank 数据库 (Accession Number: JF742050)。生物信息学分析显示,该 cDNA 全长共 1 369bp,含有 1 个 615bp 开放阅读框,编码 205aa,估算分子量为 23.2kDa。该序列包含 5'-UTR (非编码区) 98bp,3'-UTR (非编码区) 657bp,并含有 1 个决定选择基因转录起始位点的 TATA 框和 1 个 PolyA 尾。

2.3 *FcRab7* 蛋白结构特征分析

根据 NCBI 在线分析软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对中国对虾 *Rab7* 基因拟编码的蛋白序列进行分析,显示该基因具有 Rab 蛋白家族成员与 GTP/GDP 和 Mg^{2+} 发生相互作用的保守位点,也有 Rab 蛋白家族成员的 5 个保守的共有序列元件(G1、G2、G3、G4 和 G5),还存在 GDP 解离抑制因子(GDP dissociation inhibitor, GDI)作用位点、鸟嘌呤核苷酸交换因子(Guanine nucleotide exchange factors, GEF)作用位点、开关 I (Switch I) 和开关 II (Switch II) 区域以及 Rab 家族的 5 个结构域(RabF)和 Rab 亚家族的 4 个结构域(RabSF) (图 2)。

通过在线 SMART 的信号肽域分析表明 1~22aa 范围包含一个信号肽,二级结构分析表明,多数区域具有 α -螺旋趋势,而少数区域为 β -片层,其中有少量 β -转角位点(图 2)。对其进行蛋白修饰域分析表明,氨基酸序列中 68~79 (ERFQSLGVA) 和 131~139 (NRAVSTKRA) 为蛋白激酶 G (PKG) 位点,132~140 (RAVSTKRAQ) 为蛋白激酶 C (PKC) 位点。



蛋白序列的 1~22aa 包含一个信号肽序列;波浪块代表 α -螺旋;横向箭头代表 β -片层;弯箭头代表 β -转角

A signal domain was found among 1~22aa, α -helices were indicated by the wave blocks, β -sheets were indicated by the right arrows, and the β -turns were indicated by the bent arrows

1: GTP/ Mg^{2+} binding site; 2: GDI interaction site; 3: Putative GEF interaction site; 4: Putative effector interaction site; 5: Rab subfamily motif 1 (RabSF1); 6: Switch I region; 7: G3 box; 8: G1 box; 9: G2 box; 10: Switch II region; 11: Rab family motif 1 (RabF1); 12: Rab family motif 2 (RabF2); 13: Rab subfamily motif 2 (RabSF2); 14: Rab family motif 3 (RabF3); 15: Rab family motif 4 (RabF4); 16: Rab family motif 5 (RabF5); 17: G4 box; 18: G5 box; 19: Rab subfamily motif 3 (RabSF3); 20: Rab subfamily motif 4 (RabSF4)

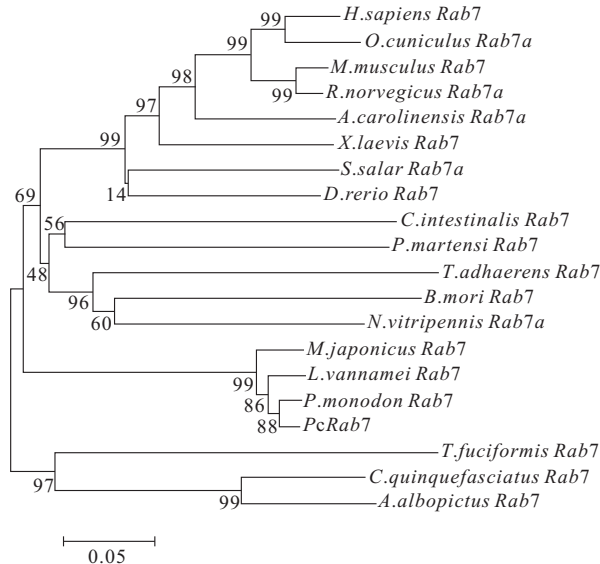
图 2 *FcRab7* 功能区、保守区分析及二级结构预测

Fig. 2 Conserved regions, motif location analysis and secondary structure prediction of *FcRab7*

2.4 中国对虾 *Rab7* 基因及其同源基因的分子系统学分析

利用 MEGA 4.02 软件对中国对虾 *Rab7* 基因与其他物种同源物的序列进行了分子系统学分析,在构建了

系统发生树的基础上研究了中国对虾 *Rab7* 基因和其他物种 *Rab7* 同源基因之间的进化关系(图 3)。中国对虾 *Rab7* 基因序列与斑节对虾 *Rab7* 基因(DQ231062.1)、凡纳滨对虾 *Rab7* 基因(FJ811529.1)、日本囊对虾 *Rab7* 基因(AB379643.1)的相似度分别为 97%、96%和 95%;中国对虾 *Rab7* 基因聚类分析结果表明,对虾 *Rab7* 基因与其他物种的同源基因分别属于不同的类群,与脊椎动物和原生动物的距离也与物种的进化关系基本一致,表明该基因在生物进化过程中承受了一定的选择压力,在各种动物中发挥了重要的作用。与此同时,这些也显示了 *Rab7* 基因在种内进化上的保守性。



Aedes albopictus Rab7 (EF127648.1), *Anolis carolinensis Rab7a* (XM_003217723.1), *Bombyx mori Rab7* (NM_001046903.1), *Ciona intestinalis Rab7* (XM_002128717.1), *Culex quinquefasciatus Rab7* (XM_001850576.1), *Danio rerio Rab7* (NM_200928.1), *Homo sapiens Rab7* (AF050175.1), *Litopenaeus vannamei Rab7* (FJ811529.1), *Marsupenaeus japonicus Rab7* (AB379643.1), *Mus musculus Rab7* (X89650.1), *Nasonia vitripennis Rab7a* (XM_001607867.2), *Oryctolagus cuniculus Rab7a* (NM_001082034.1), *Penaeus monodon Rab7* (DQ231062.1), *Pinctada martensi Rab7* (FJ809935.1), *Rattus norvegicus Rab7a* (NM_023950.3), *Salmo salar Rab7a* (BT059736.1), *Trichoplax adhaerens Rab7* (XM_002108901.1), *Tremella fuciformis Rab7* (GU723634.1), *Xenopus laevis Rab7* (BC077884.1)

图 3 中国对虾 *Rab7* 基因与其他物种同源基因的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of nucleotide sequences among *F. chinensis Rab7* gene and its homologous gene from different species

2.5 不同种类 Rab7 蛋白保守性分析

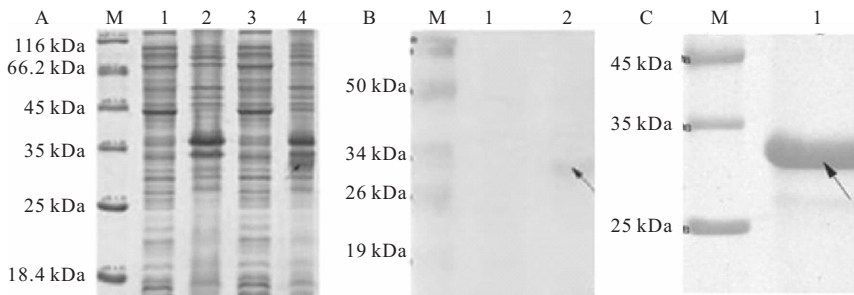
蛋白序列保守性分析表明,该中国对虾 *Rab7* 与家蚕、海葵、斑马鱼、非洲爪蟾、小家鼠、欧洲兔以及人的 *Rab7* 氨基酸序列相似性在 80%以上,其中 N 端高度保守,而 C 端序列的变异较大;与斑节对虾和凡纳滨对虾 *Rab7* 氨基酸序列相似性高达 100%,与日本囊对虾 *Rab7* 氨基酸序列相似性为 99%。中国对虾、斑节对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾的 *Rab7* C 端均具有 CSC 的结构域。

2.6 中国对虾 Rab7 重组表达载体的构建及原核表达产物分析

以中国对虾 cDNA 为模板,进行 *Rab7* 基因的特异扩增,得到长度约为 635bp 的片段。将该片段与 pBAD/gIII A 质粒连接,构建重组表达载体 pBAD/gIII A-*fcra7*,转化 *E. coli*。选取测序正确的 pBAD/gIII A-*fcra7* 重组质粒,经 L-阿拉伯糖 37°C 诱导,SDS-PAGE 显示在包涵体沉淀中含有约 28kDa 与 FcRab7 预期分子量相符的条带,而诱导后的空载体中在 28kDa 处无此条带(图 4-A),初步说明 FcRab7 蛋白表达成功。为了进一步验证 FcRab7 蛋白的表达,用 6×His 表达序列标签抗体进行 Western blot 分析,表明在包涵体内成功

得到了 FcRab7 的重组蛋白(图 4-B)。

经钴离子层析纯化,透析复性,并用 10kDa 的超滤管(Millipore)浓缩 FcRab7 蛋白,经 SDS-PAGE,可见在约 28kDa 的位置出现了一条很浓的蛋白条带(图 4-C),此带就是 FcRab7 蛋白。



A. SDS-PAGE 图谱。M. Marker;1. 空载体裂解上清;2. 空载体裂解沉淀;3. 重组体裂解上清;4. 重组体裂解沉淀;

B. Western-blot 分析结果;M. Marker;1. 空载体裂解沉淀;2. 重组体裂解沉淀;

C. SDS-PAGE 分析纯化重组 FcRab7 蛋白;M. Marker;1. 纯化的重组 FcRab7 蛋白

A. SDS-PAGE analysis. M. Protein marker; 1. pBAD/gIII A supernatant; 2. pBAD/gIII A sediment; 3. pBAD/gIII A-*fcra7* inclusion body supernatant; 4. pBAD/gIII A-*fcra7* inclusion body sediment;

B. Western-blot analysis. M. Protein marker; 1. pBAD/gIII A sediment; 2. pBAD/gIII A-*fcra7* inclusion body sediment;

C. SDS-PAGE of purified recombinant FcRab7. M. Protein marker; 1. Purified recombinant FcRab7

图 4 中国对虾 *Rab7* 基因的原核表达产物分析

Fig. 4 The prokaryotic expression product analysis of *Rab7* gene from *F. chinensis*

3 讨论

本研究从中国对虾鳃组织中克隆到了 *Rab7* 基因 cDNA 全长,将其命名为 FcRab7。通过 NCBI 数据库分析氨基酸显示,*fcra7* 基因拟编码的蛋白具有 Rab 基因家族的全部保守结构域和作用位点以及 Rab 蛋白亚家族的(Rab subfamilies, RabSF)保守序列,如:GTP/GDP 和 Mg^{2+} 发生相互作用的位点、5 个保守的共有序列元件、GDI 作用位点、GEF 作用位点和开关 I (Switch I) 与开关 II (Switch II) (Quevillon *et al.* 2003; Stroupe *et al.* 2000; Ostermeier *et al.* 1999; Neu *et al.* 1997)。根据现有研究报道,FcRab7 其中 C 末端的 3 个氨基酸为 CSC,属于 CXC 类型,其 C 末端的两个半胱氨酸可以进行异戊二烯化修饰,推测该蛋白 FcRab7 可能具有很强的疏水性和膜亲和性,并具有稳定亚细胞结构、胞内运输以及信号转导等功能(吴文林等 2006;Pereira-Leal *et al.* 2001;Cremers *et al.* 1994;Wettschueck *et al.* 2002)。

对 FcRab7 蛋白序列分析表明在其 N-端,信号肽是蛋白前体 N-端的一段氨基酸序列,具有引导蛋白质跨膜、分泌及在细胞中正确定位的功能(Williams *et al.* 2002)。经蛋白序列保守性分析表明,FcRab7 与其他物种的 *Rab7* 的氨基酸序列相似性很高,其中 N 端高度保守,并含有一段 22 个氨基酸的信号肽,而 C 端序列的变异较大;高度保守的 N 端被认为可能参与指导 C 端半胱氨酸进行异戊二烯化修饰(吴文林等 2006);与目前已有报道的斑节对虾 *Rab7* (PmRab7)、凡纳滨对虾 *Rab7* (LvRab7) 的氨基酸序列一致,与日本囊对虾 *Rab7* (PjRab7) 氨基酸也极为相似(99%)。有研究表明,PmRab7 蛋白与 WSSV 囊膜蛋白 VP28 可以特异性结合,但该蛋白是否分布在细胞膜上以受体身份参与 WSSV 感染,还是分布在细胞内以结合因子身份参与感染目前尚未知。既然 FcRab7 的氨基酸与 PmRab7、LvRab7 以及 PjRab7 的氨基酸具有高度相似性,那么作者可以用 FcRab7 代替其他对虾中 *Rab7* 来研究 *Rab7* 蛋白是否分布在对虾血淋巴细胞膜上还是细胞内提供了便利,大大减少了工作量,提高了工作效率。

有研究发现,在抗病毒日本囊对虾中 Rab 的表达有所上升,原因可能就是 Rab 蛋白参与了对虾的免疫过程(Pan *et al.* 2005),这可能与 *Rab7* 是一个活跃的 GTP 酶有关。GTP 酶具有 GDP/GTP 结合功能,即通

过 Rab7-GDP 和 Rab7-GTP 两种形式的转换以及 Rab7 在胞质和膜之间的转位,完成 Rab7 对囊泡运输的调控(申晨等 2008),对免疫防御具有重要作用。这对于没有真正的抗体和特异性的免疫细胞,主要依赖自身的先天非特异免疫机制进行免疫防御的对虾来讲,囊泡运输是细胞内物质运输的重要方式。因此研究对虾体内的 Rab7 蛋白,在对虾免疫防御反应中有重要意义。FcRab7 序列分析显示 FcRab7 是一个活跃的 GTP 酶,通过构建重组表达载体 pBAD/gIII A-fcrab7 转化到大肠杆菌 *E. coli*,用 L-阿拉伯糖在 37°C 诱导重组基因工程菌,利用亲和层析的方法获得了纯化的 FcRab7,这为研究 FcRab7 在中国对虾免疫防御中的作用以及了解 WSSV 对宿主的感染机制提供了基础。

参 考 文 献

- 罗展,黄捷,周丽. 2007. 抗白斑综合征病毒(WSSV)感染途径研究进展. 海洋水产研究, 28(5): 116~123
- 黄捷,蔡生力,宋晓玲,王崇明,于佳,杨丛海. 1995. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究. 海洋水产研究, 16(1): 51~58
- 申晨,贾平一, Zhong, N. 2008. 人类 Rab7 的结构与功能. 国际遗传学杂志, 31(6): 426~431
- 吴文林, 吴穗洁. 2006. Rab 蛋白的结构、功能与研究展望. 台湾海峡, 25(4): 599~605
- 许华,黄捷,杨官品. 2008. 对虾白斑综合征病毒蛋白质组的研究进展. 海洋水产研究, 29(2): 118~126
- Cossartl, P., and Sansonetti, P. J. 2004. Pathogens bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive. *Science*, 304: 242~247
- Cremers, F. P., Armstrong, S. A., Seabra, M. C., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. 1994. REP22, a Rab escort protein encoded by the choroideremia-like gene. *J. Biol. Chem.* 269(3): 2 111~2 117
- Guan, R., and Cui, Y. 2005. Rab family and their function in vesicle transportation. *Section Genet Foreign Med. Sci.* 28: 91~93
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(7): 680~685
- Neu, M., Brachvogel, V., Oschkinat, H., Zerial, M., and Metcalf, P. 1997. Rab7: NMR and kinetics analysis of intact and C terminal truncated constructs. *Proteins*, 27(2): 204~209
- Ongvarrasopone, C., Chanasakulniyom, M., Sritunyalucksana, K. *et al.* 2008. Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp. *Mar. Biotechnol.* 10: 374~381
- Quevillon, E., Spielmann, T., and Brahimi, K. 2003. The Plasmodium falciparum family of Rab GTPases. *Gene*, 306: 13~25
- Ostermeier, C., and Brunger, A. T. 1999. Structural basis of Rab effect or specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96(3): 363~374
- Pan, D., He, N., Yang, Z., Liu, H., and Xu, X. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 103~112
- Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313(4): 889~901
- Smith, A. E., and Helenius, A. 2004. How viruses enter animal cells. *Science*, 304: 237~242
- Sritunyalucksana, K., Wannapho, W., Lo, C. F. *et al.* 2006. Pmpab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Virology*, 347(2): 10 734~10 742
- Stroupe, C., and Brunger, A. T. 2000. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* 304 (4): 585~598
- Wettschueck, N., and Offermanns, S. 2002. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J. Mol. Med.* 80: 629~638
- Williams, E. J., Pal, C., and Hurst, L. D. 2002. The molecular evolution of signal peptides. *Gene*, 253(2): 313~322