

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14448

草鱼天然抗性相关巨噬蛋白基因的表达特征与蛋白表达

杨康, 王艺雅, 刘铁柱, 李同明, 季相山, 王慧

山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018

摘要: 为探讨 *Nramp* 基因在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)免疫应答中的作用, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 对比研究了 *Nramp* 基因在草鱼不同发育阶段、不同组织及嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)攻毒感染后 4 个组织不同时间的差异表达, 并利用原核表达技术对草鱼 *Nramp* 基因 ORF 区 642 bp 的目的片段进行蛋白表达, 获得 40 kD 的融合蛋白。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *Nramp* 在草鱼胚胎发育过程中的表达量随着发育时间的增加而逐渐增强, 在幼鱼期的表达量达到最大。成年健康草鱼不同组织中的表达量差异显著($P<0.05$), 在肝中的表达量最高, 其次是在脾、头肾、肠中的表达量较高, 而在眼和鳃中的表达量最低。草鱼感染嗜水气单胞菌后, 在头肾、肝、脾、肠中 *Nramp* 的表达量都显著上升($P<0.05$), 在头肾中感染 12 h 后显著上升, 48 h 达到最大, 在 72 h 和 96 h 时又显著下调, 在 7 d 时表达量继续下调而逐渐回归到初始水平; 在肝中 *Nramp* 基因的表达量在 4 h 时出现下调, 在 12 h 又显著上调, 随后在 24 h 出现下调, 在 48 h 又上调, 72 h 达到最大并保持较高水平到 7 d; 在肠中 mRNA 表达量在 12 h 显著上调, 48 h 达到最大, 在 72 h 和 96 h 显著下调, 在 7 d 时表达量基本回归到初始水平; 在脾中 mRNA 表达量在 4 h 开始上升, 12 h 达到最大, 在 24 h 和 48 h 表达水平显著下调, 在 7 d 时表达量回归到初始水平。草鱼感染致病菌可引起免疫相关组织中 *Nramp* 的表达量上升, 说明 *Nramp* 在硬骨鱼类的天然免疫反应过程中发挥着重要作用。

关键词: 草鱼; *Nramp* 基因; 表达分析; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: S942

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0908-08

天然抗性相关巨噬蛋白基因家族成员最初发现于小鼠中, Belouchi 等^[1]随后将该类基因命名为 *Nramp* 基因家族。目前在哺乳动物中已发现两种天然抗性巨噬蛋白 *Nramp1* 和 *Nramp2*^[2-5]。*Nramp1* 主要在吞噬细胞、肝、脾以及肺中特异性表达^[6-7], 这与其抗病功能相适应, 而 *Nramp2* 则在大多数组织和细胞中表达^[8]。除虹鳟(*Nramp α* 和 *Nramp β*) 外, 鱼类中发现的 *Nramp* 蛋白只有一种^[9], 其与哺乳类 *Nramp2* 的同源性要高于与 *Nramp1* 的同源性, 在组织中的表达水平也与哺乳类 *Nramp2* 相似, 但功能与 *Nramp1* 相似。*Nramp1* 能增强吞噬

细胞的吞噬能力从而杀死胞内病原菌, 而 *Nramp2* 的主要作用是对二价铁离子的吸收转运和重新利用^[10-11]。在人或小鼠中发现 *Nramp1* 与一些病原微生物的易感性和抗性有关, 小鼠中 *Nramp1* 在抗病原菌侵染的早期阶段起主要作用^[12], 如对牛分支杆菌、沙门氏伤寒菌、利氏曼菌等的感染起控制作用^[13], 通过敲除小鼠 *Nramp1* 基因和重组证实了其功能^[14]。迄今, 对 *Nramp1* 的研究多集中于小鼠、鸡、猪、牛上, 而 *Nramp* 在硬骨鱼类免疫系统中的研究很少。

草鱼是我国最重要的淡水养殖鱼类之一, 但

收稿日期: 2014-11-01; 修订日期: 2014-12-29.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B00); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013NY002); 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-15-011).

作者简介: 杨康(1988-), 硕士, 从事动物遗传育种研究. E-mail: yk881004@163.com

王艺雅(1990-), 并列第一作者, 硕士, 从事动物遗传育种研究.

通信作者: 王慧, 教授, 博导, 从事动物遗传育种与健康养殖研究. E-mail: wanghui2328@sda.edu.cn

是随着养殖密度及规模的扩大, 各种病害问题日益突出。鉴于 *Nramp* 的重要功能, 本研究旨在揭示 *Nramp* 在鱼体先天性防御系统中的作用, 及其发挥作用的诱导机制, 为草鱼的健康养殖与鱼病防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

六月龄草鱼 240 尾, 体重(150g±20) g, 在水温(24±2)℃水族箱中暂养 2 周后用于人工攻毒试验; 2.5 龄草鱼 20 尾, 体重(1500±200) g。不同发育期受精卵分别由泰安市岱岳区温泉水产养殖试验场和水产研究所提供。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为南京农业大学提供。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

采集新鲜草鱼的脑、肝、心脏、鳃、鳃、肌肉、鳍、眼、血、肠、脾、性腺、头肾组织和不同发育时期受精卵, 提取总 RNA。分别以电泳法和紫外分光光度计测定其浓度和纯度。参照 TaKaRa PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书反转录合成 cDNA 第一链, -20℃保存。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

根据 GenBank 中草鱼 *Nramp*(GU290344)和 β -actin(M25016)的 cDNA 序列, 分别设计荧光定量引物(*Nramp*-qRT-F 和 *Nramp*-qRT-R)、原核表达引物(*Nramp*-F 和 *Nramp*-R)和内参引物(β -actin-F 和 β -actin-R)序列见表 1。

以合成的 cDNA 为模板扩增 *Nramp* 基因, 目的片段大小为 642 bp, 反应体系: PrimeSTAR® HS

DNA Polymerase 0.25 μ L, 5×PrimeSTAR® Buffer 5 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, cDNA 0.25 μ L, 引物各 0.5 μ L, H₂O 16.5 μ L。反应条件: 94℃ 10 min, 98℃ 10 s, 56℃ 15 s, 72℃ 40 s; 30 个循环, 72℃ 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用 Omega 试剂盒回收目的片段。荧光定量和内参 β -actin 的扩增产物大小分别为 132 bp 和 220 bp。PCR 反应条件均为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

1.4 实时荧光定量检测目的基因的表达量

以荧光定量 PCR 技术, 检测了 *Nramp* 基因在不同胚胎期和幼鱼期以及在 2 龄半草鱼不同组织中的表达差异; 检测了其在攻毒后 6 月龄草鱼不同组织和不同时间点内的表达量变化。对试验数据用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法来计算其相对表达量, 以 SPSS13.0 对实验数据进行统计分析、差异显著性检验和相关性分析。

1.5 原核表达载体的构建

用 *Bam*HI 和 *Hind*III 分别双酶切 *Nramp* 基因扩增片段和 pET-32a(+)表达载体质粒, 电泳分离胶回收纯化后, 构建重组表达载体 pET-32a-*Nramp*, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆摇床培养过夜, 进行菌液 PCR 检测, 阳性质粒送北京华大有限公司测序。

1.6 诱导时间对目的蛋白原核表达量的影响

将 pET-32a-*Nramp* 重组质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞。挑取阳性单菌落于 4 mL LB 液体培养基(含 Amp 100 μ g/mL), 37℃摇床培养过夜。再按 1:100 的比例接种于含 Amp 的 250 mL LB 培养基, 37℃培养至 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6 时, 取 1000 μ L 菌液作未诱导对照, 其他加 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)至终浓度 0.5 mmol/L, 37℃继续振荡培养, 分别诱导 2 h、4 h、6 h、8 h, 以含空载体 pET-32a 的菌液作对照。取不同诱导时间的菌液 1000 μ L, 用 PBS 洗涤 2 次后, 加 30 μ L PBS 混匀, 加 10 μ L 4×loading buffer, 沸水浴 10 min, -20℃冻存 5 min 以上, SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 G-250 染色, 对比检测分析蛋白表达量的差异。

表 1 PCR 扩增所用引物序列
Tab.1 PCR amplification primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
Nramp-F	CGCGGATCCAACATCGAGTCGGACCTTCAGTGT
Nramp-R	CCCAAGCTTGATGGAGGACTCGATGAAGTAGTA
Nramp-qRT-F	GCTCTCAACAGCACCATCCTC
Nramp-qRT-R	AACCGTCCCTCTGAAATCCA
β -actin-F	CCTTCTTGGGTATGGAGTCTTG
β -actin-R	GAGTATTTACGCTCAGGTGGG

1.7 蛋白表达形式的鉴定

将诱导后的菌液离心(12000 g, 4℃)收集菌体, 加 1×PBS 重悬, 超声破碎后收集上清和沉淀, 分别与 4×loading buffer 预混, 沸水浴 10 min, -20℃ 冻存 5 min 以上, 以 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 G-250 染色分析目的蛋白的表达情况。

1.8 目的蛋白的纯化

诱导后收集菌体, 进行超声波破碎, 离心后的沉淀经尿素梯度洗涤后, 用 8 mol/L 尿素溶解, 纯化结果用 SDS-PAGE 检测。按照 BCA 蛋白定量试剂盒的操作方法, 测定纯化后蛋白浓度。

2 结果与分析

2.1 *Nramp* 基因原核表达载体的构建

对 RT-PCR 所获得的 *Nramp* 基因的回收和纯化结果如图 1A 所示。目的片段与 pET-32a(+)载体双酶切胶回收后的凝胶电泳结果如图 1B 所示。两者连接后获得的重组载体 pET-32a-*Nramp* 转化 DH5 α , 随机挑取单克隆摇床培养过夜, 提取质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳发现在 5000 bp 和 750 bp 左右有两条 DNA 条带(图 1C), 证明 *Nramp* 基因目的片段成功插入 pET-32a(+)载体中。随机挑取 4 个单克隆提取质粒测序, 结果表明成功构建了表达载体(图 1)。

2.2 草鱼 *Nramp* 基因的差异表达规律

实时荧光定量 PCR 检测结果表明, 草鱼不同发育时期和不同组织中 *Nramp* 基因的 mRNA 表达量差异显著($P<0.05$)。由图 2A 可知, *Nramp* 基因在胚胎发育不同阶段的表达量差异显著($P<0.05$), 有随着胚胎发育的进行而显著增高的规律, 在胚胎发育结束进入幼鱼期时表达量达到最高, 与卵裂期相比差异显著($P<0.05$)。说明随着草鱼活动范围的扩大和环境的复杂化, 病原微生物的刺激增大, *Nramp* 基因的表达量显著增加, 以增强免疫力。

健康成鱼不同组织中, 以心脏组织作为标准进行相对定量分析, 结果显示 *Nramp* 基因的表达量在不同组织间也有显著差异($P<0.05$), 以肝中的表达量最高, 其次在肠、脾、头肾中的表达量较高, 而在鳃和眼中的表达量最低(图 2B)。说明,

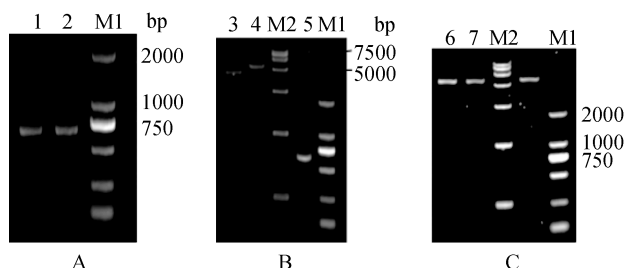


图 1 *Nramp* 基因扩增及 pet-32a-*nramp* 重组载体构建
M1: dl2000 DNA marker; M2: dl15000 DNA marker; 1, 2: *Nramp* 基因扩增产物; 3: 未酶切的 pet-32a(+)载体; 4: pet-32a(+)载体双酶切胶回收产物; 5: 目的片段双酶切胶回收产物; 6-8: 重组质粒双酶切鉴定。

Fig. 1 Amplification of *Nramp* gene and pet-32a-*nramp* recombinant vector construction
M1: dl2000 DNA marker; M2: dl15000 DNA marker; 1, 2: *Nramp* gene product by PCR amplification; 3: pet-32a(+) with none digested; 4: pet-32a(+) recovered by agarose gel after double digestion; 5: amplification products recovered by agarose gel after double digestion; 6-8: double digestion identification of the recombinant plasmid.

Nramp 基因所编码的免疫相关巨噬蛋白在与免疫相关的肝、肠道、脾和头肾组织中的表达量显著高于与免疫相关性较低的鳃和眼组织, 充分说明, *Nramp* 蛋白表达量与鱼类的天然免疫密切相关。

在草鱼感染嗜水气单胞菌后, 与未感染的草鱼对照组相比, 在所检测的 4 个组织中, *Nramp* 基因的表达量在攻毒后的不同时期变化显著(图 3)。在头肾中 *Nramp* 基因表达量在感染 12 h 时显著上调, 并保持较高水平直到 48 h, 在 72 h 和 96 h 时又显著下调, 在 7 d 时表达量继续下调而逐渐回归到初始水平。在肝中 *Nramp* 基因的表达量在 12 h 显著上调, 随后在 24 h 出现下调, 在 48 h 又上调, 并一直维持高表达水平到 7 d。在肠中 *Nramp* 基因表达量在 12 h 显著上调, 并保持较高表达水平到 48 h, 在 72 h 和 96 h 显著下调, 在 7 d 时表达量基本回归到初始水平; 在脾中 *Nramp* 基因表达量在 12 h 显著上调, 在 24 h 和 48 h 表达水平显著下调, 在 7 d 时表达量回归到初始水平。

2.3 不同诱导时间对目的蛋白原核表达的影响

将 pET-32a-*Nramp* 重组质粒转入 BL21(DE3)感受态中诱导表达, SDS-PAGE 电泳分析发现在约 40 kD 处有蛋白条带, 对诱导时间(2 h、4 h、6 h、8 h)进行条件摸索, 发现诱导 6 h 时表达量较多, 故选择 6 h 作为诱导时间(图 4)。

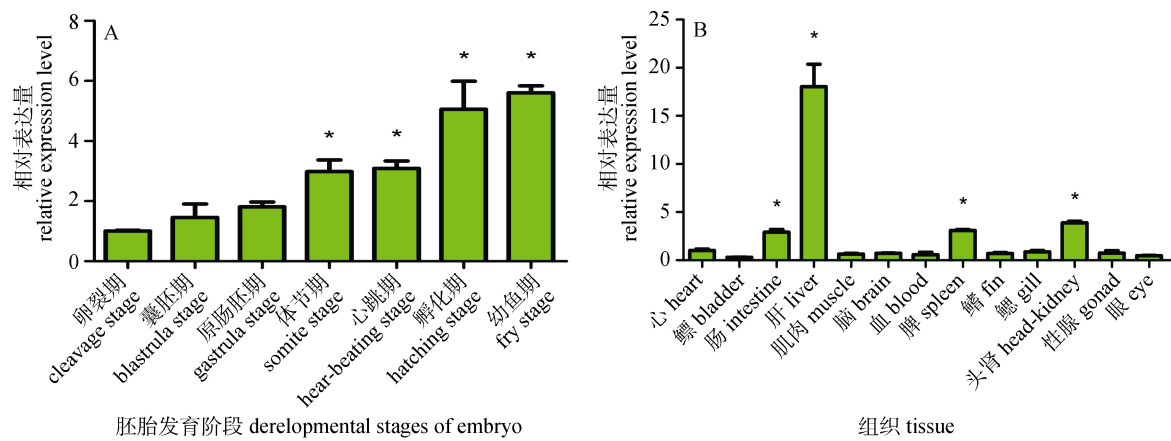


图 2 草鱼不同发育期和不同组织中 *Nramp* 基因的 mRNA 表达量

A: 不同发育时期的表达量变化; B: 健康成鱼不同组织中的表达量变化. β -actin 为持家基因, 星号表示差异显著($P < 0.05$).

Fig 2 Expression of *Nramp* gene in different developmental stages and different tissues of *Ctenopharyngodon idellus*
A: Expression of mRNA in different developmental stages of grass carp; B: Expression of mRNA in different tissues. *Nramp* gene mRNA levels were expressed as a ratio relative to β -actin levels in the same samples after real-time PCR. Significant difference ($P < 0.05$) is indicated by asterisks.

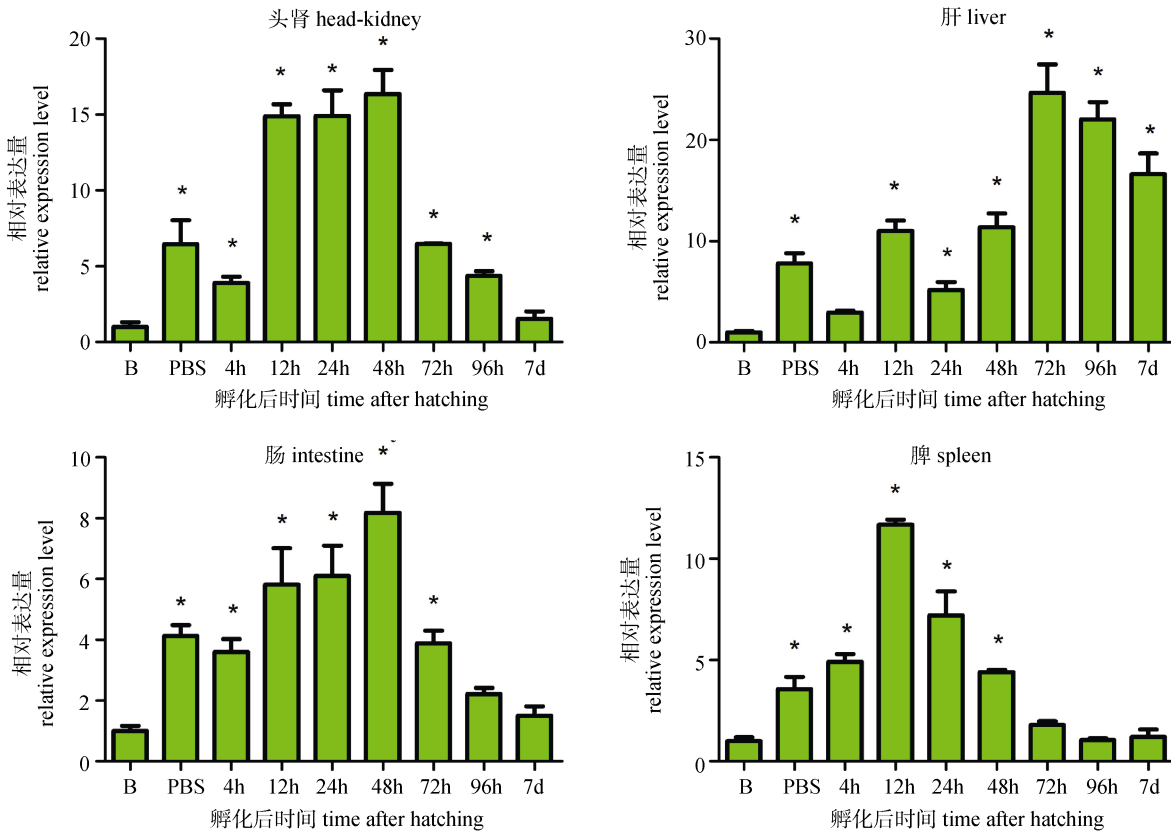


图 3 攻毒后草鱼不同组织在不同发育时期的 *Nramp* 基因表达量变化

感染嗜水气单胞菌后头肾、肝、肠、脾中不同时期 *Nramp* 基因的表达变化. β -actin 为持家基因, 星号表示差异显著($P < 0.05$).

Fig.3 Expression of *Nramp* gene in four tissues after injection with *Aeromonas hydrophila*
Expression of *Nramp* gene in four tissues (liver, head kidney, spleen, intestines) after injection with *Aeromonas hydrophila* (0 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 7 d). *Nramp* gene mRNA levels were expressed as a ratio relative to β -actin levels in the same samples after real-time PCR. Significant differences ($P < 0.05$) is indicated by asterisks.

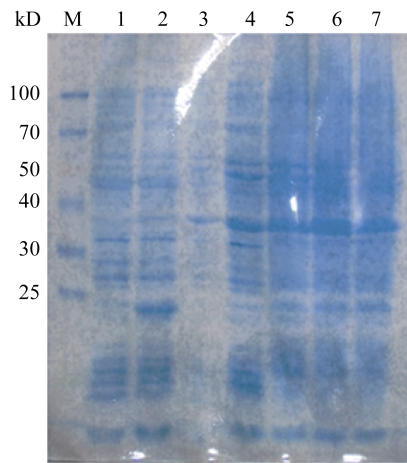


图 4 不同诱导时间对 Nrap 蛋白在大肠杆菌中表达的影响

M: 蛋白 Marker; 1-3 分别为 pET-32a 空载体未经诱导、pET-32a 空载体诱导 6 h、pET-32a-Nrap 未经诱导; 4-7 分别为 pET-32a-Nrap 诱导 2 h、4 h、6 h、8 h 后菌体蛋白。

Fig. 4 The influence of different induction time on the expression of Nrap protein in *Escherichia coli*

M: Protein Marker; 1-3: pET-32a without IPTG induced, pET-32a with IPTG induced for 6 h, pET-32a-Nrap without IPTG induction, respectively; 4-7: pET-32a-Nrap with IPTG induced for 2 h, 4 h, 6 h and 8 h, respectively.

2.4 融合蛋白表达形式的鉴定

pET-32a-Nrap 在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导后, 对收集的菌体超声破碎, 离心后得到的上清液和沉淀分别进行电泳, 在菌体破碎后的沉淀中有蛋白条带, 而在上清液中无蛋白条带 (图 5), 可以确定 Nrap 蛋白主要以包涵体的形式存在。

2.5 目的蛋白的纯化

将经尿素洗涤法纯化的蛋白用 SDS-PAGE 电泳检测后发现, 蛋白条带单一无其他杂带, 纯化效果较好 (图 6)。使用 BCA 蛋白定量试剂盒 (天根), 测得纯化后蛋白浓度为 2.58 mg/mL。

3 讨论

大量研究表明, *Nrap1* 基因在人和小鼠及其他哺乳动物抗细胞内病原菌感染方面起着非常重要的作用, 与动物体的免疫力和抗病性密切相关。本研究对比检测了草鱼 *Nrap* 基因在胚胎发育的不同阶段, 以及健康成鱼不同组织及其

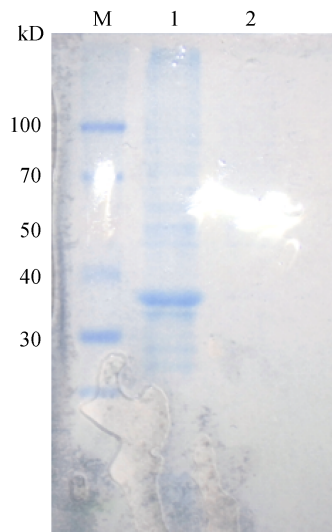


图 5 融合蛋白表达形式的鉴定

M: 蛋白 Marker; 1: 沉淀中融合蛋白的表达; 2: 上清中融合蛋白的表达。

Fig. 5 The identification of the fusion protein expression pattern
M: Protein Marker; 1: Fusion protein in precipitate; 2: Fusion protein in supernatant.

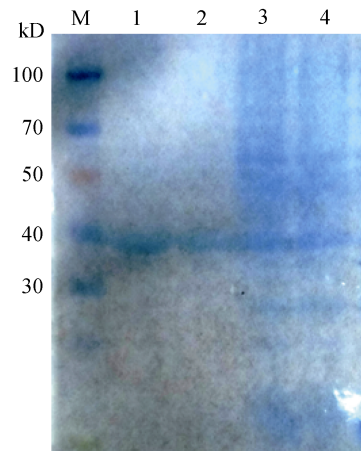


图 6 经尿素洗涤法纯化目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果
M: 蛋白 Marker; 1, 2: 纯化的蛋白; 3, 4: 未纯化的蛋白。

Fig. 6 SDS-PAGE results of purified protein by urea gradient washing
M: Protein Marker; 1, 2: the purified proteins; 3, 4: the proteins not purified.

感染病菌后的表达量变化, 研究结果为揭示 *Nrap* 基因在提高草鱼免疫力中的作用机制奠定了重要基础。

3.1 *Nrap* 基因表达在草鱼胚胎发育中的变化规律

本研究通过对比检测发现, *Nrap* 基因的表达量会随着胚胎发育的进行而逐渐增加, 说明随

着胚胎发育的进行, 草鱼胚胎与环境的接触逐渐增多, 外界病原菌逐渐增多, *Nramp* 基因所编码的天然抗性相关巨噬蛋白在提高胚胎免疫力方面起着重要作用。Chen 等^[15]对牙鲈 *Nramp* 基因在胚胎发育中的表达量研究中有类似的发现, 从受精后的 4 h(8 细胞阶段)到 80 h(孵化阶段), *Nramp* 基因的 mRNA 表达量逐渐增加。在大菱鲆的研究中也有类似的发现^[16]。*Nramp* 基因从胚胎发育的囊胚期到幼鱼期, 其表达水平逐渐增加, 说明草鱼在胚胎发育过程中, *Nramp* 基因的表达具有明显的时空特异性: 在胚胎发育早期阶段, 可能受母源抗体的影响, *Nramp* 基因转录水平较低; 随着胚胎发育的进行, *Nramp* 基因表达水平呈上调趋势, 这是草鱼免疫防御机制逐渐完善的过程。

本研究结果表明, *Nramp* 基因转录活性在发育至幼鱼期时达到最大, 表明草鱼出膜后, 发育到幼鱼阶段, 其免疫系统接近完善, *Nramp* 基因在草鱼免疫系统中有重要作用。*Nramp* 基因在草鱼胚胎发育不同时期内有助于抵抗外源病菌侵入的机制还有待于进一步研究。

3.2 *Nramp* 基因表达在草鱼不同组织中的表达变化规律

Nramp1 基因在哺乳动物中呈组织特异性表达。人体中的 *Nramp1* 可以在脾、肝、肺中检测到^[17], 然而在小鼠中 *Nramp1* 主要在脾中表达, 肝中表达量较少^[18], 在牛中则主要在网状内皮系统的巨噬细胞中表达^[19]。*Nramp2* 在哺乳动物几乎所有组织中都表达^[20]。本研究在草鱼的 13 个组织中均检测到了 *Nramp* 基因的表达, 其中在肝中的表达量最高; 在脾、头肾、肠中的表达量比较相似, 低于肝中的表达量; 在鳃和眼中的表达量最低。这与 Chen 等在牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[15]、真鲷(*Pagrus major*)中^[21]的研究结果相似。Chen 等^[22]在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的研究中也发现了相似的结果。本研究发现, 草鱼 *Nramp* 基因主要在肝、脾、头肾、肠中表达, 而在其他组织中的表达量很少, 这种表达量的变化模式与鱼类免疫器官的分布是相一致的。

3.3 *Nramp* 基因在草鱼感染致病菌后不同阶段的表达变化规律

为了从分子水平上探明草鱼 *Nramp* 基因参与免疫调节的机制, 本研究以嗜水气单胞菌对健康草鱼进行了腹腔注射人工攻毒, 以未注射的组作为对照。草鱼注射 PBS 12 h 后, *Nramp* 基因在头肾、脾、肝和肠组织均有上调表达的现象, 说明在这些免疫相关组织中的 *Nramp* 对外界刺激较为敏感。感染嗜水气单胞菌后, 肝中 *Nramp* 基因相对表达量在 72 h 达到最大, 随后开始下降, 7 d 时仍处于一个较高的表达水平, 头肾、肠和脾组织中 *Nramp* 基因相对表达量基本上都是先上调, 头肾和肠在 48 h 表达量达到最大值, 脾在 12 h 表达量达到最大, 随后表达量开始下降, 并逐渐恢复到原来的水平。范玉顶等^[23]利用草鱼呼肠弧病毒感染肾细胞系时发现, 草鱼 *Nramp* 基因的表达量在感染后的 3 h 达到最大, 24 h 后回落至正常细胞水平。Chen 等^[16]用鳃弧菌感染大菱鲆胚胎细胞系时发现, 在感染后的 6 h 表达量上调, 在 12 h 达到最大, 感染后 96 h 其表达量恢复到正常水平。草鱼感染嗜水气单胞菌后 *Nramp* 基因在 4 个组织上调的现象, 可能是进行抗原处理和呈递的结果, 在整个感染过程中 *Nramp* 基因在 4 个组织中相对表达水平出现较为明显的上下波动现象。草鱼感染致病菌引起免疫相关组织中 *Nramp* 的表达量上升, 说明 *Nramp* 在硬骨鱼类对病原菌的免疫反应中发挥重要作用。畜禽育种中, 将 *Nramp1* 作为抗病候选基因研究其与抗病的关系, Liu 等^[24]发现鸡的 *Nramp1* 保守区的 SNP 与沙门氏菌疫苗接种及病原攻击后的免疫应答相关; 吴宏梅等^[25]发现大白猪和松辽黑猪 *Nramp1* 基因第 6 内含子多态性与免疫功能间存在显著相关; Paixão 等^[26]发现荷斯坦牛、瘤牛 *Nramp1* 基因 3'UTR 区的不同基因型对布鲁氏菌的抗性和敏感性差异显著, 鉴于 *Nramp* 在草鱼免疫系统中的作用, 可将草鱼 *Nramp* 基因多态性与免疫功能的相关性作为下一步的研究目标。

3.4 *Nramp* 基因原核表达载体构建及蛋白表达

本研究将 *Nramp* 基因目的片段及 pET-32a(+)载

体双酶切连接后,成功构建了 pET-32a-Nramp 原核表达载体,在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导,在 37℃ 诱导 6 h 后目的蛋白在包涵体中获得大量表达,利用尿素梯度洗涤法对其纯化获得了相对分子质量约为 40 kD 的融合蛋白,这为 Nramp 单克隆抗体的制备和利用免疫组化及免疫印迹技术在蛋白水平研究 *Nramp* 基因表达量的变化方面奠定了基础。

参考文献:

- [1] Belouchi A, Cellier M, Kwan T, et al. The macrophage specific membrane protein *Nramp* controlling natural to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 1181–1196.
- [2] Vidal S M, Malo D, Vogan K, et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg[J]. *Cell*, 1993, 73: 469–485.
- [3] Kishi F. Isolation and characterization of human *Nramp* cDNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 204: 1074–1080.
- [4] Grtmheid S, Cellier M, Vidal S, et al. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene[J]. *Genomics*, 1995, 25: 514–525.
- [5] Kishi F, Tabuchi M. Complete nucleotide sequence of human *Nramp2* cDNA[J]. *Mol Immunol*, 1997, 34: 839–842.
- [6] Cellier M, Govoni G, Vidal S, et al. Human natural resistance associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression[J]. *J Exp Med*, 1994, 180: 1741–1752.
- [7] Feng J, Li Y, Hashad M, et al. Bovine natural resistance associated macrophage protein1(*Nramp1*) gene[J]. *Genome Res*, 1996(6): 956–964.
- [8] Grtmheid S, Cellier M, Vidal S, et al. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene[J]. *Genomics*, 1995, 25: 514–525.
- [9] Dorschner M O, Philips R B. Comparative analysis of two *Nramp* loci from rainbow trout[J]. *DNA Cell Biol*, 1999, 18: 573–583.
- [10] Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter[J]. *Nature*, 1997, 388: 482–488.
- [11] Fleming M, Romano M, Maureen A, et al. *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade(b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1148–1153.
- [12] Goto Y, Nakamura R M, Takahashi H, et al. Genetic control of resistance to mycobacterium intracellular infection in mice[J]. *Infect Immun*, 1984: 46: 135–140.
- [13] Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* in mice[J]. *Immunology*, 1981, 127: 2417–2421.
- [14] Vidal S, Tremblay M L, Govoni G, et al. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene[J]. *J Exp Med*, 1995, 182: 655–666.
- [15] Chen S L, Wang Z J, Xu M Y, et al. Molecular identification and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein(*Nramp*) cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(3): 365–373.
- [16] Chen S L, Zhang Y X, Xu J Y, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein(*Nramp*) cDNA from turbot (*Scophthalrus maximus*)[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2007, 147: 29–37.
- [17] Cellier M, Shustik C, Dalton W, et al. Expression of the human *NRAMP1* gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia[J]. *J Leuk Biol*, 1997, 61: 96–105.
- [18] Vidal S M, Malo D, Vogan K, et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg[J]. *Cell*, 1993, 73: 469–485.
- [19] Barthel R, Feng J, Piedrahita J A, et al. Stable transfection of the bovine *Nramp1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival[J]. *Infect Immunol*, 2001, 69: 3110–3119.
- [20] Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metalion transporter[J]. *Nature*, 1997, 388: 482–488.
- [21] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, et al. Cloning and characterization of natural resistance associated macrophage protein(*Nramp*) cDNA from red sea bream(*Pagrus major*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17: 305–313.
- [22] Chen H, Waldbieser G C, Rice C D, et al. Isolation and characterization of channel catfish natural resistance associated macrophage protein gene[J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26: 517–531.
- [23] Fan Y D, Xu J, Luo X S. Molecular cloning, characterization and expression of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) gene cDNA from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(1): 38–47.[范玉顶, 徐进, 罗晓松, 等. 草鱼天然抗性

- 相关巨噬蛋白基因全长 cDNA 的克隆与表达分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 38–47.]
- [24] Liu W, Kaiser M G, Lamont S J. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella enteritidis* in young chicks[J]. Poul Sci, 2003, 82: 259–266.
- [25] Wu H M, Wang L X, Cheng D X et al. Relationship between polymorphisms of *Nramp1* gene and immune function of pig[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(1): 215–220.[吴宏梅, 王立贤, 程笃学, 等. 猪 *Nramp1* 基因多态性与免疫功能的相关性[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 215–220.]
- [26] Paixão T A, Ferreira C, Borges A M, et al. Frequency of bovine *Nramp 1* (*Slc11a1*) alleles in Holstein and Zebu breeds[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2006, 109: 37–42.

Expression characteristics and protein expression of the natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

YANG Kang, WANG Yiya, LIU Tiezhu, LI Tongming, JI Xiangshan, WANG Hui

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

Abstract: To explore the function of *Nramp* in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) immune system, gene expression was analyzed in different developmental stages and tissues. Four tissues of grass carp at different times after challenge with the pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila* were analyzed by real-time quantitative RT-PCR. The 642 bp Open Reading Frame (ORF) region of grass carp *Nramp* was expressed using prokaryotic expression technology. The fusion protein had a relative molecular mass of 40 kD. Real-time quantitative RT-PCR analysis indicated that the *Nramp* mRNA level in embryos gradually increased during embryogenesis from cleavage to fry stages after fertilization, with the highest level in the fry stage. In adult fish, the *Nramp* mRNA level in different tissues significantly differed; *Nramp* transcripts were found to be highly abundant in liver; moderately abundant in the head kidney, spleen, and intestine; and least abundant in the eye and bladder. After challenge with *A. hydrophil*, with uninjected groups as the control, the *Nramp* mRNA level in the head kidney, liver, spleen, and intestine significantly increased ($P < 0.05$). There was significant up-regulation in head kidney at 12 h post-treatment, with a maximum level at 48 h post-infection; significant down-regulation at 72 h and 96 h; and the expression regressed to the initial level by 7 d. *Nramp* expression in the liver was significantly increased at 12 h post-treatment; followed by a decrease at 24 h post-treatment; another increase at 48 h, with a maximum level at 72 h post-infection; and the high expression level was maintained at 96 h and 7 d post-treatment. There was significant up-regulation in the intestine at 12 h post-treatment, with a maximum level at 48 h post-treatment; significant down-regulation at 72 h and 96 h; and the expression regressed to the initial level by 7 d. In the spleen, *Nramp* mRNA level increased at 4 h post-treatment, with a maximum level at 12 h; then, there was significant down-regulation at 24 h and 48 h; and the expression regressed to the initial level by 7 d. Bacterial infection can increase *Nramp* expression in immune-related organs, which may indicate that *Nramp* plays an important role in the innate immune response of grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; *Nramp* gene; expression and analysis; prokaryotic expression; protein purification

Corresponding author: WANG Hui. E-mail: wanghui2328@sda.edu.cn