

林德海,刘晨珊,董迎辉,等. 缢蛏天然抗性相关巨噬蛋白 2(*Sc-Nramp2*)基因克隆及其在副溶血弧菌刺激下的表达分析[J]. 海洋学报, 2017, 39(8): 70—77. doi:10.3969/j.issn.0253-4193. 2017. 08. 007

Lin Dehai, Liu Chenshan, Dong Yinghui, et al. Cloning of natural resistance associated macrophage protein 2 (*Sc-Nramp2*) gene from *sinonovacula constricta* and the expression analysis under vibrio parahaemolyticus stimulation[J]. Haiyang Xuebao, 2017, 39(8): 70—77. doi:10.3969/j.issn.0253-4193. 2017. 08. 007

缢蛏天然抗性相关巨噬蛋白 2(*Sc-Nramp2*)基因克隆及其在副溶血弧菌刺激下的表达分析

林德海¹, 刘晨珊¹, 董迎辉¹, 何琳¹, 林志华^{1*}

(1. 浙江万里学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 克隆得到缢蛏天然抗性相关巨噬蛋白 2(*Sc-Nramp2*)基因的 cDNA 全长序列 3 681 bp, 该基因的开放阅读框有 1 776 bp, 编码 591 个氨基酸, 预测分子量为 65.86 kDa; 其结构具有 Slc11 蛋白家族的典型特征, 包括有 10 个典型的跨膜结构和 2 个糖基化位点。*Sc-Nramp2* 基因 3'-UTR 有 2 个类似于脊椎动物 *Nramp2* 中铁反应控制蛋白结合位点; 同源性分析表明, *Sc-Nramp2* 和太平洋牡蛎 *Nramp2-like* 的同源性最高为 71.6%。实时荧光定量 PCR 结果表明, *Sc-Nramp2* 基因在闭壳肌、外套膜、肝胰腺、斧足、水管和鳃 6 个组织中均有表达, 其中肝胰腺中的表达量最高, 其次是鳃, 与其他组织均有极显著性差异 ($P < 0.01$); 注射副溶血弧菌后, 肝胰腺中 *Sc-Nramp2* 基因的表达量较对照组显著上调 ($P < 0.01$), 且表达量呈现先上升后下降的趋势, 在 12 h 时达到最大表达量, 推测 *Sc-Nramp2* 基因参与了缢蛏非特异性免疫应答反应。

关键词: 缢蛏; *Sc-Nramp2*; 基因克隆; 副溶血弧菌; 基因表达

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2017)08-0070-08

1 引言

天然抗性相关巨噬蛋白 (natural resistance associated macrophage protein, Nramp) 也称溶质转运蛋白家族 11 (solute carrier family 11, SLC11), 是一类古老的膜整合转运蛋白, 含有 10~12 个典型的跨膜区、1 个胞质内转运蛋白特征结构域和 1~2 个糖基化的胞质外环状结构, 在各物种间保持高度保守性^[1]。该家族包括 *Nramp1* 和 *Nramp2*^[2], *Nramp1* 主要特异性表达于巨噬细胞和组织网状内皮系统^[3], *Nramp2* 则

广泛表达于大多数组织和细胞^[4]。*Nramp* 蛋白对生物体内细胞的病原体可以起到抵抗的作用, 主要是通过阳离子运输功能减少巨噬细胞内金属离子的浓度, 抑制胞内病菌对金属离子的利用, 调节巨噬细胞的抗菌活性^[5]。研究发现, 人 *Nramp1* 基因多态性与多种自身免疫性疾病和由病毒、细菌、寄生虫等引起的传染性疾病相关^[6]。小鼠 *Nramp1* 在抵抗牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 的感染起着重要的调控作用^[7-8], 单个密码子突变 (Gly169→Asp) 可导致基因功能的丧失^[9]。迄今为

收稿日期: 2016-11-23; 修订日期: 2017-04-13。

基金项目: 国家现代贝类产业技术体系项目 (CARS-48); 浙江省重大科技专项 (2016C12907-7); 国家水产种质资源平台项目 (2015DKA30470); 宁波市科技富民项目 (2015C1000); 浙江省重中之重学科学生创新项目 (CX2015011); 浙江省教育厅一般项目 (Y201329410)。

作者简介: 林德海 (1990—), 男, 浙江省苍南县人, 从事海洋贝类种质资源与遗传育种研究。E-mail: 772351303@qq.com

* 通信作者: 林志华, 博士, 研究员。E-mail: zhihua9988@126.com

止,已在人^[10]、鼠^[1]、猪^[11]等哺乳动物中克隆得到 *Nramp* 基因 cDNA 全长。在鱼类中,已得到了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[12]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[13]、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)^[14]、真鲷 (*Pagrosomus major*)^[15]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[16] 和斑马鱼 (*Danio rerio*)^[17] 等 *Nramp* 基因全长,并分析了基因的序列特征。然而,关于 *Nramp* 基因的研究主要集中在哺乳动物和鱼类,在贝类中仅见太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) *Nramp2-like* 在 NCBI 上有序列信息。

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 是我国重要海水养殖贝类之一,肉质鲜美,营养丰富,深受消费者喜爱,在浙江、福建、广东沿海一带有着悠久的养殖历史。近年来,由细菌性疾病造成的缢蛏病害时有发生,其中又以弧菌为主要致病菌^[18]。贝类对病原的防御与脊椎动物不同,体内不存在特异性免疫淋巴细胞和相应抗体,是通过巨噬细胞和多种非免疫球蛋白介导的非特异性免疫杀灭进入体内的病原^[19]。目前在缢蛏中已有热休克蛋白 *ScHsc70*^[20]、小分子热休克蛋白 *Sc-sHSP*^[21]、肌动蛋白 β -*ACTIN1*^[22]、铁蛋白^[23] 和组织蛋白酶 B^[24] 等免疫相关基因的报道。本研究对 *Sc-Nramp2* 基因的序列特征、组织表达和副溶血弧菌感染后的表达进行分析,以期为进一步研究其在缢蛏免疫过程中的作用机理奠定基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验用缢蛏材料于 2015 年 10 月取自宁波市海洋与渔业研究院科技创新基地。取健康的缢蛏成贝

经活体解剖,迅速取其闭壳肌、外套膜、肝胰腺、足、水管和鳃 6 个组织,用液氮速冻后分别放入冻存管中,并保存于-80℃冰箱中备用。

2.2 攻毒实验

取 200 颗缢蛏暂养于海水中,水温(18±1)℃,盐度为 25,定时投喂扁藻、金藻,持续充气,每日换水一次,暂养一周后进行攻毒实验。

将实验室保存的副溶血弧菌 (*Vibrio Parahaemolyticus*) 活化后,扩大培养,用 PBS 将菌液浓度稀释到 OD600=0.4。将缢蛏随机分组,每组 100 颗。在实验组每颗缢蛏斧足注射 50 μ L 副溶血弧菌菌液,对照组每颗注射 50 μ L PBS,注射后放回海水中。分别于注射后 0 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 取样肝胰腺用液氮速冻,于-80℃冰箱中保存。

2.3 *Sc-Nramp2* 基因 cDNA 全长的克隆

采用 Trizol 法提取缢蛏肝胰腺样品 RNA,用 1% 琼脂糖电泳检测其完整性,NanoVue 微量紫外分光光度计检测浓度和纯度。利用 SMART RACE 试剂盒 (Clontech) 以总 RNA 为模板合成 cDNA。从缢蛏转录组文库的注释信息中,检索到 *Sc-Nramp2* 基因的 EST 片段,以此分别设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物 N-1 和 N-2(表 1),用 Advantage 2 Polymerase 试剂盒 (Clontech) 根据试剂盒说明书要求扩增 *Sc-Nramp2* 的 cDNA 全长。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒 (TIANGEN) 割胶纯化。纯化后的产物与 T1 (TransGen) 载体连接,转化到大肠杆菌 DH5 α (TaKaRa) 中进行克隆,挑取出阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序。

表 1 实验所用的引物及序列
Tab.1 Primers and their sequences used in experiment

引物	序列(5'→3')	引物信息
N-1	TTTCTAACTCCAGTCACGGC	3'RACE 扩增
N-2	AAGCCCGTCCTAAGTCCGA	5'RACE 扩增
Real-N-F	TGTAGCAATGAGATTCCAAGG	荧光定量基因引物
Real-N-R	CATCGTGTGGGTATCATTTAG	荧光定量基因引物
18s-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	内参基因荧光定量引物
18s-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCAC	内参基因荧光定量引物

2.4 *Sc-Nramp2* 基因的序列及进化分析

用 DNAMAN 7 软件对测序结果序列进行拼接,得到 *Sc-Nramp2* 基因的 cDNA 全长序列并搜索开放

阅读框,推测出其编码的氨基酸序列;用 NCBI blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 搜索同源序列和功能域;用序列处理在线工具包 (

www.bio-soft.net/sms/index.html)预测翻译蛋白质的理化性质;用 NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测糖基化位点;用 ExPASy ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)软件分析蛋白质疏水性;用 SignalP 4.1 Serve(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白质的信号肽;用 DAS(<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)软件预测蛋白质的跨膜区;用 Swiss Model(<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>)软件预测蛋白质三级结构。

2.5 *Sc-Nramp2* 基因在不同组织中的差异表达分析

利用 Trizol(Invitrogen)法提取 6 个组织(闭壳肌、外套膜、肝胰腺、斧足、水管和鳃, $n=3$)的 RNA,按照 Promega 反转录试剂盒说明书进行反转录获得 cDNA 第一链,用作荧光定量 PCR 的模板。根据已获得的 *Sc-Nramp2* 基因 cDNA 全长序列设计 Real-N-F 和 Real-N-R(表 1)用为荧光定量引物,以 18S rRNA(表 1)基因为内参进行相对定量。荧光定量 PCR 的反应体系为 20 μ L,包含:SYBR Green Mix(Bio-rad)10 mL,cDNA 模板 0.8 mL,上下游特异性引物(10 mmol/L)各 1 mL,以 DEPC-H₂O 补足。用 ABI 7500 fast 荧光定量 PCR 仪进行扩增,具体反应程序:95℃ 预变性 20 s;95℃ 变性 3 s,60℃ 退火 30 s,共 40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s,制成熔解曲线。每个组织样品设 3 个平行,基因的相对 mRNA 水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算,结果用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,采用 SPSS16.0 进行 ANOVA 单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

3 结果

3.1 *Sc-Nramp2* 基因 cDNA 全长序列分析

经 RACE 克隆得到 *Sc-Nramp2* 基因 cDNA 序列全长 3 681 bp (GenBank 登录号: KX197930.1),开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)有 1 776 bp,编码 591 个氨基酸,5'末端非翻译区(Untranslated Regions, 5'-UTR)长 91 bp,3'-UTR 为 1 817 bp,包含一个终止密码子 TAG、加尾信号和 32 bp 的 polyA 尾巴。另外,在 3'-UTR 发现了 2 个铁反应控制蛋白结合位点(Iron-responsive regulatory-protein-binding site, IRE) (CNNNNNCAGTG)的特征序列(图 1)。

3.2 *Sc-Nramp2* 基因的功能域、结构域与高级结构预测

Sc-Nramp2 基因共编码 591 个氨基酸,推导出蛋白质分子量为 65.86 kDa,理论等电点 $pI=4.93$ 。ExPASy ProtScale 软件预测显示,该蛋白质在氨基酸组成上,非极性氨基酸所占比例较高,表现为疏水性;SignalP 软件预测该蛋白没有明显的信号肽;DAS 软件预测该蛋白有 10 个明显的跨膜区域。NCBI Blastx 预测该蛋白的功能域结果显示,*Sc-Nramp2* 基因有 1 个较为保守的结构域,利用 NetNGlyc 1.0 Server 软件分析得到 2 个 N-糖基化位点,分别在 4-7aa,557-560aa。Swiss model 软件预测得到的 *Sc-Nramp2* 蛋白的二级结构包含 291 个氢键、19 个 α -螺旋和 28 个转角(图 2)。

3.3 *Sc-Nramp2* 基因氨基酸序列同源性及系统进化树分析

利用 MAGE6.0 软件将 *Sc-Nramp2* 的氨基酸序列同其他物种 Nramp1 和 Nramp2 的氨基酸序列进行比对及用 NJ 法构建系统进化树(图 3)。氨基酸序列比对表明,*Sc-Nramp2* 与太平洋牡蛎 *Nramp2-like* (*Crassostrea gigas*, NP_001292237.1)、章鱼 *Nramp2-like* (*Octopus bimaculoides*, XP_014772339.1)、光棘球海胆 *Nramp1* (*Strongylocentrotus purpuratus*, XP_003728002.1)等软体动物的同源性为 57%~71.6%,与鱼类的同源性在 53.4%~54.5%之间,与鸟类的同源性为 52.2%~53.5%,与两栖类的同源性为 53.9%~54.9%,与哺乳类 Nramp1 的同源性(52.7%~53.2%)要低于哺乳类 Nramp2 的同源性(55.6%~56.1%)。从进化树中可以看出,鱼类聚为一支,再与哺乳类 Nramp2 聚为一大支,而高等脊椎动物中鸟类、两栖类与哺乳类 Nramp1 聚为一大支,推测其具有类似的功能。

3.4 *Sc-Nramp2* 基因在 6 个组织中的表达差异分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 *Sc-Nramp2* 基因在 6 个组织中的相对表达量,结果显示,在 6 个组织中均有表达,其中肝胰腺的表达量最高,其次是鳃,与其他组织有显著性差异(图 4)。

3.5 *Sc-Nramp2* 基因在副溶血弧菌刺激后的表达特征分析

缢蛏在被副溶血弧菌感染刺激后,不同时间取其肝胰腺组织,检测在刺激后的 *Sc-Nramp2* 基因的表达情况。如图 5 所示,实验组的表达量在刺激后 4 h 有明显上升并持续上升到 12 h,在 12 h 时的表达量

达到最大值,约为对照组的 12.7 倍,与对照组和空白组均呈显著性差异($P < 0.01$)。表达量在 12 h 后开始下降,48 h 和 72 h 后的表达量变化不大。

```

1      ACATGGGAAACTTACGTCATCTATCATGTGATTCTTTCTAACTCCAGTCACGGCTGTGAAATAAGCTGGAGGACGAGCTCTAGGAGG
91     AATCTCTATAAACACCGAGTGTATGACTACGGGTAACAAACCTATCGAGATCCCGCGGAAGTTTGACGACATAACAAACCTAC
1      M S I N T S D V M D Y G S T K P I E I P P K F D D I T K P T
181    CGAGAACCCTCGCTCAGTATGACGACATGCGGAAGACGCTCGGTGGGTATCTGGTCTGTGACGAGCTCCCGGTTACAGAGCGGA
31     E N P P Q Y D D I A E D G R L G Y T G A G D G A A R S E R E
271    GATTTCGAACGGTCTGATGAACATAACAGAGACAGCGATGTGTTTGACAACTTAAGAGGCGCAGGTGGAGATCCCTTCAGGACTGG
61     I L E R D L N R D S D V F D K L K K A Q V E I P S G T G
361    TTTTACTCTCCGGAAGCTTTGGCAATTTACGGGTCCCGGTTTCTAATGAGCATCGCTACCGCCGGAATCTCGAGTCAGACCT
91     F S F R K L W A F T G P G F L M S I A Y L D P G N L E S D L
451    GCAGCGCGGGCCATAGCCCAATTAAGTTGTATGGGTACTGATGTGTCCTAGTGTCTGGGGTAGTGTCTGACGCTGCTGGCTGCACG
121    Q A G A I A Q Y K L L W V L M W S T V L G L V L Q L A A R

                                     TM1
541    TCTCGGCTCGGTGACGGGCTTAATCTAGCAGATATGCCGATTAGATATCCGAAAGCCCTCGGATAGTACGTCGCTCATGATGGA
151    L G C V T G L N L A E I C R L E Y P K A P R I V T W L M M E
631    GATCGCCATCTCGGAGCGATATCCAGGAGGTATAGGGTCCCAATTGCCATCAACCTCTGTCTAACCATGTAATTCCTATATGGGC
181    I A I I G S D I Q E V I T A G S I A I N L S N H V I P I W A

                                     TM2
721    AGGGGTGTTAATCACAGGGGCTGACACATTCACCTTCTTGTCTGGAGAATTATGGGCTTCGGAAGCTGGAAGCTTGTGTGGAGCCCT
211    G V L I T G A D T F T F L F L E N Y G L R K L E A L F G A L
811    TATTACAACATGCGCCGTACATCTCTTATATCTATATAAGCGTGTACCAAGCCAAACCGAAATCTTGAAGGGTCTCTTGAACCTATG
241    I T T M A V T F L Y I Y I S V V P S Q T E I L K G L F E P W

                                     TM3
901    GTGTGAGGATTGTGGCAAGCATAAATTCAGCAACTAGTGGGCATCGTTGGAGCTGTTATCATGCCACACAATCTACCTCCATAGCGC
271    C E D C G K D Q I Q Q L V G I V G A V I M P H N I Y L H S A

                                     TM4
991    CCTCGTACTGTACGAACAATAGACAGAAAGAACAGTGAAGTGGTAAAGGAGGCCAACATGTATTATCCATAGAAATCAAGTATCGCCTT
301    L V L S R T I D R K N S E S V K E A N M Y Y S I E S S I A L
1081   GTTTGTGCTCTCTGATCAACCTTTTGAATGGCGGTGTTTCGCGGTGCGTTTTCAGTCCAGAAATCGTTGACCCGACCTTAGAGT
331    F V S F L I N L F V M A V F A A A F S S P E Y V D P S L R V

                                     TM5
1171   CGCGGGTCAATGGCTGTATGACAAGTATGCCCTGACGATGAAATCATCTGCGGTATAGGCATCTTGGCTGCTGGACAGAGCTCAACAT
361    A G Q W L Y D K Y G L T M K I I W G I G I L A A G Q S S T M

                                     TM6
1261   GACGGGAACGTACGCTGGGCGATTTGTGATGCAAGGATTCTGAAGATCCGCTGGGCCAAATGGAAGCGGTGTTACTGACGCGATCCAT
391    T G T Y A G Q F V M Q G F L K I R W A K W K R V L L T R S I
1351   CGCCATGGGGCAACCAATCGTGGTGGCGTAGTGGCAACAAAGACCTTGACCTATGAACAACCTGGCTCAATGCTCCAGAGTGTACA
421    A M G P T I V V A L V A T K D L D L M N N W L N V L Q S V Q

                                     TM7
1441   GCTTCGGTTCGACTGCTGCCCATCTCTGCAATTCACCGACGACGAGAAATCATGGGCAAAATTCAGAAACCGGAAGATGCTAAAAATCAT
451    L P F A L L P I L H F T S D K I M G K F A N G R L L K I I

                                     TM8
1531   AGTTTGGTTGACGCGGTTTGGTTATGGTAATCAACTATTACCTCGTTGTCTTTTGTGGGTTCTGGTGACAGCTGGTATGTTATCT
481    V W L L A G L V M V I N Y Y L V V L F V G S G D T W Y V Y L

                                     TM9
1621   GATCACTGCGGTAGTCTATTTGTCTACACTGCGTTGCTGCTGTACCTGGCTGTTGGACCAAGACAATTTTAAACCTGAAGCTCTATGT
511    I T A V V L F V Y T A F V L Y L A V G P K T I L N L K L Y V

                                     TM10
1711   AGCAATGAGATCCAAAGGCGACATTCAGTCTAGTGAGATGACAAAAGGAATCCCTGAAGTATCCCGCGGAATGAAGATGA
541    A M R F Q G D I D S V L G E I A Q K E S L A Y P P P N E D D
1801   TGAAGATGAAGAGGCTAATGATACCCAAACGATGACAGCATGATAGGCAATGGAATAGTACAGAGCTCCGCGTACCTTGTGTG
571    E D E E L N D T Q H D D S M D R Q L V N
1891   TCAACAATCCGGAACCTTTGGGTAAATCCGTCACCGCTGTTATCTATGTTGTTCTTTGGCGGCGCAGTTAGGTGCGAATTAGGACGGG
1981   CTTCTGAGGAGTGTGCAATTTCTTGGTATCTGGTGAATGACACATTTCCGCGCTTTTATAGTGAAAAGAGGATGACACAAGT
2071   GTTAAGCACTTAACGGAGTGTGAAGTATAACAATCTGTATGACTAGCTAGCTTAAAGCGGTCATCCGCAATTTAGACCGAA
2161   ATATTATTCGAATAACCAAGTGAAGTCACTGTACCTTAAAGAGTCTGTGTTAAATGCTGCTCAITGATGCTCATAGTGTGAAGCTG
2251   TGAACATAAATCCCAATTTCAAACAGCAACAGGATTTCTGTGCTCAGCCACGCTGCAGAGACGACCAATTTTGGCTAGGAAAACAC
2341   GTGACGACTCACTTTGAGATTACGTTATATCATCATTCGGGTATTTTGTCTGACGTTGGTATCTATTTTGCAGAGGTCACATCGT
2431   GCTTATTTATATATTAGAAATTTGAACATTTAGAAATTTGGATCAGATTTCTACTGTCTAAATAATATACGTTGTTCAAAACCGCC
2521   TTACTTATAAAGTATGACAGAACTATGCCCTAATTTCCCAAGCAGTAGTAAGATGTTACATGAGTTGATAGATGAAGTGAAGAACTG
2611   TCGAAAACCACTTTCAACCATTCACCACTTATAATAGGCGAGAACAGCAGCTTCTTGAATTTGGTCTGGTACACAACTTATTTAT
2701   CTGTATATTGCTTTTTCTGGTAATGGCACTTTTGTGCGCATATACGAATAATAATGACATATTCTACAAACAGGTGATGGAATAAT
2791   CGTCAGAATGTTTCATAATTACATAGCTACATTACGACAATGCGAGTAAATAATCAAAGTGAAGAGCCTTTGTTGGCGAGCTGAGTGG
2881   GTGAGATTGCAATTCATGTTGGATCTGTAATCTATTACCTAATTCGCTTTTCAGCATGTCTATAACAAACGTCGCAAAAATAAGTTCA
2971   ACCGATAAATAAGTAAAGTGAAGTCTTGGCACTTATCATGTAATGTCACCAATTCATACCTTTATATGACAGATGAAGTGAAGAACTTA
3061   GAAGAAAACAACAACAATTTCAAGAGTAGTGTCAAGTGGAACTCAGTGTTGCGTAATCTTCAATACCAGACGCGCGCATACTTGT
3151   TCATTTTCGCTATATTTTATAATATTGTCATTTCATATACCTTGAATTAATAGCTTTTAAAGAAAAATAACGTGAAATCCCAAC
3241   AATTACGCTATATAAGTGTGAAAAGTGGTAACACCCGACAAACAATATGTGGCAATCAATAACAACAGCATTTGTGTAAACCAAAATG
3331   TTATAAAGAGGTTC TAACGTTACGATATATAAACTGTTTGTGTTGTAAGTGTATATGAATTTGCTATTAAGGTTGTAATTA
3421   TTAAGGTAAGGTGAAAAGACCCCATCTTTGCTGATGCTTTTGTACTGATTCCTGAGTATGTATADCGGCAATATTTAATA
3511   CTAATGTGCAATGCTATTTTCGCAATCGATTGTTCTACCGTTTGTGTTATTTGTTGTTGTAAGTACATAAACATTTCTGTGATGCT
3601   AGAATGTGCAATAGTATTGAATATTTTATAATAAATAACCATTTC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 *Sc-Nramp2* 基因全长 cDNA 序列及其氨基酸序列推测

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Sc-Nramp2* gene

加框部分分别代表起始密码子、终止密码子和加尾信号,*代表蛋白翻译结束,单下划线代表跨膜区,分别标注为 TM1~10,

阴影加粗的是 2 个 N-糖基化位点,位于 3'-UTR 的 2 个 IRE 位点用阴影和下划线标出,polyA 尾巴用双下划线标出

The letters boxes are the start codon, the stop codon and the polyadenylation signal sequence, the * represents the end of the protein translation, the transmembrane regions (TM) are underlined with single lines and numbered 1—10, the N-glycosylation sites are marked with shaded and bold, the IRE sites located in 3'UTR are underlined and shaded, the double underlined part is polyA



图 2 Sc-Nramp2 蛋白的二级结构预测图
Fig.2 The prediction of Sc-Nramp2 protein secondary structure
红色为 α -螺旋, 蓝色为转角
The red represents the alpha-helix, blue represents the turn

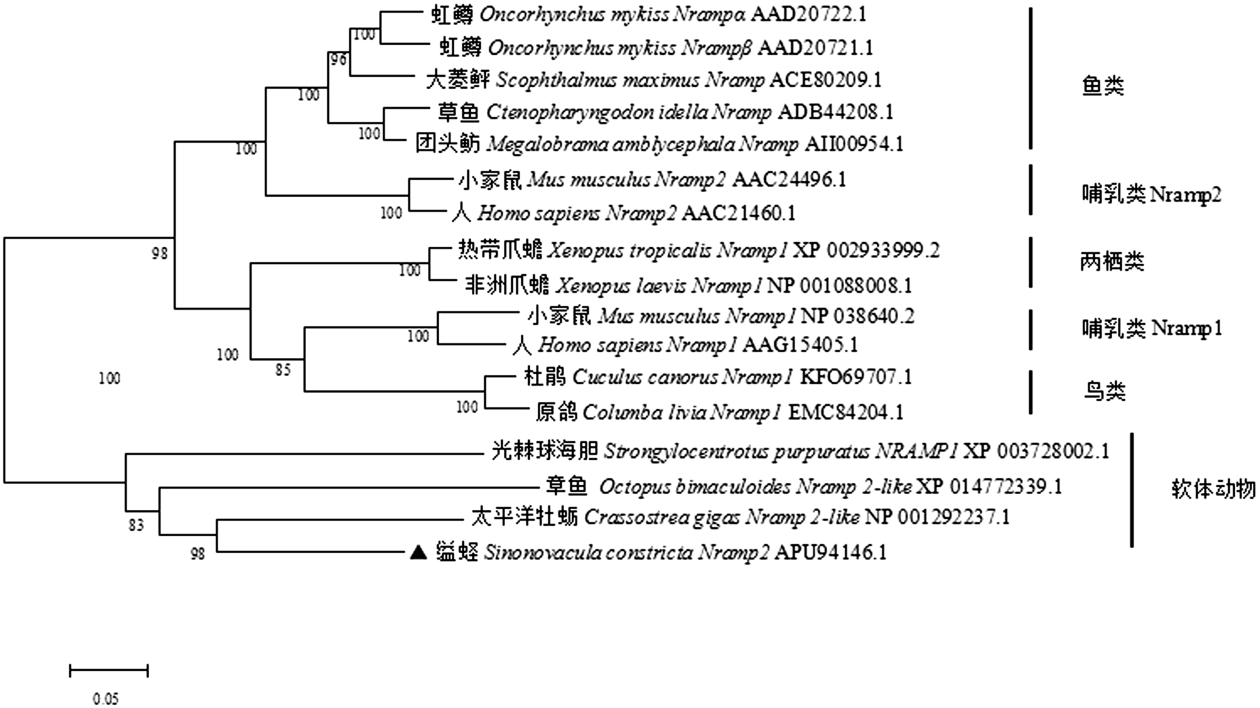


图 3 用 MAGE6.0 软件 NJ 法构建的缢蛏与其他物种 Nramp1 和 Nramp2 系统进化树
Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of Nramp between *S.constrxcta* and other species using MEGA6.0 software

4 讨论

本研究克隆得到的 Sc-Nramp2 基因的全长 cDNA,与已报道的其他动物 Nramp 氨基酸序列比对分

析,Sc-Nramp2 与其他动物的 Nramp2 较为相似,包含 10 个明显的跨膜区域,1 个较为保守的结构域和 2 个 N-糖基化位点,这些特征与小鼠^[4]、人^[25]、草鱼^[13]和虹鳟^[9]等大致相似。另外,在 Sc-Nramp2 的

3'-UTR 发现了 2 个 IRE 位点。有研究表明,5'UTR 和 3'UTR 端 IRE 位点与细胞中铁的代谢密切相关^[26],在哺乳动物 *Nramp2* 的相关研究中,发现铁的转运吸收与 IRE 位点紧密相关^[27-28]。Saeij 等^[29]推测,在鲤 *Nramp* 中的 IRE 可能通过与铁调控蛋白结合来调节 *Nramp* 的 mRNA 水平,当铁调控蛋白与 *Nramp*5'-UTR 端的 IRE 位点结合时可以阻止 RNA 的翻译,当与 3'-UTR 端的 IRE 位点结合时可以保护 RNA 免受降解。至于贝类 *Nramp* 基因的 IRE 位点是否与其在哺乳动物 *Nramp2* 中起着相同的作用还需进一步研究。

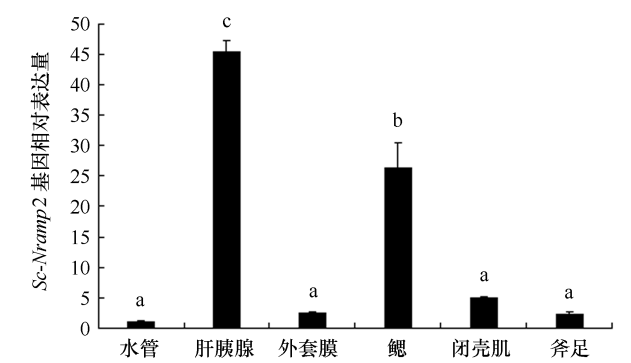


图 4 *Sc-Nramp2* 基因在 6 个组织中的表达特征分析
Fig.4 The distribution of *Sc-Nramp2* expression in six tissues of *S.constricta*
不同字母代表极显著差异 ($P<0.01$)
Different letters indicates an extremely significant difference ($P<0.01$)

Nramp1 基因在哺乳动物中呈现特异性表达,如人的肝脏、肾脏和胰脏^[30],牛的网状内皮中的巨噬细胞^[31],而 *Nramp2* 基因则在哺乳动物各组织中广泛表达。本研究在缢蛏闭壳肌、外套膜、肝胰腺、斧足、水管和鳃 6 个组织中均检测到 *Nramp2* 基因的表达但表达量不同,其中,在肝胰腺中的表达量最高,鳃组织表达量仅次于肝胰腺,而在水管、外套膜,在足和闭壳肌中的表达量最低。*Sc-Nramp2* 基因的这种组织表达形式与哺乳类 *Nramp2* 较为相似。此外,在草鱼^[13]和鲈鱼^[11]中发现 *Nramp* 基因在脾脏和肾脏中的表达量最高,而缢蛏中肝胰腺的 *Nramp2* 基因表达量最高,这与肝胰脏是大多数动物的重要解毒器官有关。关于缢蛏免疫相关基因与病菌感染之间的关系已有一些研究,金凯等^[32]研究发现缢蛏丝氨酸蛋白酶基因 *ScSp* 在被鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)诱导感染后 4 h 和 8 h,在肝胰脏中的表达量显著上调;冯冰冰^[20]研究发现缢蛏在被副溶血弧菌和鳃弧菌感染后,缢蛏热休克蛋白 70

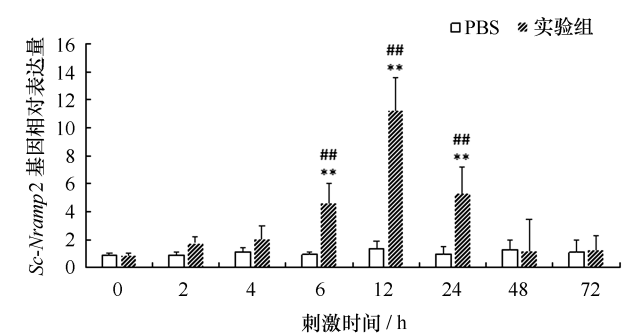


图 5 副溶血弧菌感染后,*Sc-Nramp2* 在肝胰脏中的表达量变化
Fig.5 Expression characteristic analysis of *Sc-Nramp2* in hepatopancreas by *V. Parahaemolyticus*
* * 表示该时间点基因表达量与 0 h 相比差异极显著 ($P<0.01$),# # 表示相同时间点实验组与 PBS 对照组基因表达量差异极显著 ($P<0.01$)
The “* *” indicates an extremely significant difference ($P<0.01$) from the blank group; the “# #” indicates that the experimental group is extremely different from the control group ($P<0.01$)

(*ScHsc70*)、小热休克蛋白(*Sc-sHSP*)和铁蛋白基因(*ScFERs*)在肝胰脏组织的表达量都显著高于其他组织且呈现上调趋势,这与肝胰脏是大多数动物的一个具有解毒功效的重要组织有关。本研究中的缢蛏 6 个组织表达情况也表明了 *Sc-Nramp2* 具有组织特异性表达模式,与上述研究有相似之处,表明肝胰脏是缢蛏合成免疫相关蛋白的重要组织。

对缢蛏进行副溶血弧菌感染实验后研究发现,实验组缢蛏肝胰脏 *Sc-Nramp2* 表达量相较于 PBS 对照组有明显的上调,在 12 h 达到最大值,是 PBS 对照组的 12.7 倍左右,随着时间的推移 *Nramp2* 表达量逐渐下降接近正常值,这与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[33]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[34]、草鱼^[13]的研究结果相似。由此推测,起始由于副溶血弧菌的感染诱导了缢蛏细胞内免疫相关基因的表达量上升,随后由于细胞病变效应且细胞生长受到了限制等,致使基因表达量下降,在小鼠中也报道过类似的现象^[35]。这些结果表明,*Sc-Nramp2* 基因参与了缢蛏的先天性免疫应答,与被感染后机体的免疫反应密切相关。缢蛏等贝类属于低等动物,在遭受外界病菌感染时,依靠先天免疫合成蛋白,而肝胰脏则是缢蛏重要的免疫器官,在对抗病菌入侵时发挥防御作用。至于 *Sc-Nramp2* 与副溶血弧菌感染之间的相互作用机理,及其在免疫系统中扮演的具体角色,还需开展大量深入研究。

5 结论

本研究首次克隆得到缢蛭 *Sc-Nramp2* 基因全长 cDNA 序列, 同源性分析表明和太平洋牡蛎 *Nramp2-like* 基因的相似度最高。 *Sc-Nramp2* 基因

在缢蛭 6 个组织中都有表达, 且在肝胰腺中的表达量最高; 经副溶血弧菌侵染后, *Sc-Nramp2* 基因在肝胰腺中表达量上升, 表明该基因在肝胰腺中参与了缢蛭的天然免疫过程。研究结果为进一步研究缢蛭 *Sc-Nramp2* 基因的功能和作用机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Skamene E, Pietrangeli C E. Genetics of the immune response to infectious pathogens[J]. Current Opinion in Immunology, 1991, 3(4): 511—517.
- [2] Blackwell J M, Goswami T, Evans C A W, et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance[J]. Cellular Microbiology, 2001, 3(12): 773—784.
- [3] Feng J, Li Y, Hashad M, et al. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene[J]. Genome Research, 1996, 6(10): 956—964.
- [4] Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, et al. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene[J]. Genomics, 1995, 25(2): 514—525.
- [5] Bairoch A. The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(13): 3097—3103.
- [6] Bellamy R. NRAMP1 and susceptibility to tuberculosis[J]. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2002, 6(9): 747.
- [7] Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice[J]. The Journal of Immunology, 1981, 127(6): 2417—2421.
- [8] Goto Y, Nakamura R M, Takahashi H, et al. Genetic control of resistance to *Mycobacterium intracellulare* infection in mice[J]. Infection and Immunity, 1984, 46(1): 135—140.
- [9] Govoni G, Vidal S, Gauthier S, et al. The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp1*^{Gly169} allele[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(8): 2923—2929.
- [10] 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]. Journal of Experimental Medicine, 1994, 180(5): 1741—1752.
- [11] Sun H S, Wang L, Rothschild M F, et al. Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene to pig chromosome 15[J]. Animal Genetics, 1998, 29(2): 138—140.
- [12] Dorschner M O, Phillips R B. Comparative analysis of two *Nramp* loci from rainbow trout[J]. DNA and Cell Biology, 1999, 18(7): 573—583.
- [13] Chen Songlin, Zhang Yuxi, Xu Jianyong, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 147(1): 29—37.
- [14] 刘洋. 外源基因表达载体的构建以及向斑马鱼 (*Dania rerio*) 和鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 胚胎的转移[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [15] Liu Yang. Exogenous genes construction, transfer in to embryos of Zebrafish (*Dania Rerio*) and Sea Perch (*Lateolabrax Japonicus*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004.
- [16] Chen Songlin, Xu Meiyu, Ji Xiangshan, et al. Cloning and characterisation of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(4): 305—313.
- [17] 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.
- [18] Fan Yuding, Xu Jin, Luo Xiaosong, et al. 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.
- [19] Donovan A, Brownlie A, Dorschner M O, et al. The zebrafish mutant gene *chardonnay* (*cdy*) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1) [J]. Blood, 2002, 100(13): 4655—4659.
- [20] 邱晴, 谢李珍, 傅兴隆, 等. 缢蛭副溶血弧菌的分离与鉴定[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(12): 46—47, 89.
- [21] Qiu Qing, Xie Lizhen, Fu Xinglong, et al. Isolation and identification of *Vibrio Parahaemolyticus* from *Sinonovacula constricta* [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2010, 16(12): 46—47, 89.
- [22] Anderson R S. Effects of anthropogenic agents on bivalve cellular and humoral defense mechanism[J]. Special Publication. American Fisheries Society, 1988, 18: 238—242.
- [23] 冯冰冰, 牛东红, 钟玉民, 等. 缢蛭 *ScHsc70* cDNA 的分子特性和表达分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 33—44.
- [24] Feng Bingbing, Niu Donghong, Zhong Yumin, et al. Molecular characteristics and expression analysis of *ScHsc70* cDNA in agamaki clam (*Sinonovacula constricta*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 33—44.
- [25] 冯冰冰. 缢蛭肝胰脏 cDNA 文库构建和免疫相关基因的克隆与表达研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- [26] Feng Bingbing. cDNA library construction of hepatopancreas and immune-relevant genes cloning and expression analysis in *Sinonovacula constricta* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011.
- [27] 冯冰冰, 钟玉民, 牛东红, 等. 缢蛭 β -ACTIN 1 基因的分子特性及其表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 650—659.
- [28] Feng Bingbing, Zhong Yumin, Niu Donghong, et al. Molecular characteristics and expression analysis of β -ACTIN 1 gene from *Sinonovacula constricta* [D]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(5): 650—659.

- [23] 牛东红, 冯冰冰, 李家乐. 缢蛏铁蛋白基因的分子特性及其表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 641—649.
Niu Donghong, Feng Bingbing, Li Jiale. Molecular characteristics and expression analysis of ferritin gene from *Sinonovacula constricta*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(5): 641—649.
- [24] Niu Donghong, Jin Kai, Wang Lei, et al. Identification of cathepsin B in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune responses[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 41(1): 94—99.
- [25] Kishi F, Tabuchi M. Complete nucleotide sequence of human *NRAMP2* cDNA[J]. Molecular Immunology, 1997, 34(12/13): 839—842.
- [26] Klausner R D, Rouault T A, Harford J B. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism[J]. Cell, 1993, 72(1): 19—28.
- [27] Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter[J]. Nature, 1997, 388(6641): 482—488.
- [28] Forbes J R, Gros P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions[J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(8): 397—403.
- [29] 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(1/2): 60—66.
- [30] 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]. Journal of Leukocyte Biology, 1997, 61(1): 96—105.
- [31] Barthel R, Feng Jianwei, Piedrahita J A, et al. Stable transfection of the bovine *NRAMP1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(5): 3110—3119.
- [32] 金凯, 牛东红, 王芴, 等. 缢蛏丝氨酸蛋白酶基因的序列特征及其表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(4): 481—487.
Jin Kai, Niu Donghong, Wang Lie, et al. Molecular characteristics and expression analysis of serine protease from *Sinonovacula constricta*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(4): 481—487.
- [33] 邢贺飞. 半滑舌鳎抗病相关 SNP 标记的筛选及两种免疫相关基因的克隆与初步分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
Xing Hefei. Screening and identification of disease-resistant related single nucleotide polymorphism markers, and cloning and preliminary analysis of two immune-related genes in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [34] 李同明. 尼罗罗非鱼 *Nramp* 基因的克隆分析与表达研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
Li Tongming. Molecular cloning and expression analysis of *Nramp* gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013.
- [35] Atkinson P G P, Blackwell J M, Barton C H. *Nramp1* locus encodes a 65 kDa interferon- γ -inducible protein in murine macrophages[J]. Biochemical Journal, 1997, 325(3): 779—786.

Cloning of natural resistance associated macrophage protein2 (*Sc-Nramp2*) gene from *sinonovacula constricta* and the expression analysis under *vibrio parahaemolyticus* stimulation

Lin Dehai¹, Liu Chenshan¹, Dong Yinghui¹, He Lin¹, Lin Zhihua¹

(1.Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: The cDNA sequence of natural resistance associated macrophage protein in *Sinonovacula constricta* (*Sc-Nramp2*) was cloned by SMART RACE techniques. The ORF of cDNA sequence, coding for a protein of amino acids, was 1 773 bp and the molecular weight was deduced for 65.86 kDa. *Sc-Nramp2* protein has the typical structural features with Solute carrier family 11 member, with 10 typical transmembrane domains and 2 glycosylation site. In 3'-UTR, *Sc-Nramp2* was the presence of two IRE which was similar to the vertebrate *Nramp2*. Homology analysis indicated that the identity of *Nramp* with *Crassostrea gigas* was 71.6%. Real-time quantitative RT-PCR analysis indicated that the mRNA was expressed in all the six tissues, including adductor muscle, mantle, hepatopancreas, foot, waterpipe and gill. *Nramp* was expressed with the highest expression level in the hepatopancreas, then the gill, which had extremely significant differences from other tissues ($P < 0.01$). The expression of *Nramp* in the hepatopancreas injected with *V. Parahaemolyticus* increased significantly ($P < 0.01$). It rose to maximum expression at the 12th hour and returned to the initial level. These results indicated that *Sc-Nramp2* is involved in innate immunity of this species.

Key words: *Sinonovacula constricta*; *Sc-Nramp2*; gene cloning; *Vibrio Parahaemolyticus*; gene expression