

文章编号: 1000-0615(2005)01-0128-05

• 研究简报 •

真鲷天然抗性相关巨噬蛋白全长 cDNA 的克隆与序列分析

徐美瑜, 陈松林, 沙珍霞, 季相山

(中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

关键词: 真鲷; 天然抗性相关巨噬蛋白; cDNA 末端快速扩增; 序列分析

中图分类号: S917

文献标识码: A

Cloning and sequence analysis of Nramp cDNA from *Pagrus major*

XU Mei-Yu, CHEN Song-Lin, SHA Zhen-Xia, JI Xiang-Shan

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Natural resistance associated macrophage protein (Nramp) is an innate resistance protein to intracellular parasites, which is expressed plentifully in macrophage cells. Nramp has been studied in mouse, human, cattle, rainbow trout and channel catfish. However, little was known about the structure of *Pagrus major* Nramp. In order to get the complete sequence of *Pagrus major* Nramp, a pair of primer is designed according to a 200bp known sequence of *Pagrus major* Nramp cDNA. By the use of SMART RACE, the full Nramp of *Pagrus major* cDNA about 5 000 bp was obtained, including about 200 bp 5' terminal region (UTR), complete encoding region and 3' terminal region. There were 3 ployA signals, which showed many possibilities of cutting at 3' terminal region. The character of *Pagrus major* Nramp nucleotide sequence and deduced amino acid sequence are analyzed. 12 putative transmembrane(TM) regions, a consensus transport motif (CTM), a predicted protein kinase C phosphorylation site and three predicted N-link glycosylation sites are indicated in its deduced amino acid sequence. The consensus transport motif CTM is located between TM8 and TM9. Furthermore, a protein kinase C phosphorylation site and three N-link glycosylation sites were predicted. The alignment of amino acid sequences between *Pagrus major* Nramp cDNA and several animals is analyzed and the deduced amino acid sequence of *Pagrus major* Nramp had 77.8%, 83.0%, 82.3%, 80.0%, 81.1%, 60.4%, 70.3%, 58.5%, 69.5% identity with rainbow trout α (AAD20721), rainbow trout β (AAD20722), channel catfish (AF400108), fathead minnow (AAF01778), common carp (CAB60196), mouse 1 (AAA39838), mouse 2 (AAC42051), human 1 (D50403), human 2 (NP-000608), respectively. The alignment reveals high conservation in TM and CTM regions. Analysis result makes us get familiar with the structure and character of fish Nramp, furthermore, offers some information for the enhancement of immunity of fish and genetic amelioration on fish breeding.

Key words: *Pagrus major*; natural resistance associated macrophage protein; rapid amplification of cDNA ends (RACE); sequence analysis

真鲷, 俗称红加吉鱼, 是一种深受中国、日本及东南亚各国欢迎的经济鱼类。其育苗和养殖技术已逐渐成熟且进入了产业化阶段。但高密度集约化养殖也带来了多种负面影响, 其病害种类、发病频率及危害性逐年增加。其中细菌性疾病危害最大, 其流行性的暴发给整个真鲷养殖业造成了巨大的经济损失^[1,2]。最近发现天然抗性相关巨噬蛋白(Nramp)是生物体内的一种抑制胞内寄生菌侵染

的免疫蛋白, 能够降解经吞噬细胞吞入的细菌, 该蛋白的结构功能成为一个新的研究热点。相关研究在小鼠中首先报道^[3], 随后在人^[4]、牛^[5]、羊、鸡、猪^[6]中以及虹鳟^[7]、鲟^[8]中也有相关报道。

鉴于 Nramp 蛋白在哺乳动物巨噬细胞中的重要作用, 本文根据鱼类 Nramp 的保守序列设计特异性引物, 运用 SMART-RACE 技术扩增 5' 和 3' 端特异的产物, 并对其进

收稿日期: 2003-06-02

资助项目: 国家 863 高技术研究发展项目(2002A A626010)

作者简介: 徐美瑜(1978-)女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 助理研究员, 主要从事鱼类分子生物研究。E-mail: xumy@ysfri.ac.cn

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

行了克隆、测序, 通过序列拼接获得完整的 Nramp cDNA 序列。对真鲷 Nramp 基因的结构和推测的蛋白质的特征进行了分析, 并与其他 Nramp 蛋白做了比较分析, 为通过基因表达方法获得应用于鱼体的抗菌药物提供了基础。

1 材料与方法

1.1 脾脏的冻存

真鲷购自青岛市水产品市场。将真鲷的脾脏取出, 迅速放入液氮中冻存, 然后转移到 -80°C 冰箱保存。

1.2 引物

用于 Nramp 扩增的引物序列如下:

gsp3: 5'-GGGCCCTTCACTGGACCAGGCTTTTTGATG -

3' 用来扩增 3' 末端;

gsp5: 5'-TGTGACGACCCGACGGCGTGCAGCTAA - 3'

用来扩增 5' 末端。

1.3 mRNA 的提取

称取 0.2 g 冻存的真鲷脾脏组织, 利用 Trizol 一步法提取总 RNA, 然后使用 Oligotex mRNA midi kit 分离 mRNA。

1.4 RACE 扩增

cDNA 末端快速扩增按照 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)的说明书进行。

1.5 RACE 产物的纯化、克隆及测序

50 μL 的 RACE 产物, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 用 NucleoTrap gel 回收试剂盒(Clontech)按说明书提供的方法进行纯化。将回收产物按 3: 1 的摩尔比与 pMD18-T(Takara)载体进行连接反应。连接产物 5 μL 用于转化 *E. coli* DH5 α , 根据蓝白斑原理, 筛选白色菌斑, 提取质粒, 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切鉴定含插入片段的质粒。由生工生物公司进行双向测序。

1.6 真鲷 Nramp 基因结构分析

DNA 序列分析使用 DNASTar 分析软件, Edit Seq 用于 ORF 阅读框分析, 以及蛋白序列的推测。Bioedit 用于蛋白质序列的比较分析及进化分析。

2 结果

2.1 cDNA 末端的快速扩增

在 5' 和 3' RACE 扩增中都出现了多条片段, 5' 扩增结果显示 3 条主带(图 1), 3' 扩增获得多条片段(图 2), 经多次提高退火温度和减少模板的量, 电泳条带均无明显变化, 因此判断各个条带可能为 Nramp 基因不同转录单元的特异扩增条带。选择性拼接、不同的起始转录位点及不同的 PolyA 信号位点都可能导致 RACE 扩增产物产生多条谱带。为得到完整及最大转录单元, 分别对 5' 扩增的 400bp 片段及 3' 扩增 4 000 bp 进行胶回收纯化和连接。

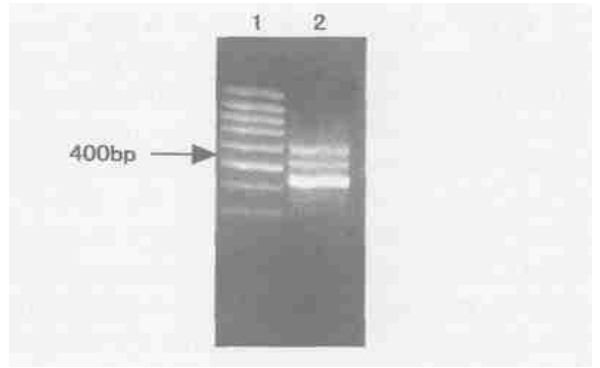


图 1 Nramp 的 5' RACE 扩增结果

Fig. 1 5' RACE of Nramp cDNA

1. 100 bp DNA 分子量标记; 2. 5' RACE 扩增产物

1. 100 bp DNA marker; 2. amplification products of 5' RACE

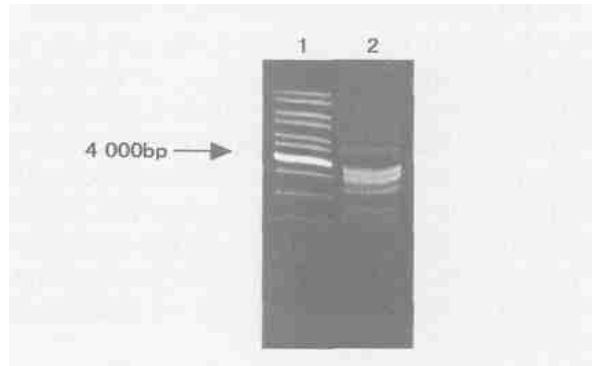


图 2 Nramp 的 3' RACE 扩增结果

Fig. 2 3' RACE of Nramp cDNA

1. 1 kb DNA 分子量标记; 2. 3' RACE 扩增产物

1. 1 kb DNA marker; 2. amplification products of 3' RACE

2.2 克隆与测序

将上述的 RACE 纯化产物与 pMD18-T 载体连接后, 转染 DH5 α 菌株, 挑取 4~6 个克隆, 经酶切和 PCR 检测含插入片段的阳性克隆, 少量制备质粒, 并由生物公司测序。测序结果经 DNASTAR 软件分析, 去除重叠序列和接头序列后得到长度为 4 700 bp 的真鲷 Nramp 全长 cDNA, 具有完整的可读框, 起始密码子及终止密码子, 3' 末端具有保守的加尾信号 AATAAA。并且含有 3 个加尾信号, 说明该基因确实存在多种 3' 末端剪切的可能。

2.3 基因结构及进化分析

经软件分析, 该序列编码一个含 554 氨基酸的蛋白, 分子量 61 kD, 等电点 5.7。该蛋白包含 12 个高疏水性的跨膜转运(transmembrane, TM)特征区和在 TM8 和 TM9 之间存在 1 个结合蛋白依赖性转运系统内膜信号区, 3 个糖基化位点存在于 TM7 和 TM8 之间, 1 个 N 端蛋白激酶 C 磷酸化位点(图 3)。

用 Bioedit 软件中 Clustal 方法比较真鲷 Nramp 蛋白与虹鳟 α (AAD20721)和 β (AAD20722)两种蛋白、斑点叉尾鮰 α (AF400108)、胖头鱼 α (AAF01778)、鲤(CAB60196)、小鼠 1(AAA39838)和 2(AAC42051)蛋白、人 1(D50403)和 2(NP-000608)蛋白的氨基酸序列。其同源性分别为 77.8%、83.0%、82.3%、80.0%、81.1%、60.4%、70.3%、58.5%、69.5%，表明真鲷 Nramp 蛋白与其他鱼类的同源性都较高，与人和小鼠的略低，同时，与 2 型蛋白的同源性高于 1 型蛋白。真鲷 Nramp 蛋白与其他几个种的蛋白比较结果表明，该蛋白在 12 个 TM 区与 CTM 区的保守性很高，而在 N 端和 C 端的保守性较低(图 4)。

3 讨论

SMART RACE 技术是一种基于 PCR 原理由已知的部分 cDNA 序列来获得完整 cDNA 5' 端和 3' 端的方法。该方法利用 MMLVRT 的突变体能够在逆转录结束时，行使末端转移酶的功能在其 3' 末端加 3~5 个 C 碱基的特点，使用基因特异性引物与试剂盒特定引物共同扩增完整的 5' 端和 3' 端部分片段，是一种方便、有效的由已知序列扩增未知序列的方法^[9]。本实验利用 SMART RACE 法快速扩增获得约 5 kb 的真鲷 Nramp 全长 cDNA 序列，该序列具有完整的阅读框、起始子和终止子。结果显示该序列具有 3 个 PolyA 信号，表明该序列的 3 末端有多种剪切可能。这与在斑点叉尾鮰^[8] Nramp 中报道的 3 种不同末端剪切的产物结果相似。

对该序列进行分析推导出完整的蛋白质序列，并对其结构特征进行了分析。真鲷 Nramp 蛋白具有 Nramp 蛋白的特征结构域，包括 12 个跨膜转运区和一个转运系统内膜信号区。氨基酸序列在特征区内高度保守，与其穿透质膜并能转运二价离子的功能密切相关。该区域由高度疏水性氨基酸组成，有利于其穿越质膜的磷脂双分子层。其 N 端和 C 端的序列差异较大，可能由于该区域不参与转运功能，而在长期生物进化的过程中形成了种间差异。氨基

酸序列同源性比较结果表明，真鲷 Nramp 蛋白与 2 型蛋白的同源性高于 1 型蛋白。在哺乳动物中存在 1、2 两种 Nramp 蛋白，其中 1 型蛋白在巨噬细胞中起帮助降解胞内寄生菌的作用，2 型蛋白在多种细胞中广泛表达，主要起二价离子的转运功能。除虹鳟外，在鱼类中发现的 Nramp 蛋白只有一种^[7]，同源性分析与 2 型蛋白更相近，但在各组织中表达水平与 1 型蛋白相似。本实验结果为阐明鱼类 Nramp 的结构与功能以及其在鱼类免疫抗病中的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷病害的研究进展[J]. 鱼类病害研究, 2000, 23: 13-23.
- [2] 林永添. 网箱养殖真鲷的疾病与防治[J]. 河北渔业, 2002, 3: 31-33.
- [3] Vidal S, Mab D, Vogank K, *et al.* Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate gene for Bcg[J]. Cell, 1993, 73:469-475.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Tuggle C K, Schmitz C B, Gingerich-Feil D. Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (Nramp 1) cDNA[J]. J Anim Sci, 1997, 75: 277.
- [7] Dorschner M O, Philips R B. Comparative analysis of two Nramp loci from rainbow trout[J]. DNA and Cell Biology, 1999, 18: 573-583.
- [8] Hai C, Geoffery C W, Charles D R, *et al.* Isolation and characterization of channel catfish natural resistance associated macrophage protein gene[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2002, 26: 517-531.
- [9] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1988, 85(23): 8998-9002.

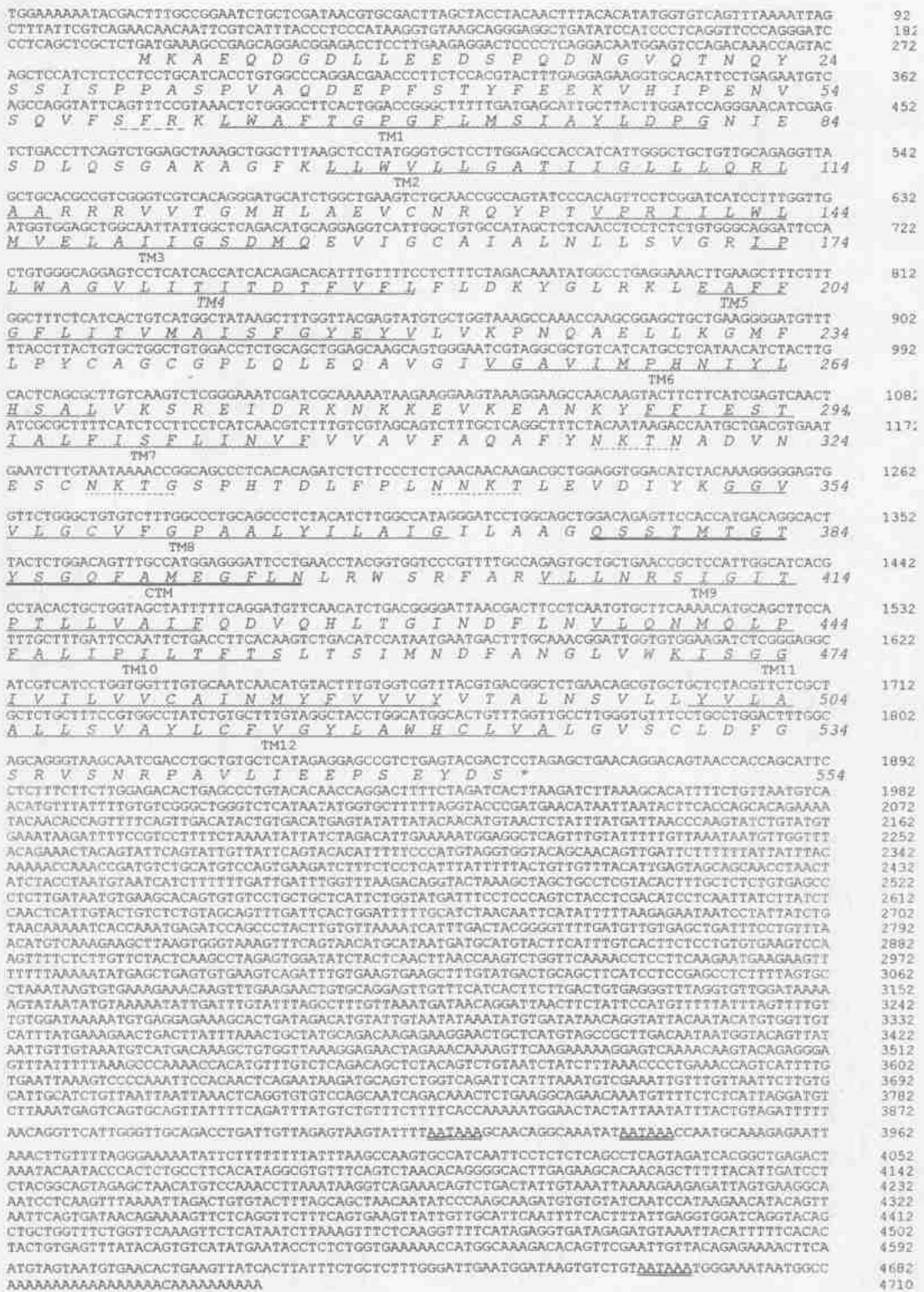


图 3 真鲷 Nramp 基因的核苷酸序列以及其推测的氨基酸序列分析

Fig. 3 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Pagrus major* Nramp

氨基酸序列以斜体字表示并位于相应的密码子的下面, 12 个跨膜区以 表示, 转运特征区位于 8~ 9 跨膜区之间以 表示, polyA 信号以 表示, 蛋白激酶 C 磷酸化位点以 表示, N 端蛋白激酶 C 磷酸化位点以 表示

Amino acids are indicated with italic letters and line under corresponding genetic codes, transmembrane regions(TM) are underlined with and numbered 1- 12. The ⁺ consense transport motif (CTM) located between TM8 and TM9 is underlined with . polyA signals are represented with . A predicted protein kinase C phosphorylation site is underlined with , three predicted N- link glycosylation sites are underlined with

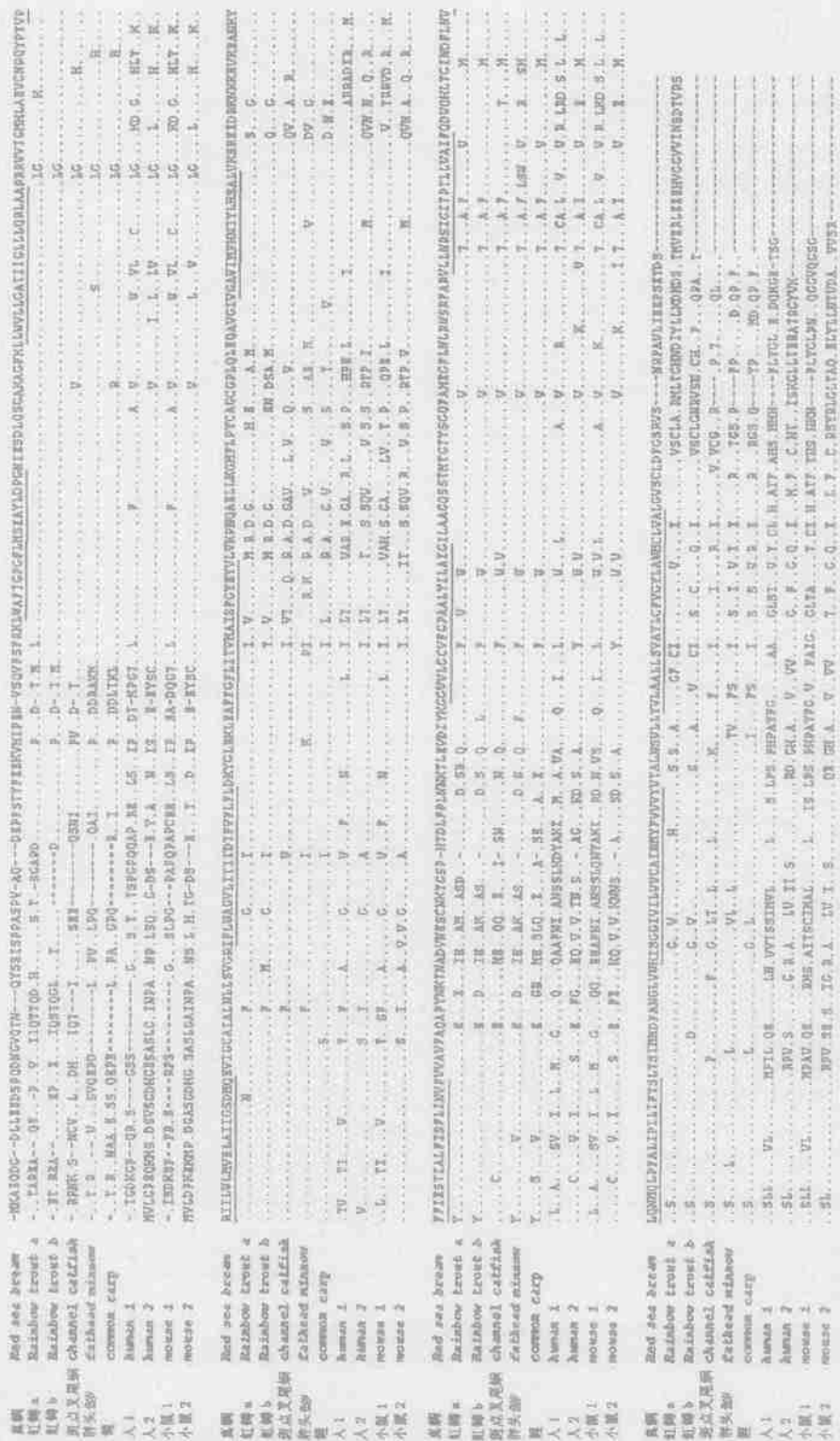


图4 真鲷 Nramp 与其他种的真鲷 Nramp 氨基酸序列分析
Fig.4. Sequence analysis of *Pagrus major* Nramp with others

真鲷 Nramp 蛋白的 12 个跨膜特征区以下划线标注,点表示与真鲷氨基酸相同的位点,破折号表示此位置为空格

The amino acid sequence of *Pagrus major* Nramp is given with 12 putative transmembrane regions underlined. Dots indicate amino acid position the same as *Pagrus major*. Dashes indicate spacing for optimum alignment.