

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00038

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

范玉顶^{1,2}, 徐进^{1,3}, 罗晓松¹, 周勇³, 肖艺³, 曾令兵^{1,2,3}

1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000;
2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;
3. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070

摘要: 天然抗性相关巨噬蛋白(Nramp)家族是一类抑制胞内寄生菌侵染的天然免疫相关蛋白。本研究克隆了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)Nramp 基因并进行了表达分析。该基因 cDNA 序列全长为 3 158 bp, 编码 1 个含 544 个氨基酸的蛋白。该蛋白含有 Nramp 家族的特征序列: 包含 12 个跨膜区(TM)、1 个由 20 个氨基酸残基组成的胞质内转运结构域(CTM)。草鱼 Nramp 同其他 16 个物种的 Nramp 氨基酸序列同源性在 62.5%~90.2% 之间。草鱼 Nramp 基因 cDNA 的独特结构是其 3'末端非翻译区(UTR)和 5'UTR 各有 1 个脊椎动物 Nramp2 中的铁反应控制蛋白结合位点(IRE)。系统进化分析表明, 草鱼 Nramp 和所有鱼类 Nramp 聚为一簇, 与哺乳类 Nramp2 的亲缘关系较近。Nramp 基因在草鱼头肾和脾脏中的表达量最高, 在肌肉和皮肤中的表达量最低, 在草鱼呼肠孤病毒(GCRV)感染的草鱼肾脏细胞系(CIK)中的表达量明显升高。[中国水产科学, 2011, 18(1): 38–47]

关键词: 草鱼; 天然抗性巨噬蛋白基因(Nramp); cDNA; 表达; RT-PCR; RACE

中图分类号: Q341

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0038-10

天然抗性相关巨噬蛋白(Natural resistance associated macrophage protein, Nramp)属于一个古老的膜整合转运蛋白家族, 在各物种间保持着高度的保守性^[1], 含有 10~12 个跨膜区(Transmembrane, TM), 1~2 个糖基化的胞质外环状结构和 1 个胞质内转运蛋白特征结构域^[2], 具有调节巨噬细胞的抗菌活性、抑制胞内寄生菌侵染等作用^[3]。目前在人和小鼠等哺乳动物中已发现 2 种天然抗性巨噬蛋白: Nramp1 和 Nramp2^[4-7]。在小鼠中, Nramp1 对牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、沙门氏菌(*Salmonella*)的感染起着重要的控制作用^[8-9], 单个密码子突变(Gly169→Asp)即可导致基因功能的丧失^[10]。Nramp1 主要在吞噬细胞、脾脏、肝脏以及肺中特异性表达^[11-12], 而 Nramp2 在绝

大多数组织和细胞中均表达^[6], 对哺乳动物体内铁的吸收转运和重新利用起到决定性的调控作用^[13-14]。目前, 已在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲈(*Lateolabrax japonicus*)、真鲷(*Pagrosomus major*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆[*Scophthalmus maximus* (L.)]等海水鱼中克隆得到 Nramp 基因, 并对该基因的序列特征以及脂多糖、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激后在组织及胚胎细胞系中的表达进行了研究^[15-19], 淡水鱼中仅在鲤(*Cyprinus carpio*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中有报道^[20-21]。与哺乳动物相比, Nramp 基因在鱼类免疫系统中的功能还知之甚少。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是中国产量最大的淡水经济鱼类。随着养殖规模以及养殖密

收稿日期: 2010-01-05; 修订日期: 2010-02-19.

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金项目(nycytx-49-16); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2008JBYWF-22); 长江水产研究所所长基金项目(SZ2008-05).

作者简介: 范玉顶(1975-), 博士, 助理研究员, 从事水产病害研究. E-mail: ydfan@sohu.com

通讯作者: 曾令兵, 博士, 研究员, 主要从事水产养殖病害研究. E-mail: zenglingbing@gmail.com

度的不断扩大,草鱼的各种细菌性疾病以及由草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)引起的草鱼出血病等病害问题日益突出^[22-23]。分子标记辅助育种可以定向选育抗病新品种,在鱼类育种中已取得了较好的效果^[24-25]。鉴于 *Nramp* 的重要功能,进行了草鱼 *Nramp* 基因的克隆、序列比对以及组织表达研究。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 1 龄草鱼取自中国水产科学研究院长江水产研究所的窑湾试验场,于实验室水族箱中暂养 1 周无异常后使用。将草鱼的肝、肾、脾、鳃、小肠、肌肉和皮肤等组织取出,迅速放入液氮中冻存储用。草鱼肾脏细胞系(CIK)由本实验室建立,使用 MEM 培养基于 28℃ 传代培养。草鱼呼肠孤病毒(GCRV) 873 株由武汉大学典型培养物收集保藏中心惠赠^[26]。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

Trizol(Invitrogen)法提取组织和细胞的总 RNA,然后用紫外分光光度计(Biophotometer, Eppendorf)测定 RNA 浓度,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。用 ImProm-IITM 反转录试剂盒(Promega)合成 cDNA 链; RACE-Ready-cDNA 用 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)合成, -20℃ 保存。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

根据 GenBank 中已发表的鲤 (AJ133735)、虹鳟(AF048760)、鲈(*Morone saxatilis*, AY008746)、真鲷(AY485311)、牙鲆(AY907946)等的 *Nramp* cDNA 同源序列合成 1 对简并引物 *Nramp*-F/*Nramp*-R(表 1),用草鱼肝脏中提取的总 RNA 进行 RT-PCR 扩增。根据获得的 PCR 片段序列设计 4 条特异性引物(表 1),按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)说明书进行 5'RACE 和 3'RACE 反应,获得的片段经过序列拼接得到全长 cDNA。

特异性引物 RT-PCR: 以 β -actin 为内参,用等量的 RNA 作为各样品逆转录的起始模板,用基

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Tab. 1 PCR amplification primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'-3')
primer name	primer sequence (5'-3')
<i>Nramp</i> -F	ACATGCAGGARGTSATYGGC (Y=C/T)
<i>Nramp</i> -R	SACRTTGATGAGGAASGAG (R=A/G, S=G/C)
β -actin-F	TTGCCGCACTGGTTGTTG
β -actin-R	TTCCCTGTTGGCTTTGG
rt-F	ACCAGGGCGAGGTTCTGAAGGGCATG
rt-R	AAAACAGCCCAAAACACACCCCCTT
3'F	GCTCCGCCATCGCCCTCAATCTGCTG
3'Fn	GACCAGGGCGAGGTTCTGAAGGGCAT
5'R	AGAAACATGCCCTTCAGAACCTCGCC
5'Rn	CAGCAGATTGAGGGCGATGGCGGAG
UP	CGATCTAGAGGTACCGGATCC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

因特异性引物对目的基因在鱼体不同组织中和 GCRV 感染 CIK 细胞后不同时间的表达进行检测。所用的 1 对特异性引物为表 1 中的 rt-F 和 rt-R, 扩增产物大小为 404 bp; 根据 GenBank 中草鱼 β -actin 序列(M25016)设计 1 对内参引物 β -actin-F 和 β -actin-R, 扩增片段大小为 339 bp。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min, 然后 94℃ 30 s, 55~65℃ 30 s, 72℃ 30 s, 25~30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.4 目的片段纯化、克隆及测序

PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 切下目的片段, 按照 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)试剂盒说明书进行纯化。将回收产物按物质的量比 3:1 的比例与 pCR2.1 (Invitrogen)载体 16℃ 连接过夜。取连接产物 5 μ L 用于转化 DH5 α 大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞, 利用菌落 PCR 鉴定出阳性质粒, 送上海生物工程技术有限公司测序。

1.5 序列分析

登录 NCBI 用 BLAST 对测序结果进行同源性检索; 用 DNASTAR 5.0 软件分析 cDNA 序列和开放阅读框; 采用 Signal P^[27] 分析信号肽序列; 利用 PHDsec 在线服务器(<http://www.predictprotein.org/>)分析蛋白的二级结构; 采用 Kyte and Doolittle 算法^[28]通过 ProtScale 在线工具(<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>)分析蛋白的亲水性特征; 用 Clustal W 软件^[29]进行多序列比较; 利用 MEGA3.0^[30]中的邻位相联法(Neighbor-Joining,

NJ)^[31]构建系统进化树。序列比对所用物种 Nramp 蛋白的 GenBank 序列号如下: 鲤 Nramp (CAB60196)、黑头呆鱼(*Pimephales promelas*) Nramp(AAF01778)、虹鳟 Nramp alpha (AAD20721)、虹鳟 Nramp beta(AAD20722)、鲈 Nramp (AAG31225)、真鲷 Nramp(AY485311)、牙鲆 Nramp (AY907946)、大菱鲆 Nramp(ABB73023)、斑点叉尾鲷 Nramp(AAM73759)、人(*Homo sapiens*) Nramp1 (BAA08908)、人 Nramp2(AAC21459)、小鼠(*Mus musculus*)Nramp1(AAA39838)、小鼠 Nramp2 (AAC42051)、田鼠(*Rattus norvegicus*) Nramp2 (AAC53319)、狗(*Canis familiaris*)Nramp1 (ABG78262)、狗 Nramp2(XP_543669)、牛(*Bison bison*) Nramp1(AAB17552)、羊(*Ovis aries*)Nramp1(AAC28241)、猪(*Sus scrofa*)Nramp1(AAC24491)。

2 结果与分析

2.1 草鱼 Nramp 基因全长 cDNA 的克隆

利用简并引物通过 RT-PCR 在草鱼肝脏中扩增得到 1 条长度为 455 bp 的特异性条带, 经序列测定与 BLAST 分析, 该条带为 Nramp 基因部分片段, 根据此片段设计合成 4 条特异性引物, 采用 5'RACE 和 3'RACE 法分别扩增得到长度为 662 bp 和 2 383 bp 的 Nramp 基因 5'、3'末端片段。最后用 DNASTAR 软件去除重叠序列和接头序列, 拼接得到 3 158 bp 的草鱼 Nramp 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 序列号 GU290344)。草鱼 Nramp 全长 cDNA 由 1 635 bp 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)、155 bp 5'末端非翻译区(Untranslated Regions, UTR)和一个较长的 1 368 bp 3'UTR 组成。3'末端含有 4 个典型的加尾信号 AATAAA 和 29 bp 的 Poly(A)尾; 另外, 在 5'UTR 和 3'UTR 分别发现了 1 个铁反应控制蛋白结合位点(Iron-responsive regulatory- protein-binding site, IRE)的特征序列 (CNNNNNCAGTG)^[32](图 1)。

2.2 草鱼 Nramp 蛋白的结构分析

根据获得的草鱼 Nramp 基因 cDNA 序列推导出相应的氨基酸序列, 结果表明, 1 635 bp 的 ORF 序列编码 1 个含 544 个氨基酸的蛋白, 预测的相

对分子量为 60.2 kD, 等电点为 5.3。利用 PHDsec 对该蛋白的二级结构进行了分析(图 1), 发现该蛋白具有 Nramp 家族的特征序列: 含有 12 个跨膜区 (Transmembrane region, TM), 1 个介于 TM8 和 TM9 之间由 20 个氨基酸残基组成的、高度保守的胞质内转运结构域(Conserved Transport Motif, CTM), 1 个位于 TM1 之前的 N 端蛋白激酶 C 磷酸化位点(S/T-X-R/K), 4 个潜在的 N-糖基化位点(N-X-S/T-X), 其中 2 个存在于 TM7 和 TM8 之间, 另 2 个分别位于 N 端和 C 端; 该蛋白还含有 1 个位于 TM6 和 TM7 之间的酪氨酸激酶磷酸化位点(R/K-X-X-X-D/E-X-X-X-Y), 8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(S/T-X-X-D/E)以及 13 个 N-豆蔻酰化位点(G-EDRKHPFYW-X-X-STAGCN-P); 同时在 TM7 区还发现了 1 个未在其他物种 Nramp 蛋白中报道过的 P-loop 位点 (A/G-X-X-X-X-GK-S/T)^[33] (图 1)。从蛋白的氨基酸组成上看, Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 以及 Trp 等非极性氨基酸占 53%, 表明该蛋白具有较强的疏水性, 通过 ProtScale 进行亲水性分析的结果也进一步验证了这一典型特征(图 2); 鱼类 Nramp 的亲水性分布图和人、鼠 Nramp2 几乎一致, 同时从图 2 还可以看出, 草鱼 Nramp 和鲤、斑点叉尾鲷、牙鲆等鱼类的 Nramp 在胞质内外环的间隔大小上也高度保守。

2.3 Nramp 序列比对和系统进化分析

通过 Clustal W 软件对草鱼 Nramp 的氨基酸序列同其他鱼类 Nramp、人 Nramp1 和 Nramp2 以及小鼠 Nramp1 和 Nramp2 的氨基酸序列进行了比对分析(图 3), 结果表明, 除了 N 端和 C 端外, 所比较物种的氨基酸序列在 TM 区以及 CTM 区都相对比较保守, 尤其是 TM1 区, 在所有鱼类 Nramp 和人、小鼠的 Nramp2 中完全保守, 和人、小鼠的 Nramp1 也只有 1 个氨基酸残基(F)的差异; 鱼类的 Nramp 在 TM2、TM3、TM4、TM7 和 TM10 区中分别只有 2、3、2、3、2 个氨基酸残基的差异, 相对而言, 在 T5、T11 和 T12 区氨基酸的保守性要差一些。在 CTM 区, 除了真鲷中有 1 个 A

GGATGACAGCAGCGAGGTACAGAGCGTCTCTCGGTGCCACAATCTTCACTACAGAGCAGT	65
TGAATGAAATCACACTGTGGCGTGCAGTGGTCTGGATCAGTATCTTCTTGGGTTAGCTTCTGACGGGACACTCGGAGCTC	155
ATGGAGACTGAACGGGATGAGGATGTGCCGAAGAGAGCAGCGGAGCCTGCCCTCTACAGTCGGGTGTCTCCGAGGACGACCGGTC	245
M E <u>E R D</u> E D V P E E <u>S K R B</u> P A L Y S P V <u>S P Q D</u> Q P V	30
TCCACGTACTTCGATGAGAGGGTCCCATCCCTGATAATGACAGTGCAAGATGTTAGCTTTCGTAACCTTGGGCTTCACTGGACCG	335
S <u>T Y F D</u> E R V P I P D N <u>D S A</u> K M F S F R K L W A F T G P	60
GGTTTCTGATGAGCATTCGTATCTGGACCTGGGAACATCGAGTCGACCTTCAGTGTGGGCTATAGCAGGTTTAACTGCTCTGG	425
G F L M S I A Y L D P G N I E S D L Q C G A I A G F K L L W	90
TM1	
GTGCTGTGGCGCACCATCATCGGGCTCTGCTGCAGCGTCTGGCCGCGCCTCGGCTCGTCACAGGATGCACCTGGCCGAGGTC	515
V L L A A T I I G L L L Q R L A A R L G V V T G M H L A E V	120
TM2	
CGCAACCGCCATTACCCATGCTGCCGGGATCATCTGTGGCTGATGTTGGAGTGGCCATCATCGGCTCGACATGCAGGAGGTCATC	605
R N R H Y P M V P R I I L W L M V E L A I I G S D M Q E V I	150
TM3	
GGCTCCGCCATCGCCCTCAATCTGCTGTGGTGGCGGAGTTCCTCTGTGGGTGGAGTGTGATAACCATCATCGACACTTTTGTGTTG	695
G S A I A L N L S V G R I P L W G G V L I <u>I I D</u> T F V F	180
CTGTTTTTGACAAGTACGGTCTGAGGAAGCTGGAGCGTTCCTGGGGTCTCATCACCATCATGGCTCTGAGCTTGGTTTCGAGTAT	785
L F L D K Y G L R K L E A F F G V L I T I M A L S F G F E Y	210
TM4	
GTGCGTGTGGCTCCGACCAAGGGCGAGGTTCTGAAGGCATGTTTCTGCCGTACTGCCAAGGCTGGACCAACGACGTGGAGCAGGCC	875
V R V A P D Q G E V L K G M F L P Y C Q G C G P <u>I Q L E Q A</u>	240
GTGGGATCGTGGGAGCGGTATAATGCCTCATACATCTATCTGCATTCTGCTCTGTTAAGTCAGAGACATCGATCGAGCCAAACAA	965
V G I V G A V I M P H N I Y L H S A L V K S R D I D R A N K	270
TM6	
AGAGAGGTGAAGAGGCCAAGTACTACTTCATCGAGTCTCCATCGCGCTCTTGTCTCTCTCATCAAGCTTTTTCGGTGGCC	1055
R E V K E A N K Y Y F I E S S I A L F V S F L I N V F A V A	300
GTCTTCGCGGAGGCTCTTATGGCAAGACAAATGGAAGTGGGCCAGAAGTGAATCAGAGCGGAAGTCTCAGATGATCTCTTCCA	1145
V F A E A F Y G K <u>I N M B</u> V G Q K K C N Q S G S P H S D L F P	330
TM7	
GCCAAACGAAACCTGAAGTCGACATCTACAAGGGGTGTGGTTTTGGGCTGTTTTTTGGCCCGCTGCGCTGTATATTTGGGCG	1235
A N N E T I E V D I Y K G G V V L G C F F G P A A L Y I W A	360
ATTGGGATCTCGCGCTGGACAGAGTTCAACCATGACTGGAACCTACTCTGGTCAGTTTGTGATGAGGGTTTCTGAACTCGCGTGG	1325
I G I L A A G Q S S T M T G T Y S G Q F V M E G F L N L R W	
TM8	
TCTCGCTTCGCTCGCGTGTGCTGAGCGGCTCCATCGCCATATTACCACTCTTCTGTTGGCGCTCTTCAGGAGTGCAGCATCTCACC	1415
S R F A R V L L T R S I A I L P T L L V A V F Q D V Q H L T	420
TM9	
GGCATGAACGACTTCTGAACGTGCTGCAGAGCATGCAGTCCGCTCGCTCTGATCCCCATCTGACCTTACCAGTTTGAGTCACTA	1505
G M N D F L N V L Q S M Q L P F A L I P I L T F T S L T S L	450
TM10	
ATGACGATTTTGCAACGGACTCGCTGGAAGTCACTGCGGCTGCTCATCTGCTGGTGGTGTGGCATCAACATGTAATCTGTTGGT	1595
M S D F A N G L A W K I S G G V L I L V V C A I N M Y F V V	480
TM11	
GTGTACGTGACGGCTCTCAACAGCACCCTCTACGTCTTCTCTCTTAATCTCCATTGCTACCTGAGCTTCGTATCTATCTGGTC	1685
V Y V T A L N S T I L Y V F S S L I S I A Y L S F V I Y L V	510
TM12	
TGCGGCTGTCTGATCGCTCTCGGCTGTCTGCTGGATTTTCAAGGGACGGTTCAGCACCCACAGCGGTTCTATTGACGAACGCCA	1775
W R C L I A L G V <u>S R L D</u> F R G T V Q H P P A V L I D E Q P	540
GAGTTCCGATTCCTGAACGGAACATGATCACTTCCAAGTATGAACATTTGTTCTTCTGACGTGAGGAACGCTCACTGTGACAAACA	1865
E F D S *	544
GTAAATCCAATATGTTTCTTCTGATCCGTGGCTCTTCTCTTGGCCAGTTTTATAGATCTACTATTGAGGTCCGTGAGAACTG	1955
ATAGTGTAGATCAACTGA(AATAAA)TTATTTACTGCAATATGCGTTTGAATAATTAATATTACAGAAGAAGCAGTCTGTGAATATAAT	2045
TAAACCGTACAGGGTCAGTTTATGACTCACTAATGACTCAATTTCTGATGACCGGAGTGGATGATTGAACCGTTATTT	2135
AAAGGTCTTAAACGTTGTTAATCACT(AATAAA)CGATGAAGTGTATTATGACCCGTAGAAATATTTTACCCTAAACATGTGTTTATA	2225
AGTAATAGCTGAATCAAGAGAAATGAGTATTATTTATTGAAGGAACGGCATTGAATTCAGGAACGCTTACAGCCCATCAGCTC	2315
ATGAATCCGGGTGCAGAACTCTGCTGAATCTCCATTCAAGCGATGCTCAAAATCGGGCTGAATCAACATCTGGACACTGGGCT	2405
AAAACGTGCAACGAATGACCTGTCTCTGCTCAATAATTCATCCATCATGTTTATTGAATCATGTCGATCAATCAATCAAT	2495
TCACATCCATGCTGCTTTTCCATTTAAAGAACTGTATTATGTCGCTGACTCTTAAACCTTCATCTGTTGCTCAACAGATTGCT	2585
GCCATCATTTGACAAATATAACTAACAGGTGAGGGTTTGAAGTAAACGGGTTTCTGACTGGGCTTAGTTTGTAGAGATGCAATACA	2675
GTGATCGAGCTTTTCAAGAACCTTCAAGAAAGAAAGTGCCTTTAAATTAATTCGAAAGAACTGCTGTTTCAATGTCATATTCTAA	2765
ATTCTGAAGTGTTCATGTGAGATGTCAGTCTCAAGTTTGAAGTTTCTCCATGTCGATGATTCATTTCATGTTTCAGCT	2855
CACCGTTCGCTTGTGTTCTGAAATGACCTTGATTTCTGTTGTTTTCGTAATAACAGATGTGAGTTATTGTCGCTAACCTCAGTT	2945
CTGTTCCGTTCTGTTGCTTTAAACACATTCAGTCTTAAACCTTGAACAAATTCAAATGGAAGAAAGATGGCTGAGATGTGTTAT	3035
GTTTGAAGACATGATCCATCTGATAAAGCTGATGTATTACACTGTACATGCTGACAAATG(AATAAA)AGTCCGAATGACAA	3125
CAAGAAAAA	3158

图1 草鱼Nramp全长cDNA序列及推测出的氨基酸序列

跨膜区(TM)用下划线标出并编号TM1~12; 位于TM8和TM9之间的转运结构域(CTM)用下划线标出; 加尾信号(AATAAA)用阴影和方框标出; 位于5'UTR和3'UTR的IRE位点用双下划线和阴影标出; N-糖基化位点用虚线标出; 酪蛋白激酶II磷酸化位点用方框标出; 蛋白激酶C磷酸化位点用双下划线标出; 酪氨酸激酶磷酸化位点用波浪线标出; P-loop位点用斜体字和阴影标出; N-豆蔻酰化位点用阴影标出。

Fig. 1 Full-length cDNA and predicted amino-acid sequence of *Ctenopharyngodon idellus*' Nramp gene

The transmembrane regions (TM) are underlined with single lines and numbered 1-12. The consensus transport motif (CTM) between TM8 and TM9 is singly underlined. The poly A signal (AATAAA) is boxed and shaded. The IRE sites located in 5'UTR and 3'UTR are underlined and shaded. The N-glycosylation sites are marked with broken lines. The casein kinase II sites are boxed. The predicted protein kinase C phosphorylation sites are doubly underlined. A tyrosine kinase phosphorylation site is indicated with wave line. The P-loop site is shaded and italicized, and the N-myristoylation sites are shown with shade.

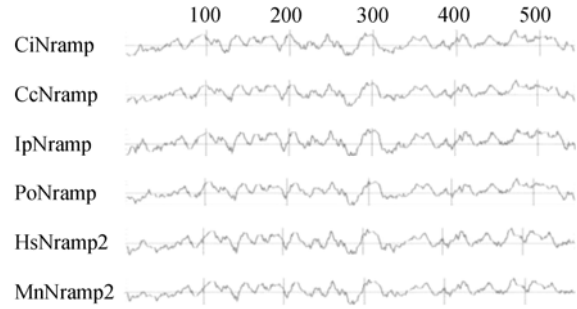


图2 几种脊椎动物Nramp蛋白的亲水性分布图(Kyte 和 Doolittle算法)

CiNramp:草鱼Nramp; CcNramp:鲤Nramp; IpNramp:斑点叉尾鲷Nramp; PoNramp:牙鲆Nramp; HsNramp2:人Nramp2; MnNramp2:小鼠Nramp2; 上面1行数字代表6个物种Nramp的氨基酸数目.

Fig. 2 Hydropathy profile conservation among selected vertebrates' Nramp proteins (Kyte and Doolittle algorithm)
CiNramp: *Ctenopharyngodon idellus* Nramp; CcNramp: *Cyprinus carpio* Nramp; IpNramp: *Ictalurus punctatus* Nramp; PoNramp: *Paralichthys olivaceus* Nramp; HsNramp2: human Nramp2; MnNramp2: mouse Nramp2. Figures above are the amino acid numbers of six Nramp proteins.

残基的差异外,在其他鱼类 Nramp 以及人和小鼠的 Nramp2 中高度保守(图 3)。同时本研究还发现位于 TM7 和 TM8 之间的 2 个 N-糖基化位点在物种间具有较高的保守性,其中靠近 TM7 的 N-糖基化位点在所比较的鱼类 Nramp 中高度保守,而靠近 TM8 的除了虹鳟 Nramp alpha 外,在所比较物种的 Nramp 中均保守;此外,从图 3 中还可以发现,在 TM7 和 TM8 区之间,所比较物种的 Nramp2 均比 Nramp1 少 1 个氨基酸残基,这一点与 Chen 等^[21]对斑点叉尾鲷Nramp 与其他物种 Nramp 氨基酸序列比对的结果是一致的。

将草鱼 Nramp 的氨基酸序列同其他鱼类 Nramp 以及哺乳类 Nramp1 和 Nramp2 的氨基酸序列进行了比对分析,并在此基础上构建了系统发生树。序列比对的结果表明,草鱼 Nramp 和鲤 Nramp、黑头呆鱼 Nramp、斑点叉尾鲷Nramp、虹鳟 Nramp alpha、虹鳟 Nramp beta、大菱鲆 Nramp、牙鲆 Nramp、真鲷 Nramp 以及鲈 Nramp 氨基酸的同源性分别为 90.2%、87.5%、83.3%、82.6%、84.3%、83.1%、83.0%、82.0%和 84.9%;和人、老鼠、狗、猪、牛、羊等哺乳类 Nramp1 的同源性在 62.5%~65.1%之间,而和人、小鼠、田鼠、

狗等哺乳类 Nramp2 的同源性在 75.1%~76.6%之间(表 2),很显然,相比哺乳类 Nramp1,草鱼 Nramp 与哺乳类 Nramp2 的同源性更高一些。系统进化分析的结果表明,草鱼 Nramp 和其他鱼类的 Nramp 聚在一起,然后鱼类的 Nramp 又和哺乳类 Nramp2 聚在一起形成 1 个分支,而哺乳类 Nramp1 则单独形成了另外一个分支,因此鱼类的 Nramp 和哺乳类 Nramp2 更为相似;与草鱼 Nramp 亲缘关系最近的是鲤 Nramp(图 4)。

表 2 草鱼 Nramp 氨基酸序列同哺乳类 Nramp 氨基酸序列的同源性分析

Tab. 2 Amino acid identity between <i>Ctenopharyngodon idellus</i> ' Nramp and mammalian's Nramps			%
物种 species	同源性 identity		
	草鱼 Nramp1 <i>C. idellus</i> ' Nramp1	草鱼 Nramp2 <i>C. idellus</i> ' Nramp2	
人 human	65.1	75.3	
鼠 mouse	63.4	75.1	
小鼠 rat	—	75.5	
狗 dog	63.6	76.6	
猪 pig	62.5	—	
牛 bison	63.6	—	
羊 sheep	63.8	—	

2.4 草鱼 Nramp 基因在组织及 CIK 细胞系中的表达分析

利用 1 对特异性引物(rt-F/rt-R)通过 RT-PCR 对 Nramp 基因在草鱼头肾、体肾、小肠、肌肉、皮肤、肝脏、鳃以及脾脏等 8 种组织中的表达进行分析,在所检测的组织中均扩增出了 1 个长度为 404 bp 的特异性片段,序列测定的结果表明,该片段为草鱼 Nramp 基因部分片段。草鱼 Nramp 基因在所检测的 8 种组织中的表达差异明显,其中在头肾和脾脏中的表达量最高,在体肾和肝脏中中等程度表达,再次是小肠和鳃,在肌肉和皮肤中的表达量最低(图 5A)。内参 β -actin 则均一地表达于各组织中。利用 RT-PCR 对 Nramp 基因在 GCRV 感染的 CIK 细胞中的表达进行了分析,结果表明,与对照组相比,在感染后的 1 h, Nramp 表达量就开始有所增加,到 3 h 表达量达到最大,24 h 后表达量又基本回落至对照组的水平(图 5B)。

草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	METERD—EDVPEESKREPA————LYSPVSP—————QDQPVS—TYFDERVPIPDNDSAKMFSFRKLWAF ^{TM1} TGPGFLMSIAYLDPCNIESDLQCGATAGFKLLWVL ^{TM2} LAATLIGLLLRQLAARLGVVTGMHLAEVRNRHYPMV	128
鲢 <i>Cyprinus carpio</i>	.K...GNAALE.S.SQ..E.....A..G.....P.RE.I.—.E.K...ED.LT.L.....S..R.....G.....C....T.	132
黑头呆鱼 <i>Pimephales promelas</i>	.K...—G..L...VQ...D.....L.....P...AI.—.E.K...ED.R.....S..K.....GS.....C....T.	142
虹鳉alpha <i>Oncorhynchus mykiss</i> alpha	.K.A.E—A.Q...EPPQVNGIQT ^{TM1} TQDQH.SI...PSSTYSGAPD.E.F.—.E.K...—E.VTQ...L.....S..K.....G.....K.C.Q..T.	143
虹鳉beta <i>Oncorhynchus mykiss</i> beta	...E—A.LL...EPPQENGVIQSTQG...ST...PAS—D.E.F.—.E.K...—E.VTQ...S..K.....G.....C....T.	151
鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	.KRGKN—KSTLKDSPQDNGVQTN—Q..SI..PASP—VA.EE.F.—.EDK.A.—ESVNQV.....S..K.....V.....C....T.	152
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	.KA.Q—G.LL...DSPQDNGVQTN—Q..SI..PASP—VA..E.F.—.E.K.H.—ENVSQV.....S..K.....G.....RR.....C....T.	149
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	.RA.Q—G.IL...DSPQDNGIETN—R..SI..PASP—VV.EE.FT—..EDK...—ESTNQV.....S..K.....L.....C....T.	151
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	.KGDKN—NSELKDSPPDNGVQTS—Q.NSI..PASP—VADEE.F.—.EDK...—ESENQI.....S..K.....L.....C....T.	138
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	.RRNK—SNCV..LSPDHNGVIQT—I..SI..S—EEQSNI.—.E.K.V.—E.VTQV.....S..V.....G.....CH.Q..T.	148
人2 human 2	.VLGPE—QKMSDD.VSGDHGESASLGNINPAY.NPSLSQSPGDSEEFYFA—..N.KIS.—EEEYSC.....S..V.....I..L.LV.....L.....CH.Q..K.	148
小鼠2 mouse2	.VLDPK—KM.DDGASGDHGESASLGAINPAY.NSSLPHSTGDSEE.FT—..KI...—EEEYSC.....S..V.....L..V.....L.....CH.Q..K.	144
人1 human 1	.TGDKG—PQRLSG.S—..GSI.SPTSPTSPGQ.PA.PRE..LS.KI...—DTKPGT..L.....F.....A..V.....W..VL...C.....KD.G..CHLY..K.	136
小鼠1 mouse1	.ISDKS—PPRLSRPS—..GSI.SLPG—PAP.PA.CRE..LS.KI...—SADQGT..L.....F.....A..V.....W..VL...C.....KD.G..CHLY..K.	132
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	PRILWLMVELATIGSDMQEVI ^{TM3} GSATAI ^{TM4} NLLSVGRIP ^{TM5} LWGGVLIT ^{TM6} ITIDTFVFLDKYGLRKLEAFFGLVIT ^{TM7} IMALSFGFEYVRVAPDQGEVLKGMFLPYCQCGGPTQLEQAVGIVGAVIMPHNIYLH ^{TM8} SALVKS ^{TM9} RSDIRANKREVKEA	276
鲢 <i>Cyprinus carpio</i>	A.....F.....Y.....N.....V.....S.....V.....N.E..K.....	280
黑头呆鱼 <i>Pimephales promelas</i>	C...F.....A.....K.....F..P...I..RYK...A.....S..AE..K.....V.....V..G..K.....	290
虹鳉alpha <i>Oncorhynchus mykiss</i> alpha	N.....C...F.....V...Y...M.R...L...H.E...A.M.....S..G..K.....	291
虹鳉beta <i>Oncorhynchus mykiss</i> beta	C...F...M.....F..T..V...Y...M.R...L...EN.DSA.M.....Q..G..K.....	299
鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	.V.....C.....T.....F..V...I..Y..L.K..L...A...V.....K..K.....	300
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	C.....A.....T.....F..V...I..Y..L.K.N.A.L...A...L.....E..K..K.....	296
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	C.....T.....F..V...I..Y..IL.K...KL.T..V..A...V.....E..K..KD.....	299
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	C.....A.....T.....F..V...I..Y..L.K...L...A..E.V.....E..R..K.....	286
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	C...F.....A.....V.....F.....VT..YQ.....A...L.V.....V.....QV.....	296
人2 human 2	.V.....I.....I.....A.....A.....F.....T..Y...T.K.S.SQ...V.S.S..RTP.I.....M.....QVN.N..Q..R..	296
小鼠2 mouse2	I.....I.....A.V.V.....A.....F.....T..Y...IT.K.S.SQ..R..V.S.P..RTP.V.....M.....QVN...Q..R..	292
人1 human 1	.TV...TI...V.....T...F.....V...F...N.....L.....T..Y...VAR.E..AL.R.L...S.P...HPE.L.....I.....E...RRADIR..	284
小鼠1 mouse1	...L...TI...V.....T...SF.....A.....V...F...N.....L.....T..Y...VAH.S..AL...LV...PQE.L.....I.....EV...TRRVD..R..	280
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	NKYYFTIESSIALV ^{TM10} SFLINVEFAVAVFAEAFY ^{TM11} GKTNMEY ^{TM12} GKQK ^{CTM} QSGSP—HSDLF ^{TM9} PA ^{TM10} NFTI ^{TM11} EVDIYKGGVVL ^{TM12} GGCFGPAALYI ^{CTM} WATGIL ^{TM10} AAGQSSTMTGTYSQGQFVMEGFLN ^{TM11} L ^{TM12} RWSR ^{CTM} FARVLL ^{TM9} TRSIATILPTLLVAVFDQYQHITGMN	423
鲢 <i>Cyprinus carpio</i>	V.....R.....SLQ..ET..A...E..A.....F.....F.....	427
黑头呆鱼 <i>Pimephales promelas</i>	T.....V.....D...I..NA...A...—T...LD.S...F.....F.LSW.....R..S..	437
虹鳉alpha <i>Oncorhynchus mykiss</i> alpha	T...I.....V.....D...I..NAM..A.D.—T...LD.SR.Q...V.....F.....	438
虹鳉beta <i>Oncorhynchus mykiss</i> beta	T...I.....V.....D...I..NA...A...—T...LD.S...L.....F.....I.....	446
鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	T...I.....V.....N.....HEF..KT...—Q..N.....V.....T...I.....	447
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	...F..T...I.....V...Q...N...AD.NES..KT...—T...L..K.....V.....L.....A.....N..G.T...I.....I.....	443
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	...F..TV...I.....V.....D...IQ.HEE..AT...—T...M..N.....V.....T...I.....	446
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	...F..T...I.....V...Q...A...IQ.NEQ..AT...—T...L..D.....V.....V.....V..V...I.....I.....	433
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	...F..C...I.....V.....N...Q...ET...—N...L..N...Q...V.....V.....F...I...T.....	443
人2 human 2	...F..C...I...I...V.S...F...BQ.VEV.TNTS...—AG...KD.S..A.....Y.....V.....K.....V.....I.....E.....	443
小鼠2 mouse2	...F..C...C...I...I...V.S...FE...KQ.VEV.KNNS...—A...SD.S..A.....Y.....V.....K.....I.....I.....E.....	439
人1 human 1	.M.FL..AT...S...I..L.VM...GQ...Q...QAAFNI..AN.SLHDYAKI..M..A.VA...Q...I..L.....L.....A.....R.....C...V...R.LRD.S.L.	432
小鼠1 mouse1	.M.FL..AT...S...I..L.VM...GQ...Q...E.AFNI..AN.SLQNYAKI..RDN.VS...Q...I..L.....L.....V..L.....A.....K.....C...V...R.LKD.S.L.	428
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	DFLNVLQSMQILPFALIPILITFTSLTSLMSDFANGLAWKISGGVILILVCAINMYFVVVVY ^{TM10} TALNSTILYVFSLSI ^{TM11} SIAYLSFVIYLW ^{TM12} RCLIALGVSR ^{CTM} LD ^{TM9} DFR—GTVQH—PPAVLID ^{CTM} EQPEFDS—	544
鲢 <i>Cyprinus carpio</i>	N.....V...G...LV.....IL...A..L.....S..Y...M.....	548
黑头呆鱼 <i>Pimephales promelas</i>	L.....N.....V.....L.....V.....A..L.....I.....T...S.RF.....	546
虹鳉alpha <i>Oncorhynchus mykiss</i> alpha	I..N.....V...G...V.....H.....S.S.VA...LAGFLC...C...G...H.....C...VSCLASRLTG ^{TM10} NDIYLLK ^{TM11} DMDS.TM ^{TM12} VERLEEHHGGVINS ^{CTM} DTVRS	585
虹鳉beta <i>Oncorhynchus mykiss</i> beta	I..D.....V...G...V.....S...VA...LVA.LC...C...A..Q...C...VSCLGNR.SNNCH..F.E...AY.T.....	558
鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	I..N.....V.....VT.....VL...LAA.F...C...G...H..V...C...G—SR.SN—R...F.E.PS.Y.....	554
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	N.....V.....IV.....VL...LAA.L.V...C...G...A.H..V...C...G—SR.SN—R...E.PS.Y.....	554
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	I..N.....V.....IV.....VL...LA.L.V...C...G...A.H..V...V...S—SR.RK—R..L...E..S.Y.....	554
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	I..D...WV...S.V.....S...VL...LA..L...C...V..A.H.....C...S—SR.RK—R...E..S.Y.....	555
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	P.I..N...F...G...LT..L...L...K.VL...AA.L...C...A.....CV.VC...R.RN...T...E..L.Y.....	550
人2 human 2	L...RPV...G.R.A...I.V.II.S...RD.GHVA...VA ^{TM10} AV.V...G..F..G.Q...M.F..CGHTCHLGLTAQ.ELYLLNTMDA..LVSR	561
小鼠2 mouse2	L...L...RPV...E.S...IG.R.A...I.V.I.S...QE.GHVA...VA ^{TM10} AV.V...T..F..G.Q...L.F..CGRSYRLGLTAQ.ELYLLNTVDA..VYSR	561
人1 human 1	.L...LL...VL...MPT..QE...LN.VVTSSIMVL...L...S.LPS.PHPAYGLAA.LAA...GLST...T..CL.H.ATP.AHS—SHH.FLYGL.EED.KGET.G	550
小鼠1 mouse1	.L...LL...VL...MPAV.QE...RMS.ATTS ^{TM10} CIMAL...L...IS.LPS.PHPAYGLVA.FA.G...GLTA..A.T.C..H.ATP.AHS—SHK.FLYGLPNE..GGVQSG	548

图3 草鱼和其他物种Nramp氨基酸序列比对分析

草鱼Nramp的12个TM区及CTM区以下划线标出；保守的N-糖基化位点以方框标出；“.”表示与草鱼氨基酸相同的位点；“—”表示此位点为空格。

Fig. 3 Alignment of *Nramp*'s amino acid sequences between *Ctenopharyngodon idellus* and other vertebrates

Putative transmembrane regions are underlined and numbered with TM1–12. The consensus transport motif (CTM) is underlined. Conserved N-glycosylation sites are marked with boxes. Identical sites are indicated by dots(.), and gaps are shown by dashes (—).

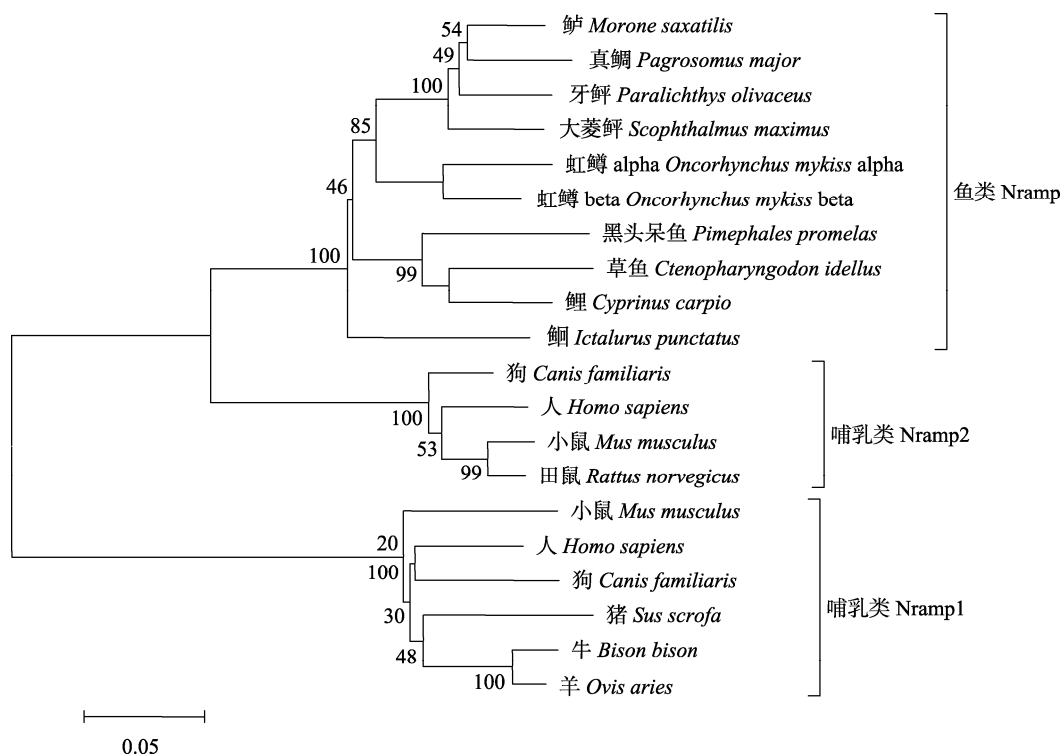


图4 基于草鱼和其他物种Nramp氨基酸序列构建的系统发生树(用Bootstrap法进行1 000次评估)

Fig. 4 Construction of phylogenetic tree based on Nramp amino acids of grass carp and other species (the parameter was evaluated 1 000 degree via method of Bootstrap)

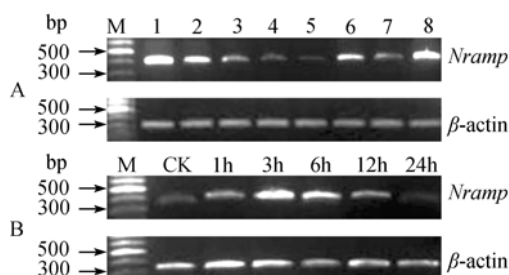


图5 草鱼Nramp基因在正常组织(A)以及GCRV感染1~24 h后的CIK细胞系中(B)的表达分析(β -actin为内参)

(A) M:100 bp分子量标准; 1:头肾; 2:体肾; 3:小肠; 4:肌肉; 5:皮肤; 6:肝脏; 7:鳃; 8:脾脏. (B) M:100 bp分子量标准; CK:正常的CIK培养细胞作对照; 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h分别指GCRV感染CIK后的1 h、3 h、6 h、12 h和24 h.

Fig. 5 RT-PCR analysis of Nramp gene expression in various normal tissues(A)and in CIK cell line(B) from 1 h to 24 h after infection with GCRV(β -actin was used as control)

(A) M: 100 bp marker; 1: head kidney; 2: kidney; 3: intestine; 4: muscle; 5: skin; 6: liver; 7: gill; 8: spleen. (B) M: 100 bp marker; 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h indicate the time after GCRV infection.

3 讨论

鉴于 Nramp 基因在哺乳类动物抵抗病原菌侵

染以及控制金属离子的转运吸收等过程中所起的重要作用, 为了解该基因在鱼类免疫系统中的功能和作用, 本研究从草鱼肝脏中克隆得到了 Nramp 基因的全长 cDNA。与已报道的脊椎动物 Nramp 氨基酸序列比对分析结果表明, 草鱼 Nramp 同其他鱼类 Nramp 的同源性在 82.0%~90.2%之间, 与哺乳类 Nramp2 的同源性(75.1%~76.6%)要高于与哺乳类 Nramp1 的同源性(62.5%~65.1%); 系统进化分析的结果也表明鱼类的 Nramp 和哺乳类 Nramp2 聚在一起, 因此草鱼的 Nramp 基因和哺乳类 Nramp2 基因比较相似, 这和其他鱼类 Nramp 分析中得到的结论是一致的^[15, 17-21]。

草鱼 Nramp 蛋白含有 12 个 TM, 1 个 CTM, 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 4 个 N-糖基化位点, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点以及 13 个 N-豆蔻酰化位点等, 这些 Nramp 的特征序列在人^[5,7]、鼠^[6,34]、虹鳟^[15]、鲤^[20]、牙鲆^[18]以及大菱鲆^[19]中均有相似的报道。值得一提

的是, 相比其他鱼类的 *Nramp*, 本研究发现草鱼 *Nramp* 基因具有 2 个独特的特征位点, 其中 1 个是位于 5'UTR 和 3'UTR 两端的 2 个 IRE 位点 (CNNNNNCAGTG)。有研究表明, 5'UTR 和 3'UTR 端 IRE 位点和细胞中铁的代谢有关^[35], 在哺乳动物 *Nramp2* 中, 该位点和铁的转运吸收相关^[13,36]; 在已经报道的鱼类的 *Nramp* 基因中, 仅在鲤的 3'UTR 发现有 1 个 IRE 位点^[20], 在其他鱼类 *Nramp* 中均未发现该位点^[18-19,21]。Saeij 等^[20]推测, 在鲤 *Nramp* 中, 该位点可能通过和铁调控蛋白结合来调节鲤 *Nramp* 的 mRNA 水平, 当铁调控蛋白和 3'UTR 的 IRE 结合时可以保护 RNA 免受降解, 当和 5'UTR 结合时可以阻止 RNA 的翻译。至于鱼类 *Nramp* 基因中的 IRE 位点是否和其在哺乳类 *Nramp2* 中一样起着同样的作用, 还需要进一步研究。草鱼 *Nramp* 基因的另一个独特的特征位点是位于编码区的 P-loop 结构域, 该位点与蛋白质和 GTP/ATP 的结合有关^[33], 但在已克隆的 *Nramp* 基因中尚未见到该位点的相关报道。

Nramp1 在哺乳动物中呈组织特异性表达, 如人的 *Nramp1* 可以在脾脏、肝脏和肾中检测到表达^[37], 而小鼠的 *Nramp1* 则主要在脾脏中表达, 肝脏中表达量相对较少^[4]。而 *Nramp2* 在肝脏、肾脏、脾脏、小肠、心脏和肌肉等组织中均表达^[6]。本研究发现草鱼 *Nramp* 基因在头肾和脾脏中的表达量最高; 在体肾和肝脏中其次, 呈中度表达; 再次是小肠和鳃; 在肌肉和皮肤中的表达量最低。草鱼 *Nramp* 基因在器官中这种组成型表达方式与哺乳类 *Nramp2* 的表达方式比较相似^[6, 36]; 另外, 在鲤、斑点叉尾鲷、鲈以及大菱鲆中也观察到了 *Nramp* 基因在头肾和脾脏中的高表达, 这种表达量变化和头肾、脾脏等是鱼类的主要免疫器官是一致的。

细胞系作为一种稳定的模型已被越来越广泛地应用于功能基因的表达、鉴定和调控研究中。在哺乳动物中, 曾用细胞系来研究 *Nramp* 基因的功能和调控^[38-39], 在鱼类中也被用来研究抗病毒相关的功能基因的鉴定^[40-41]以及免疫基因的表达等^[42]。但关于 *Nramp* 与病毒之间的关系研究尚

未见报道, 本研究首次利用 GCRV 感染后的 CIK 细胞系对草鱼 *Nramp* 基因表达量的时序变化进行了初步研究, 结果表明, GCRV 感染 CIK 细胞后, 其 *Nramp* 表达量增加, 且在感染后 3 h *Nramp* 表达量达到最大, 24 h 后回落至正常 CIK 细胞中的表达水平。由此推测, 起初由于 GCRV 的感染诱导了细胞内免疫相关基因表达量的增加, 而后随着细胞病变效应的出现和细胞的生长受到限制等, 导致基因表达量的回落, 类似的现象在小鼠^[43]及大菱鲆^[19]中有过报道。关于鱼类免疫基因与病毒感染间的关系已有相关研究, 张义兵等^[40]从灭活 GCRV 诱导的鲫囊胚细胞系(CAB)差减文库中筛选到一些差异表达的重要免疫相关基因, 如 *TLR3*(toll-like receptor3)、*IL8* 以及泛素基因等。Kurobe 等^[42]从弹状病毒(HRV)感染的牙鲆肾脏细胞中观察到 MHC class II、*TLR2* 等免疫基因表达量的变化, 在 HRV 感染后 3 h 表达量达到最大, 6 h 后回到正常表达水平。本研究结果与以上研究结论有相似之处, 说明本研究所用的 CIK 细胞系有可能成为研究草鱼 *Nramp* 等免疫相关基因表达的良好细胞模型。关于草鱼 *Nramp* 基因与草鱼病毒感染之间的相互作用机理以及鱼体感染病毒后 *Nramp* 基因在免疫系统所起的作用还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] Skamene E, Pietrangeli C E. Genetics of the immune response to infectious pathogens [J]. Curr Opin Immunol, 1991, 3: 511-517.
- [2] Bairoch A. The prosite dictionary of sites and patterns in proteins, its current status [J]. Nucl Acids Res, 1993, 21: 3097-3103.
- [3] Blackwell J M, Barton C H, White J K, et al. Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the Lsh/Ity/Bcg gene story continues [J]. Immunol Lett, 1994, 43: 99-107.
- [4] 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.
- [5] Kishi F. Isolation and characterization of human *Nramp* cDNA [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 204: 1074-1080.
- [6] Grunheid S, Cellier M, Vidal S, et al. Identification and

- characterization of a second mouse Nramp gene [J]. *Genomics*, 1995, 25: 514–525.
- [7] Kishi F, Tabuchi M. Complete nucleotide sequence of human Nramp2 cDNA [J]. *Mol Immunol* 1997, 34: 839–842.
- [8] Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* in mice [J]. *J Immunol*, 1981, 127: 2417–2421.
- [9] 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.
- [10] Govoni G, Vidal S, Gauthier S, et al. The Bcg/Ity/Lsh locus: genetic transfer of resistance to infection in C57BL/6J mice transgenic for Nramp1 Gly169 allele [J]. *Infect Immun*, 1996, 64: 2923–2929.
- [11] 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.
- [12] Feng J, Li Y, Hashad M, et al. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp 1) gene [J]. *Genome Res*, 1996, 6: 956–964.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Dorschner M O, Phillips R B. Comparative analysis of two Nramp loci from rainbow trout [J]. *DNA Cell Biol*, 1999, 18: 573–583.
- [16] Burge E J, Gauthier D T, Ottinger C A, et al. Mycobacterium-inducible Nramp in striped bass (*Morone saxatilis*) [J]. *Infect Immun*, 2004, 72: 1626–1636.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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 (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 147B: 29–37.
- [20] Saeij J P J, Wiegertjes G F, Stet R J M. Identification and characterization of a fish natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) cDNA [J]. *Immunogenetics*, 1999, 50: 60–66.
- [21] 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.
- [22] 祖国掌, 余为一, 李瑾年, 等. 草鱼的几种细菌性疾病及其致病原因的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(3): 290–293.
- [23] 李军, 王铁辉, 陆仁后, 等. 草鱼出血病病毒的研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4): 445–453.
- [24] 鲁翠云, 曹顶臣, 孙效文, 等. 微卫星分子标记辅助镜鲤家系构建[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 893–901.
- [25] Xu T J, Chen S L, Ji X S, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 213–221.
- [26] 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 153–159.
- [27] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites [J]. *Protein Eng*, 1997, 10: 1–6.
- [28] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathy of a protein [J]. *J Mol Biol*, 1982, 157: 105–132.
- [29] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 4673–4680.
- [30] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150–163.
- [31] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406–425.
- [32] Casey J L, Hentze M W, Koeller D M, et al. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation [J]. *Science*, 1988, 240: 924–928.
- [33] Saraste M, Sibbald P R, Wittinghofer A. The P-loop a common motif in ATP- and GTP-binding proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 1990, 15: 430–434.
- [34] Govoni G, Gauthier S, Billia F, et al. Cell specific and inducible Nramp1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo[J]. *J Leukocyte Biol*, 1997, 62: 277–286.

- [35] Klausner R D, Rouault T A, Harford J B. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism [J]. Cell, 1993, 72: 19–28.
- [36] Forbes J R, Gros P. Divalent metal transport by Nramp proteins at the interface of host: parasite interactions [J]. Trends Immunol, 2001, 9: 397–403.
- [37] 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 Leukocyte Biol, 1997, 61: 96–105.
- [38] 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 Immun, 2001, 69: 3110–3119.
- [39] Kishi F, Tabuchi M. Human natural resistance-associated macrophage protein 2: gene cloning and protein identification [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251: 775–783.
- [40] 张义兵, 张奇亚, 徐德全, 等. 从灭活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因[J]. 科学通报, 2003, 48(5): 457–463.
- [41] Chen Y D, Zhang Y B, Zhu R, et al. Inductive expression and characteristic analysis of *Paralichthys olivaceus* pigment epithelium-derived factor in a virally infected cell line [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335: 799–809.
- [42] Kurobe T, Yasuike M, Kimura T, et al. Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays [J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29: 515–523.
- [43] Atkinson P G, Blackwell J M, Barton C H. Nramp1 locus encodes a 65 kDa interferon- γ -inducible protein in murine macrophages [J]. Biochem J, 1997, 325: 779–786.

Molecular cloning, characterization and expression of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) gene cDNA from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

FAN Yuding^{1,2}, XU Jin^{1,3}, LUO Xiaosong¹, ZHOU Yong³, XIAO Yi³, ZENG Lingbing^{1,2,3}

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Natural resistance associated macrophage protein (Nramp) family is a novel family of functional related proteins with innate resistance to intracellular parasites in mammals, which has the capacity of enhancing macrophages that are meant to kill pathogens. However, few reports are available about the structure and function of *Nramp* in lower vertebrates such as teleosts. In this study, cDNA of *Nramp* gene was amplified from liver of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA of *Nramp* gene was 3 158 bp, including a 155 bp 5' terminal UTR, a 1 368 bp 3' terminal UTR and a 1 635 bp open reading frame encoding a protein with 554 amino acid residues, which contained the signature features of the Nramp protein family: 12 transmembrane (TM) domains, a consensus transport motif (CTM) with 20 amino acid residues between the transmembrane domains 8 and 9. The deduced amino acid sequence of grass carp *Nramp* exhibited about 62.5%–90.2% homology with 16 other vertebrate *Nramp* sequences. Compared with the other fish's *Nramps*, the unique feature of grass carp Nramp was the presence of two iron-responsive regulatory-protein-binding sites (IRE) in 3'UTR and 5'UTR. Phylogenetic analysis revealed that the grass carp Nramp was clustered with other fish Nramps and was closer to Nramp2 of mammals. RT-PCR results of grass carp Nramp transcripts in different tissues indicated that the grass carp *Nramp* transcripts were highly abundant in head kidney and spleen and low in muscle and skin. The grass carp kidney cells (CIK) challenged with the grass carp reovirus (GCRV) could evidently elevate *Nramp* mRNA levels in cell cultures. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 38–47]

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Nramp* gene; cDNA; expression; RT-PCR; RACE

Corresponding author: ZENG Lingbing. E-mail: zenglingbing@gmail.com