

# 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因 克隆与表达分析及 SNP 筛选\*

邢贺飞<sup>1,2,3</sup> 高峰涛<sup>1,2,4</sup> 张永珍<sup>1,2,3</sup> 董忠典<sup>1,2,4</sup> 陈松林<sup>1,2①</sup>

1. 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;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

**摘要** 天然抗性相关巨噬细胞蛋白(Natural resistance-associated macrophage protein, *Nramp*)属于膜整合转运蛋白, 具有抑制胞内寄生菌侵染、调节巨噬细胞的抗菌活性等作用。本研究对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因进行了克隆和表达分析, 并对其与抗鳃弧菌感染相关的单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)位点进行了筛选。该基因 cDNA 序列全长 3717 bp, 其中开放阅读框(Open reading frame, ORF)1677 bp, 所编码蛋白含有 558 个氨基酸, 该蛋白具有 *Nramp* 家族的典型特征, 包括 10 个跨膜区(Transmembrane, TM)、1 个由 20 个氨基酸残基组成的胞质内转运蛋白特征结构域(Consensus Transport Motif, CTM)。半滑舌鳎 *Nramp* 的 ORF 末端有 1 个类似于脊椎动物 *Nramp2* 中的铁反应控制蛋白结合位点(Iron-responsive regulatory protein-binding site, IRE)。半滑舌鳎 *Nramp* 与其他 14 个物种的 *Nramp* 氨基酸序列同源性在 63%–91%之间, 系统进化分析表明, 半滑舌鳎 *Nramp* 和所有鱼类 *Nramp* 聚集为一簇, 与其他物种 *Nramp2* 的亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 分析显示, *Nramp* 基因在半滑舌鳎脾脏和肾脏中的表达量最高, 而在肌肉和性腺中的表达量最低; 在哈维氏弧菌感染的半滑舌鳎肾脏、脾脏和肝脏中表达量呈升高趋势, 而在鳃中则表现为下调趋势。利用直接测序法检测感染鳃弧菌后同一家系的 233 个个体(抗病个体 165 个, 感病个体 68 个), 共检测到 15 个 SNP 位点, 对其中 3 个 SNP 位点即 SNP-g.3113(T→C)、SNP-g.3125(A→G)和 SNP-g.3164(A→T)进行测序分型后发现, SNP-g.3125(A→G)的等位基因(G)频率和基因型(GG)频率与半滑舌鳎抗鳃弧菌疾病呈极显著相关( $P < 0.01$ )。研究结果表明, *Nramp* 基因不同基因型对半滑舌鳎的抗病能力有着极其重要的影响, SNP-g.3125(A→G)可作为潜在的抗性遗传标记位点。本研究将为半滑舌鳎抗性品系培育提供技术支持。

**关键词** 半滑舌鳎; 天然抗性相关巨噬细胞蛋白(*Nramp*); 基因克隆; RT-PCR; 单核苷酸多态性(SNP)  
**中图分类号** S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0116-12

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)隶属于鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*), 主要分布在我国黄、渤海海域, 是暖温性近海大型底栖鱼类, 具有广温、广盐和适应环境多变的特点, 其生长速度快、肉味鲜美、口感爽滑、出肉率高, 深受广大消费者喜爱(邓景耀等, 1988)。

近年来, 高密度、集约化的养殖模式以及环境污染等原因, 致使半滑舌鳎的腹水、烂鳍、烂尾等细菌性感染问题日益突出, 严重制约了半滑舌鳎工厂化养殖产业的发展。因此, 开展半滑舌鳎抗病相关基因的分析研究, 筛选其抗病相关的分子标记, 对于半滑舌鳎抗性品系培育以及该养殖产业的健康可持续发展具有

\* 国家自然科学基金项目(31530078)和“山东省泰山学者攀登计划项目”共同资助。邢贺飞, E-mail: xinghf710@126.com

① 通讯作者: 陈松林, 研究员, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-03-11, 收修改稿日期: 2015-04-15

十分重要的意义。

天然抗性相关巨噬细胞蛋白(*Nramp*)属于膜整合转运蛋白,具有抑制胞内寄生菌感染、调节巨噬细胞的抗菌活性等作用(Blackwell *et al*, 1995),在物种间保持着高度的保守性(Skamene *et al*, 1991),由于其编码蛋白具有转运质子和二价阳离子的功能,因此,又将其称为溶质转运家族 11 成员 1 (Solution carrier family 11 member 1, *SLC11A1*)(Blackwell *et al*, 1996)。该家族一般具有 10–12 个典型的跨膜结构,含有 1 个胞质内转运蛋白特征结构域,以及 1–2 个糖基化的胞质外环状结构(Bairoch, 1993)。*Nramp* 基因最早由 Vidal 等(1993)在近交小鼠的研究中发现,该基因可影响宿主对杜氏利什曼原虫、分支杆菌、伤寒沙门氏菌等胞内寄生菌的早期免疫反应。目前,已在人和小鼠等哺乳动物中发现两种天然抗性相关巨噬细胞蛋白即 *Nramp1* 和 *Nramp2*(Vidal *et al*, 1993; Kishi, 1994; Grunheid *et al*, 1995; Kishi *et al*, 1997)。*Nramp1* 是一个较为保守的基因,主要在网状内皮细胞器官如吞噬细胞、脾脏、肝脏、外周血白细胞中特异表达(Cellier *et al*, 1994; Feng *et al*, 1996),而 *Nramp2* 则在绝大多数组织和细胞中均表达(Grunheid *et al*, 1995),在哺乳动物体内对铁的吸收转运和重新利用起到决定性的调控作用(Gunshin *et al*, 1997; Fleming *et al*, 1998)。目前,鱼类中已在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Dorschner *et al*, 1999)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(Saeij *et al*, 1999)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(Chen *et al*, 2002)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)(Burge *et al*, 2004)、真鲷(*Pagrosomus major*)(Chen *et al*, 2004)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(Chen *et al*, 2006)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Chen *et al*, 2007)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(范玉顶等, 2011)等物种中进行了 *Nramp* 基因克隆,并对该基因的特征序列及病原菌刺激后的组织和细胞系表达进行了研究,但有关 *Nramp* 基因多态性与疾病的关联分析报道较少。本研究对半滑舌鳎 *Nramp* 基因进行了克隆、序列比对、组织表达分析,并首次在鱼类中进行 *Nramp* 基因多态性与抗病分子标记的筛选,为半滑舌鳎抗性家系的分子标记辅助育种提供了技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康 1 龄半滑舌鳎,体重为(145.01±60.02) g,体长为(27.68±5.53) cm,来自山东省海阳市黄海水产有限公司,于实验室暂养 7 d 无异常后使用。取半滑舌

鳎的肝、脾、肾、肠、鳃、血、脑、心、皮肤、肌肉、性腺等组织,迅速放入液氮中,−80℃保存备用。半滑舌鳎感染鳃弧菌家系(1 龄)由本实验室 2012 年于山东省昌邑市三新苗种研究所建立。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)菌种由本实验室保存。

### 1.2 基因组 DNA 和总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用常规的酚-氯仿法(Sambrook *et al*, 2001)提取基因组 DNA,双蒸水溶解后,利用紫外分光光度计(Biophotometer, Eppendorf)测定 DNA 浓度,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,−20℃保存备用;利用总 RNA 极速抽提试剂盒(上海飞捷生物有限公司)提取各样品总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性;用 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA 链,−20℃保存备用。

### 1.3 引物设计及 PCR 扩增

提取半滑舌鳎脾脏中的总 RNA,并反转录 cDNA (TaKaRa),根据本实验室半滑舌鳎转录组测序得到 *Nramp* 转录本信息合成引物 *Nramp-F/Nramp-R*(表 1),以半滑舌鳎脾脏 cDNA 为模板,经 PCR 扩增、克隆、测序进行序列验证,根据验证无误后的基因片段序列设计 4 条特异性引物(表 1),分别进行 5' RACE 和 3' RACE 反应,获得的片段经过克隆、测序拼接后,得到 cDNA 全长[具体方法参见 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)说明书]。

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 Primer sequence (5'-3')
<i>Nramp-F</i>	CTGTGCCATAGCCCTCAAC
<i>Nramp-R</i>	AGTGCCAAACCAGGTAGCC
$\beta$ -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA
$\beta$ -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC
RT-F	ATCGCTCTCTTCATCTCATTCTC
RT-R	CACCTCCAGTGTGCCGTTGT
3' F	CTGACTTTTACCAGCCTGACCTCTA
3' Fn	TGCCCTCCTGTCCTTAGCCTATCTG
5' F	CCTGGTCTGGCTTACAAGGACATAC
5' Fn	CAAAGGTGTCGGTGATGGTGATGAG
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC
<i>Nramp-GF</i>	TAACAAACCGCTCACCTTCTG
<i>Nramp-GR</i>	CGACTATTCCCACCGCCT

实时荧光定量 PCR: 以  $\beta$ -actin(KF932267)为内参, 用基因特异性引物 RT-F 和 RT-R 检测哈维氏弧菌感染前后, 鱼的不同组织在不同时间的 *Nramp* 表达, 实验样本重复数为 5(具体方法参见 TaKaRa 定量试剂盒)。

#### 1.4 目的片段纯化、克隆及测序

克隆 *Nramp* 基因的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段切胶回收[具体方法参照 Gel Extraction Kit(OMEGA)试剂盒说明书]。将回收产物与 pMD-18T 载体(TaKaRa)按摩尔数 5:1 的比例混合, 加入等体积的 Solution I 于 16℃ 连接, 取连接产物 10  $\mu$ l 转化至 TOP10 大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞, 菌液 PCR 鉴定出阳性克隆后, 送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

用于筛选 *Nramp* 基因 SNP 的 PCR 产物, 取 5  $\mu$ l 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将条带清晰单一的 PCR 产物直接送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

#### 1.5 序列分析和数据统计

利用 NCBI 网站 BLAST 工具对测序后拼接结果进行同源性比对; 用 Signal P(Nielsen *et al.*, 1997)分析信号肽序列; 利用 ScanProsite 在线服务器(<http://prosite.expasy.org/scanprosite>)分析蛋白的二级结构; 用 DNASTAR 5.0 软件分析 cDNA 序列和开放阅读框; 用 Clustal W 软件(Kyte *et al.*, 1982)进行多重序列比对; 利用 MEGA 4.0(Tamura *et al.*, 2007)中的邻位相联法(Neighbor-Joining, NJ)(Saitou *et al.*, 1987)构建系统进化树; 采用 Kyte and Doolittle 算法(Kyte *et al.*, 1982), 通过 ProtScale 在线工具(<http://web.expasy.org/protscale>)分析蛋白的亲水性特征; 运用 PopGene 32 分析基因型频率、等位基因频率、Hardy-Weinberg 平衡检验等; 利用 SPSS 17.0 和 SAS(Version 9.1)软件对 SNP 位点与性状关联性进行卡方检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 半滑舌鳎 *Nramp* 基因全长 cDNA 的克隆

利用引物 *Nramp*-F/*Nramp*-R, 以半滑舌鳎脾脏 cDNA 为模板, PCR 扩增得到长度为 1085 bp 的目的条带, 经测序及 BLAST 比对分析, 确定该条带为 *Nramp* 基因片段; 根据此片段设计合成 4 条特异性引物进行 RACE 扩增, 分别得到 5' RACE 772 bp 和 3' RACE 2068 bp。用软件 DNASTAR 拼接得到半滑舌鳎 *Nramp* 基因全长 cDNA 序列为 3717 bp (GenBank 序列号: KP878556)。半滑舌鳎 *Nramp* 全长 cDNA 由

1677 bp 的开放阅读框(ORF)、较短的 172 bp 5'末端非翻译区(Untranslated Regions, UTR)和一个相对较长的 1868 bp 的 3' UTR 组成。3'末端含有 1 个典型的加尾信号 AATAAA 和 30 bp 的 Poly(A)尾; 此外, 在 ORF 末端上发现了 1 个铁反应控制蛋白结合位点(IRE)的特征序列(CNNNNNCAGTG)(Casey *et al.*, 1988)(图 1)。

### 2.2 半滑舌鳎 *Nramp* 蛋白的结构分析

根据得到的半滑舌鳎 *Nramp* 基因 cDNA 序列推导其相应的氨基酸序列, 结果分析显示, 1677 bp 的 ORF 序列编码 1 个含 558 个氨基酸的蛋白, 预测相对分子量为 61.9 kDa, 等电点为 4.95。利用 ScanProsite 分析该蛋白的二级结构(图 1), 发现该蛋白具有 *Nramp* 家族的典型特征: 10 个跨膜区(TM), 1 个由 20 个氨基酸残基组成的、高度保守的胞质内转运结构域(CTM)介于 TM6 和 TM7 之间, 3 个潜在的 N-糖基化作用位点(N-X-S/T-X), 且均位于 TM5 和 TM6 之间, 两个蛋白激酶 C 磷酸化作用位点(S/T-X-R/K), 分别位于 TM1 之前的 N 端和 TM10 之后的 C 端; 该蛋白还含有 1 个位于 TM4 和 TM5 之间的酪氨酸激酶磷酸化作用位点(R/K-X-X-X-D/E-X-X-X-Y), 13 个 N-豆蔻酰化作用位点(G-[EDRKHPYFW]-X-X-[STAGCN]-P)以及 6 个酪氨酸激酶 II 磷酸化作用位点(S/T-X-X-D/E)(图 1)。从蛋白的氨基酸组成上看, Leu、Val、Ile、Ala、Phe、Pro、Met 以及 Trp 等非极性氨基酸占 52.6%, 表明该蛋白具有较强的疏水性, 通过 ProScale 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* 的亲水性分布图与小鼠和人 *Nramp2* 几乎一致, 半滑舌鳎 *Nramp* 与牙鲆、大菱鲆、斑点叉尾鲷等鱼类的 *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

利用 Clustal W 软件对半滑舌鳎 *Nramp* 的氨基酸序列同人、小鼠、牛、绵羊、原鸡及其他鱼类 *Nramp* 氨基酸序列进行了比对分析(图 3), 发现所比对物种的氨基酸序列在 CTM 和 TM 区均相对保守, 尤其是 TM4 区, 所有鱼类中 *Nramp* 完全保守, 和其他物种 *Nramp* 也只有 1 个氨基酸的差异; 鱼类的 *Nramp* 在 TM1、TM2、TM6、TM8 区氨基酸的保守性要显著高于 TM3、TM5、TM7、TM9、TM10 区。在 CTM 区, 除小鼠、人 1、绵羊和野猪中有 1 个氨基酸残基(A)的差异外, 在其他的鱼类、两栖类和哺乳类 *Nramp* 中高度保守(图 3)。此外, 位于 TM5 和 TM6 之间的两个 N-糖基化作用位点在所比较的物种间保守性较高, 其中, 靠近 TM5 区的 N-糖基化作用位点在所有



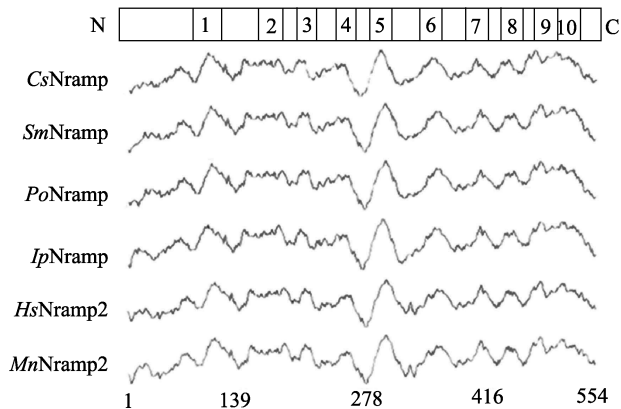


图 2 几种脊椎动物 Nramp 蛋白的亲水性分布 (Kyte 和 Doolittle 算法)

Fig.2 Hydropathy profile conservation among selected vertebrates' Nramp proteins (Kyte and Doolittle algorithm)

CsNramp: 半滑舌鲷 Nramp; SmNramp: 大菱鲆 Nramp; PoNramp: 牙鲆 Nramp; IpNramp: 斑点叉尾鲷 Nramp; HsNramp2: 人 Nramp2; MnNramp2: 小鼠 Nramp2; 上面一行数字代表半滑舌鲷 Nramp 基因的跨膜区; 下面一行数字代表 6 个物种 Nramp 的氨基酸数目

CsNramp: *C. semilaevis* Nramp; SmNramp: *Scophthalmus maximus* Nramp; PoNramp: *Paralichthys olivaceus* Nramp; IpNramp: *Ictalurus punctatus* Nramp; HsNramp2: *Homo sapiens* Nramp2; MnNramp2: *Mus musculus* Nramp2. Numbers above are the TMs of CsNramp. Numbers below are the amino acid numbers of six Nramp proteins

鱼类 Nramp 中高度保守, 而接近于 TM6 区的, 除虹鳟 Nramp alpha 外, 在所比较的其他物种间均表现为高度保守。同时本研究还发现, 位于 TM5 和 TM6 之间, 所比较物种的 Nramp1 均比 Nramp2 多 1 个氨基酸残基, 这与草鲤鱼和斑点叉尾鲷 Nramp 与其他物种 Nramp 氨基酸序列比对结果是一致的 (Chen *et al.*, 2002; 范玉顶等, 2011)。

将半滑舌鲷 Nramp 的氨基酸序列与其他物种的 Nramp 氨基酸序列进行了比对分析, 并在此基础上构建了系统进化树 (图 4)。系统进化树的分析结果表明, 半滑舌鲷 Nramp 和其他鱼类的 Nramp 聚为一簇, 又和鸟类与哺乳类 Nramp2 聚在一起形成一个分支, 而哺乳类 Nramp1 则单独构成另一个分支, 由此可知鱼类的 Nramp 与哺乳类和鸟类的 Nramp2 更为类似; 与半滑舌鲷 Nramp 亲缘关系最近的是大菱鲆和牙鲆。

#### 2.4 半滑舌鲷 Nramp 基因在正常组织及感染后组织中的表达分析

对 Nramp 基因在半滑舌鲷的肝脏、脾脏、头肾、肠、鳃、血液、脑、心脏、皮肤、肌肉、性腺等 11 种组织进行实时荧光定量 PCR 表达分析, 发现在所

检测的 11 种组织中 Nramp 基因表达量差异明显, 脾脏和肾脏中的表达量最高, 其次是肝脏、皮肤、血液、鳃、肠、心脏和脑, 而肌肉和性腺中的表达量最低 (图 5)。利用实时荧光定量 PCR 对哈维氏弧菌感染后半滑舌鲷不同组织 Nramp 基因表达量进行了分析, 结果显示, 与 PBS 对照组相比, 感染半滑舌鲷的脾脏、肾脏和肝脏中 Nramp 基因表达量呈升高趋势, 其中, 脾脏和肝脏均在感染哈维氏弧菌后 24 h 表达量最高 (图 6、图 7), 而在肾脏中则是 6 h 达到最大值, 96 h 后表达量基本又回落至对照组的水平 (图 8), 在鳃中则呈先降低后恢复至正常表达水平的趋势 (图 9)。

#### 2.5 半滑舌鲷 Nramp 基因抗病分子标记 SNP 筛选

利用直接测序法检测分析, 在 1402 bp Nramp 序列中, 共检测到 15 个 SNP 位点, 对其中位于第 2 内含子的 3 个 SNP [SNP-g.3113(T→C)、SNP-g.3125(A→G) 和 SNP-g.3164(A→T)] 位点成功测序分型。对所分型的 SNP 位点的基因型频率与等位基因频率记录并进行哈德温伯格平衡检验, 统计结果见表 2; 用软件 SPSS 17.0 和 SAS (Version 9.1) 对其进行性状关联分析, 等位基因频率和基因型频率在抗性组及易感组中的卡方检验结果见表 3, 其中, SNP-g.3125(A→G) 的等位基因频率和基因型频率与半滑舌鲷对于鳃弧菌的抗性显著相关 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

本研究克隆得到了半滑舌鲷 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, 半滑舌鲷 Nramp 与其他鱼类 Nramp 的同源性在 83%–91% 之间, 与其他脊椎动物 Nramp2 的同源性 (74%–78%) 要明显高于与 Nramp1 的同源性 (63%–66%); 系统进化分析的结果也进一步表明, 鱼类的 Nramp 与其他脊椎动物 Nramp2 聚在一起, 因此, 半滑舌鲷 Nramp 基因与其他脊椎动物的 Nramp2 基因更为相似, 这与在其他鱼类中 Nramp 基因分析得到的结论是一致的 (Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004, 2006; Dorschner *et al.*, 1999; Saeij *et al.*, 1999)。

半滑舌鲷 Nramp 蛋白含有 10 个 TM、1 个 CTM、6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、13 个 N-豆蔻酰化位点、两个蛋白激酶 C 磷酸化位点、3 个 N-糖基化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点等, 这与人 (Kishi, 1994; Kishi *et al.*, 1997)、小鼠 (Grunheid *et al.*, 1995; Govoni *et al.*, 1997)、鲤 (Saeij *et al.*, 1999)、斑点叉尾鲷 (Chen *et al.*, 2002)、虹鳟 (Chen *et al.*, 2004)、牙鲆 (Chen *et al.*, 2006)、大菱鲆 (Chen *et al.*, 2007) 以及草鱼 (范玉顶等, 2011) 序

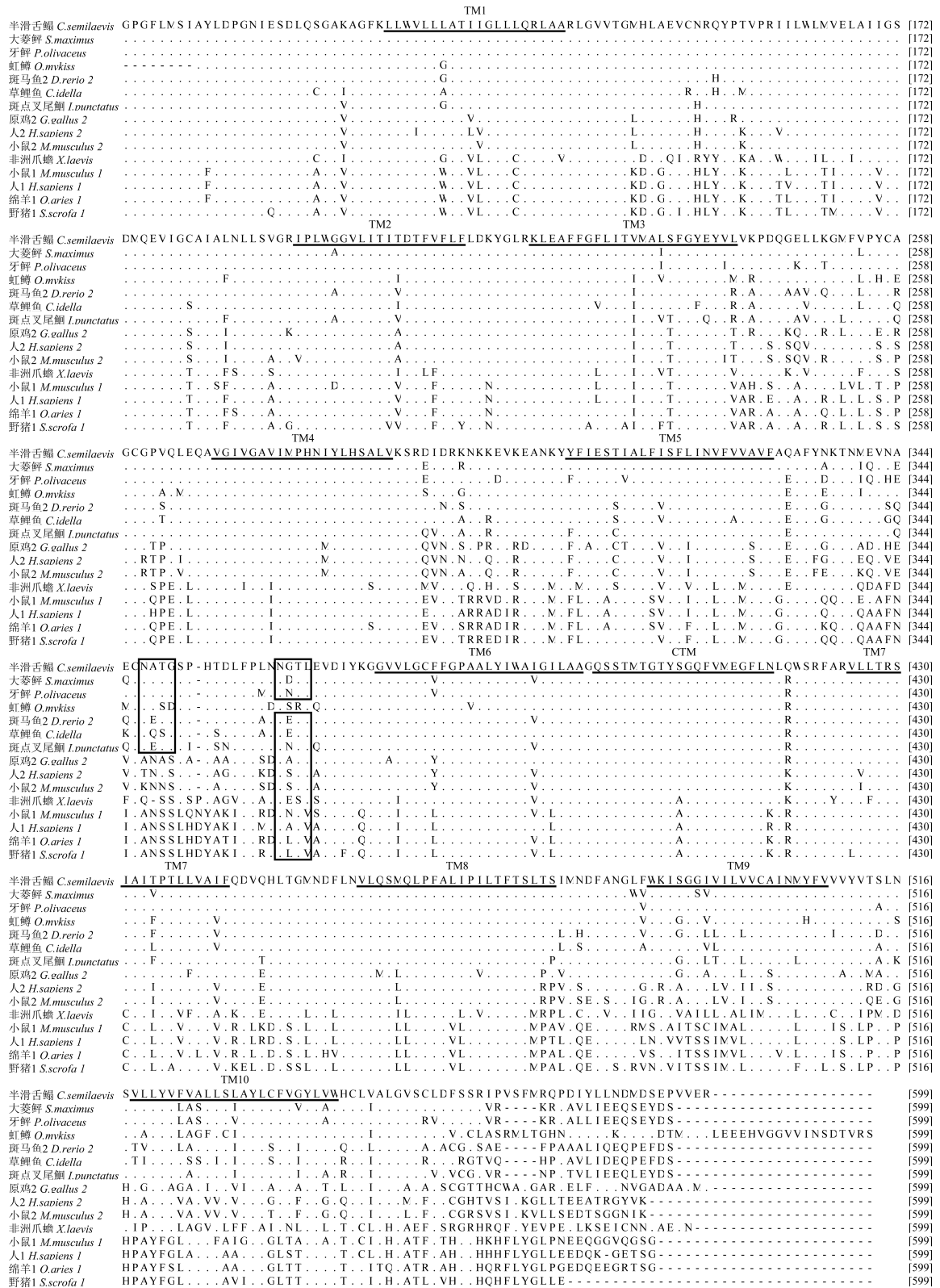


图 3 半滑舌鳎和其他物种 *Nramp* 氨基酸序列比对分析

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

半滑舌鳎 *Nramp* 的 10 个 TM 区及 CTM 区用下划线标出; 保守的 N-糖基化位点以方框标出;

“.”表示与半滑舌鳎氨基酸相同的位点;“-”表示此位点为空格

Putative transmembrane regions are underlined and numbered with TM 1-10. 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(-)

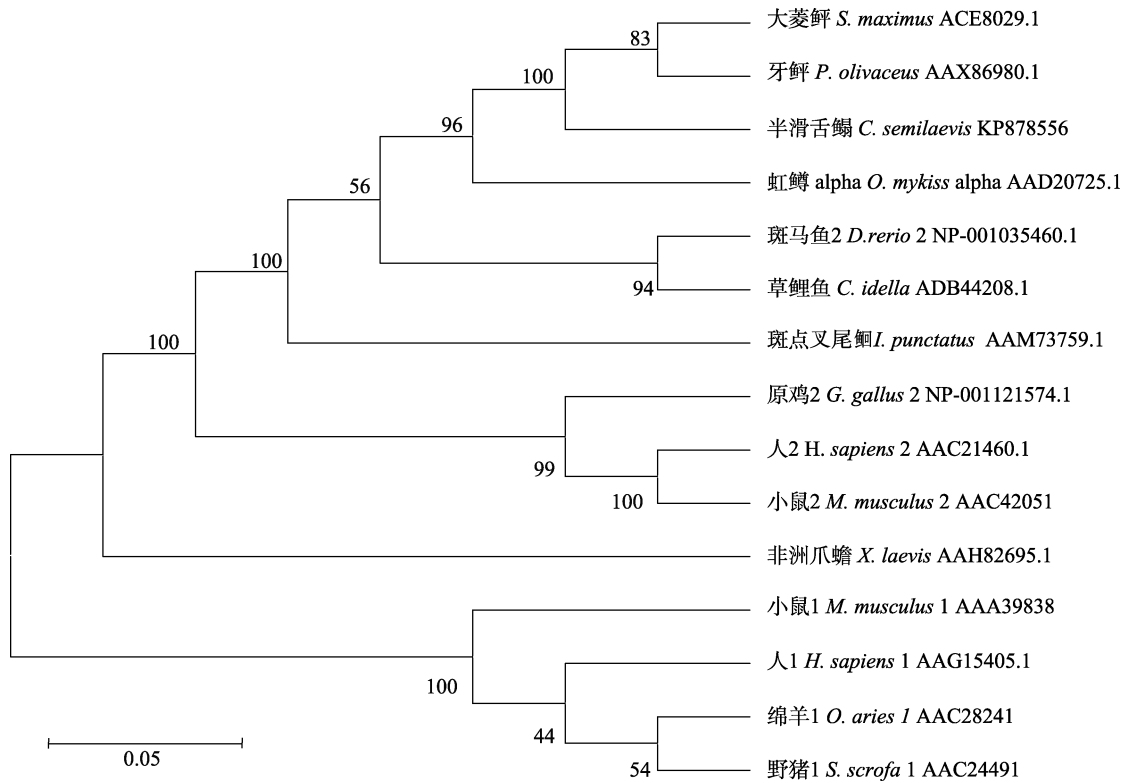


图 4 半滑舌鳎和其他物种 *Nramp* 氨基酸序列构建的系统发生树(利用 Bootstrap 法进行 1000 次评估)  
 Fig.4 Construction of phylogenetic tree based on *Nramp* amino acids of *C. semilaevis* and other species (the parameter was evaluated 1000 degree via method of Bootstrap)

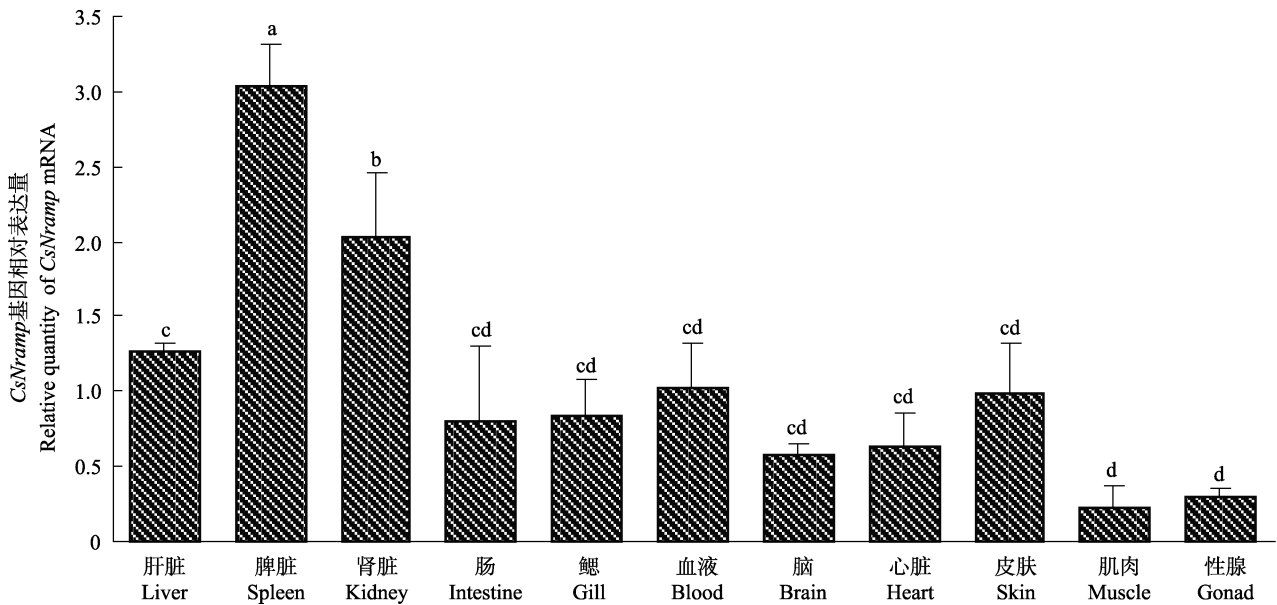


图 5 半滑舌鳎 *Nramp* 基因各组织相对表达量  
 Fig.5 Quantitative relative expression of *CsNramp* in different tissues

各组织相对定量表达分析数据取自 5 条健康成鱼, 以血液中 *Nramp* 基因表达量为标准, 用单因素方差分析数据, 每个柱子上面的不同字母表示显著差异( $P < 0.05$ )  
 Analysis of the relative tissue expression data are from five fish. All results were normalized by the blood *Nramp* expression levels. Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA. Different letters above each bar denote significant differences ( $P < 0.05$ )

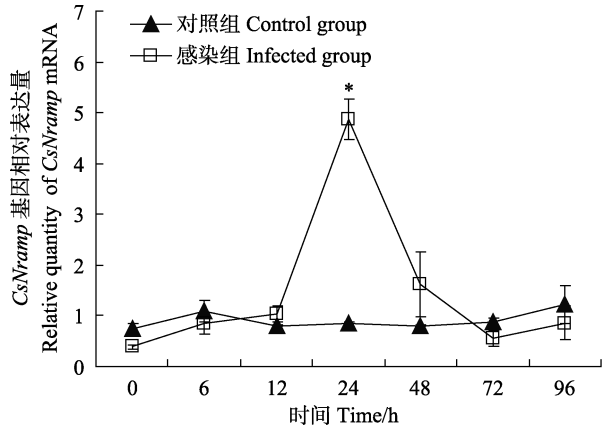


图 6 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎肝脏中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.6 Quantitative relative expression of *CsNramp* in liver after injected with *V. harveyi*

感染组: 腹腔注射哈维氏弧菌, 剂量为 30  $\mu\text{l/g}$ , 滴度为  $6.0 \times 10^5$  CFU/ml; 对照组: 腹腔注射等量的 PBS 溶液; 在感染后 0、6、12、24、48、72 和 96 h 共 6 个时间点, 随机选取感染组和对照组各 5 条半滑舌鳎, 解剖鱼体获得肝脏后立即放入液氮中暂存, 后转移至  $-80^\circ\text{C}$  保存, 用于总 RNA 的提取; 利用单因素方差分析方法数据, \* 差异表示显著 ( $P < 0.05$ ); 下同

Injection group: *C. semilaevis* was injected intraperitoneally with *V. harveyi* (30  $\mu\text{l/g}$ ) or with equal dose of PBS. Five fish's liver tissues were collected at 0, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h after injection for RNA extraction. Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA. \* denotes significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below

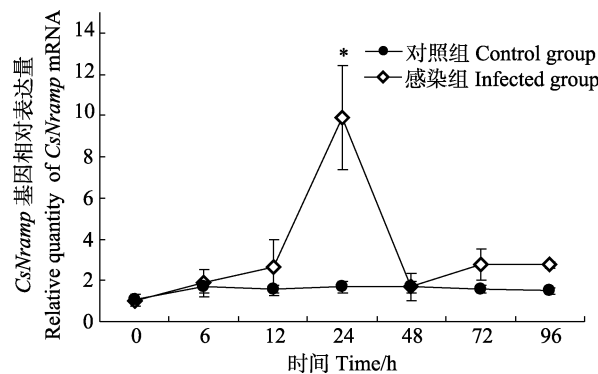


图 7 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎脾脏中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.7 Quantitative relative expression of *CsNramp* in spleen after injected with *V. harveyi*

列特征大致相似。此外, 本研究发现, 在半滑舌鳎 *Nramp* 基因 ORF 末端有 1 个 IRE 位点(CNNNNNCAGTG), 而草鱼 *Nramp* 基因 5' UTR 和 3' UTR 均发现 1 个 IRE 位点(范玉顶等, 2011), 以及鲤鱼的 3' UTR 发现 1 个 IRE 位点(Saeij *et al*, 1999)。已有研究表明, *Nramp*

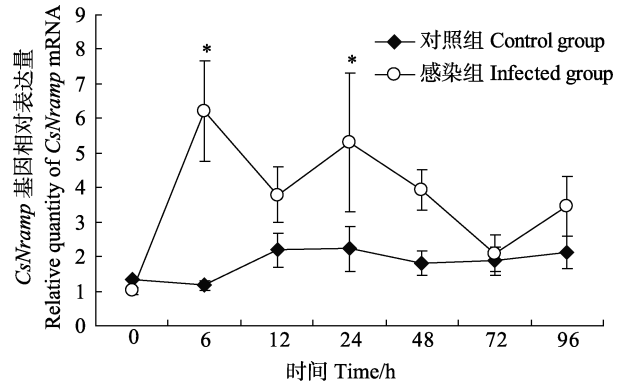


图 8 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎肾脏中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.8 Quantitative relative expression of *CsNramp* in kidney after injected with *V. harveyi*

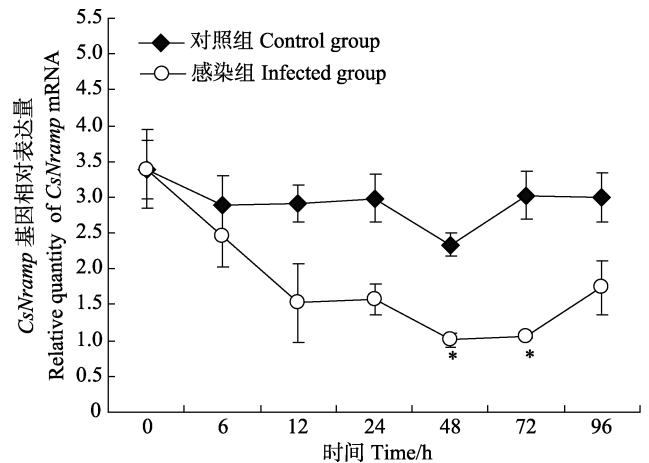


图 9 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎鳃中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.9 Quantitative relative expression of *CsNramp* in gill after injected with *V. harveyi*

基因 5' UTR 和 3' UTR 端 IRE 位点与细胞中铁离子的代谢紧密相关(Klausner *et al*, 1993), 在哺乳动物 *Nramp2* 基因的研究中, 发现该位点与铁离子的转运和吸收密切相关(Forbes *et al*, 2001; Gunshin *et al*, 1997)。据 Saeij 等(1999)推测, 在鲤鱼 *Nramp* 3' UTR 端发现的 IRE 位点可能通过与铁调控蛋白结合来调节鲤鱼 *Nramp* 的 mRNA 水平, 当铁调控蛋白和 *Nramp* 5' UTR 端 IRE 结合时, 可以组织 RNA 的翻译, 而当与 3' UTR 端的 IRE 位点结合时, 则可以保护 RNA 免受降解。但是, 鱼类 *Nramp* 基因中的 IRE 位点是否与哺乳类 *Nramp2* IRE 位点具有相似的作用, 以及 IRE 位于 ORF 与位于 UTR 区域是否具有类似的功能, 还需进一步的研究和探索。

*Nramp2* 基因在小鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肌肉、小肠等组织中广谱表达(Grunheid *et al*, 1995),



表 2 半滑舌鳎 *Nramp* 基因内含子 2 多态性的统计分析  
Tab.2 Statistical analysis of polymorphism of *CsNramp* intron 2

位置 Location	状态 Status	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies		哈迪温伯格平衡检验 Test for HWE	
		CC	TC	TT	C	T	卡方检验 Chi-square	概率 Probability
g.3113T→C	死亡 Dead	0.544(37)	0.456(31)	—	0.772	0.228	15.858	<0.01**
	存活 Survival	0.564(93)	0.430(71)	0.006(1)	0.779	0.221		
g.3125A→G	死亡 Dead	AG	GG	—	A	G	30.341	<0.01**
	存活 Survival	0.735(50)	0.265(18)	—	0.360	0.640		
g.3164A→T	死亡 Dead	AT	AA	—	A	T	18.549	<0.01**
	存活 Survival	0.456(31)	0.544(37)	—	0.772	0.228		
		0.436(72)	0.564(93)	—	0.782	0.218		

注：括号内数字为检测个体数；\*表示差异显著( $P<0.05$ )；\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )；下同

Note: Numbers in brackets are size of the tested population; \* indicates significant difference at  $P<0.05$ ; \*\* indicates highly significant difference at  $P<0.01$ ; The same as below

表 3 半滑舌鳎 *Nramp* 基因 SNP 与鳃弧菌的关联分析  
Tab.3 Association analysis of single SNP of *CsNramp* with *V. anguillarum*

编号 Code	位置 Location	作用 Effect	基因型卡方值 Chi Sq Genotype	等位基因卡方值 Chi Sq Allele	基因型概率值 Prob Genotype	等位基因概率值 Prob Allele
1	g.3113T→C	Intron	0.514	0.025	0.772	0.874
2	g.3125A→G	Intron	13.690	8.726	<0.01**	<0.01**
3	g.3164A→T	Intron	0.053	0.053	0.785	0.817

注：g.3113T→C 表示基因 3113 位置发生 T 到 C 的突变；g.3125A→G 表示基因 3125 位置发生 A 到 G 的突变；g.3164A→T 表示基因 3164 位置发生 A 到 T 的突变

Note: g.3113T→C means T to C mutation in the location 3113 of gene; g.3125A→G means A to G mutation in the location 3125 of gene; g.3164A→T means A to T mutation in the location 3164 of gene

而 *Nramp1* 基因的表达则呈组织特异性，如人的 *Nramp1* 可以在肝脏、肾脏和脾脏中检测到表达 (Cellier *et al*, 1997)，而小鼠的 *Nramp1* 基因则主要在脾脏中表达，肝脏中表达量相对较少 (Vidal *et al*, 1993)。本研究发现，半滑舌鳎 *Nramp* 基因在脾脏、肾脏和肝脏中表达量最高，其次是皮肤、血液、肠、鳃、心脏和脑，而在肌肉和性腺中的表达量最低。半滑舌鳎 *Nramp* 基因在器官中这种组成型表达方式与哺乳类 *Nramp2* 的表达方式较为相似 (Grunheid *et al*, 1995; Forbes *et al*, 2001)。此外，在大菱鲆、草鱼、鲤、鲈以及斑点叉尾鲷中也观察到了 *Nramp* 基因在脾脏和肾脏中的表达量较高，这种表达量变化说明了脾脏、肾脏是鱼类主要的免疫器官。

对半滑舌鳎进行哈维氏弧菌感染实验后研究发现，相较于 PBS 对照组，实验组 *Nramp* 基因表达量在脾脏、肾脏和肝脏中明显上调，随着时间推移又恢

复至正常表达水平。同样的现象在小鼠 (Govoni *et al*, 1997)、猪 (Zhang *et al*, 2000) 及真鲷 (Chen *et al*, 2004) 中有过报道，范玉顶等 (2011) 利用草鱼呼肠孤病毒感染草鱼肾脏细胞系，结果发现，在感染后 *Nramp* 基因表达量明显升高，3 h 表达量达到最大，24 h 后回落至正常表达水平；Chen 等 (2007) 利用鳃弧菌感染大菱鲆胚胎细胞系后发现，*Nramp* 基因表达量在感染 6–48 h 后显著升高，且在 12 h 达到最大表达量。这些结果表明，*Nramp* 基因与病原菌感染后机体的防御反应密切相关，但半滑舌鳎 *Nramp* 基因与哈维氏弧菌感染之间的相互作用机理以及 *Nramp* 基因在鱼体感染病原菌后在鱼类免疫系统中所扮演的角色还有待于进一步的研究。

*Nramp* 基因多态性与疾病相关性的研究已在哺乳动物上开展了一些工作。Liu 等 (2004) 研究发现，一个微卫星位于人 *SLC11A1* 基因的 5' 端，其多态性与

结核病易感性以及巨噬细胞调控的疾病有关; Sanchez-Robert 等(2005)对犬 *Nramp* 基因的研究表明, TAG-8-141 单倍型与利什曼原虫的易感性有关; Liu 等(2003)在鸡的 *Nramp1* 基因上的研究证明, *Nramp1* 基因高度保守区单核苷酸多态性与青年鸡 SE 疫苗接种及病原感染后的免疫应答相关; Paixiao 等(2006)利用 SSCA 法分析瘤牛、荷斯坦牛 *Nramp1* 基因 3' UTR 区的遗传变异,发现不同基因型对布鲁氏菌的抗病性和敏感性差异显著,且不同品种间基因频率差异显著;赵生国等(2013)研究猪 *Nramp1* 基因遗传变异与仔猪腹泻的相关性发现,外显子 2 的 AA 基因型个体腹泻评分值显著高于 TT 基因型个体( $P<0.05$ ),并极显著高于 AT 基因型个体( $P<0.01$ );内含子 6 的 CC 基因型个体腹泻评分值显著高于 CT 基因型个体( $P<0.05$ )。分子标记辅助选择育种(Marker-assisted selection, MAS)技术可以定向选育抗病新品种,且已在鱼类上取得了较好的效果(Xu *et al.*, 2008)。本研究在半滑舌鳎 *Nramp* 部分基因组 DNA(1042 bp)中筛选到 15 个 SNP 位点,对其中位于第 2 内含子区的 3 个 SNP[SNP-g.3113 (T→C)、SNP-g.3125(A→G)和 SNP-g.3164(A→T)]位点进行基因型分型,并对其 SNP 位点与抗病性的关联进行了分析。结果发现,在同一家系 233 个个体感染鳃弧菌后,存活个体 165 个视为抗病个体,死亡个体 68 个视为易感个体,其中, SNP-g.3125 的 AG 基因型(0.735)在死亡个体中为优势基因型,而 GG 基因型(0.546)在存活个体中为优势基因型,GG 基因型个体抗性评分极显著高于 AG 基因型个体( $P<0.01$ ),G 等位基因抗性评分极显著高于 A 等位基因( $P<0.01$ ),可见半滑舌鳎 *Nramp* 基因中的 SNP-g.3125 的等位基因(G)和基因型(GG)与半滑舌鳎对于鳃弧菌抗性呈显著相关性。因此, *Nramp* 基因该 SNP 位点可作为半滑舌鳎抗病育种的一个潜在的抗性遗传标记位点,为半滑舌鳎抗性品系培育的遗传分子标记提供基础研究资料。

## 参 考 文 献

- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988(9): 10-98
- 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. 中国水产科学, 2011, 18(1): 38-47
- 赵生国, 蔡原, 滚双宝, 等. 猪天然抗性相关巨噬细胞蛋白基因(*Nramp1*)多态性及其与仔猪腹泻相关性分析. 农业生物技术学报, 2013, 21(11): 1351-1357
- Bairoch A. The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. Nucleic Acids Res, 1993, 21(13): 3097-3103
- Blackwell JM, Barton CH, White JK, *et al.* Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the Lsh/Ity/Bcg gene story continues. Immunol Lett, 1995, 43(1-2): 99-107
- Blackwell JM. Structure and function of the natural resistance-associated macrophage protein(*Nramp1*), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. Mol Med Today, 1996, 2(5): 205-211
- Burge EJ, Gauthier DT, Ottinger CA, *et al.* Mycobacterium-inducible *Nramp* in striped bass (*Morone saxatilis*). Infect Immun, 2004, 72(3): 1626-1636
- Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, *et al.* Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. Science, 1988, 240(4854): 924-928
- 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 Exp Med, 1994, 180(5): 1741-1752
- 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 Leukocyte Biol, 1997, 61(1): 96-105
- Chen H, Waldbieser GC, Rice CD, *et al.* Isolation and characterization of channel catfish natural resistance associated macrophage protein gene. Dev Comp Immunol, 2002, 26(6): 517-531
- Chen SL, Xu MY, Ji XS, *et al.* Cloning and characterization of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*). Fish Shellfish Immunol, 2004, 17(4): 305-313
- Chen SL, Wang ZJ, Xu MY, *et al.* Molecular identification and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(3): 365-373
- Chen SL, Zhang YX, Xu JY, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from turbot (*Scophthalmus maximus*). Comp Biochem Phys B, 2007, 147(1): 29-37
- Dorschner MO, Phillips RB. Comparative analysis of two *Nramp* loci from rainbow trout. DNA Cell Biol, 1999, 18(7): 573-583
- Feng J, Li Y, Hashad M, *et al.* Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. Genome Res, 1996, 6(10): 956-964
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, *et al.* *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(3): 1148-1153
- Forbes JR, Gros P. Divalent-metal transport by *NRAMP* proteins

- at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Immunol*, 2001, 9(8): 397-403
- Govoni G, Gauthier S, Billia F, *et al.* Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*, 1997, 62(2): 277-286
- Grunheid S, Cellier M, Vidal S, *et al.* Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics*, 1995, 25(2): 514-525
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, 388(6641): 482-488
- Liu W, Kaiser MG, Lamont SJ. Natural resistance associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella enteritidis* in young chicks. *Poultry Science*, 2003, 82(2): 259-266
- Liu W, Cao WC, Zhang CY, *et al.* *VDR* and *Nramp1* gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8(4): 428-434
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, *et al.* Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 1997, 10(1): 1-6
- Kishi F. Isolation and characterization of human *Nramp* cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 204(3): 1074-1080
- Kishi F, Tabuchi M. Complete nucleotide sequence of human *NRAMP2* cDNA. *Mol Immunol*, 1997, 34(12-13): 839-842
- Klausner RD, Rouault TA, Harford JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell*, 1993, 72(1): 19-28
- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathy of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157: 105-132
- Paixiao TA, Ferreir AC, Borges AM, *et al.* Frequency of bovine *Nramp1*(*SLC11A1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(1/2): 37-42
- Saeij JPJ, Wiegertjes GF, Stet RJM. Identification and characterization of a fish natural resistance-associated macrophage protein (*NRAMP*) cDNA. *Immunogenetics*, 1999, 50(1): 60-66
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425
- Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, *et al.* Polymorphism of *SLC11A1*(*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Heredity*, 2005, 96(7): 755-758
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Skamene E, Pietrangeli CE. Genetics of the immune response to infectious pathogens. *Curr Opin Immunol*, 1991, 3(4): 511-517
- Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, *et al.* Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 1993, 73(3): 469-485
- Xu TJ, Chen SL, Ji XS, *et al.* MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(3): 213-221
- Zhang G, Wu H, Ross CR, *et al.* Cloning of porcine *NRAMP1* and its induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1b: role of CD14 and mitogen-activated protein kinases. *Infect Immunol*, 2000, 68(3): 1086-1093

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning, Expression and SNP Screening of Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (*Nramp*) Gene cDNA from Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

XING Hefei<sup>1,2,3</sup>, GAO Fengtao<sup>1,2,4</sup>, ZHANG Yongzhen<sup>1,2,3</sup>, DONG Zhongdian<sup>1,2,4</sup>, CHEN Songlin<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Laboratory for Ocean Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071;

3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** Natural resistance-associated macrophage protein (*Nramp*) belongs to the integration of membrane transport proteins, which has the capacity of enhancing macrophages that are meant to kill pathogens and innate resistance to intracellular parasites. In present study, cDNA of *Nramp* gene was amplified from spleen of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) by SMART-RACE. The full-length cDNA of *Nramp* gene was 3717 bp, including 1677 bp open reading frame (ORF) encoding a protein with 558 amino acid residues, which contained the signature features of the *Nramp* protein family: 10 transmembrane (TM) domains, a consensus transport motif (CTM) with 20 amino acid residues. Compared with the other fish's *Nramp*, *C. semilaevis* *Nramp* was the presence of one iron-responsive regulatory (IRE) protein-binding site in the terminal of ORF, which was similar to the vertebrate *Nramp2*. The deduced amino acid sequence of *CsNramp* exhibited about 63%–91% homology with 14 other vertebrate *Nramp* sequences. Phylogenetic analysis revealed that the *CsNramp* was clustered with other fish *Nramp* and was closer to *Nramp2* of other species. RT-PCR results of the *CsNramp* transcripts in different tissues indicated that the *CsNramp* transcripts were highly abundant in spleen, kidney and low in muscle and gonad. The *C. semilaevis* challenged with the *Vibrio harveyi* could evidently elevate *Nramp* mRNA levels in spleen, kidney and liver, but the opposite phenomena were observed in the gills. To explore genetic variation and its relevant molecular markers in *CsNramp* gene, this research detected the polymorphisms of *Nramp* gene in one family of 233 individuals (68 infected individuals and 165 resistant individuals) by direct sequencing. Fifteen SNPs were detected in the partial of *Nramp* gene and 3 of them were genotyped successfully and SNP-g.3125(A→G) was significantly correlated to the resistance to *Vibrio anguillarum*. The results indicated that there were important effects on disease resistance of different *Nramp* genotypes, SNP-g.3125(A→G) can be used as potential genetic resistance marker loci, which can provide basic data for the genetic markers of *C. semilaevis* resistant breeding.

**Key words** Half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*); *Nramp*; Gene clone; RT-PCR; Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn