

鸡 NRAMP1 基因抗沙门氏菌的研究进展

游小燕 刘益平, 朱庆* (四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625014)

摘要 沙门氏菌病给畜禽产业带来了严重的危害, 而鸡 NRAMP1 基因能在抵抗沙门氏菌的侵害中发挥重要的免疫功能。综述了 NRAMP1 基因的结构、功能、作用机制及其在抵御沙门氏菌的研究进展。

关键词 NRAMP1 基因; 抗病性能; 沙门氏菌

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)19-4949-02

沙门氏菌是可以感染各种温血动物和人类的病原菌, 给养殖业带来的危害尤为严重。仅由沙门氏菌引起的家禽传染病就有多种。一旦此类疫情暴发, 不但造成家禽大批死亡, 还会因生长迟缓, 产蛋量下降等造成经济上的重大损失。另一方面, 人类的沙门氏菌性食物中毒多数与禽产品有关。为此, 多年来很多学者致力于控制沙门氏菌的传播、降低沙门氏菌的感染方面的研究。首先, 人们从药物治疗上进行了探索, 发现磺胺及喹诺酮类药物对发病鸡使用后可降低死亡率, 但却不能彻底杀灭病菌, 康复鸡多数仍然带菌, 并能继续传播, 而且长期使用这类药物还会影响饲料和饮水的摄入量, 抑制生长, 降低产蛋量。于是人们又从免疫上寻找解决方法, 但效果都不理想。比较好的办法是培养无特定病原的健康鸡群, 所以国内外许多遗传学家和育种学家致力于寻找与免疫相关的控制综合抗病力(畜禽先天的, 无病原特异性的综合防御能力) 的候选基因的研究。

目前, 已发现的与免疫相关的综合抗病基因不多。主要有 MHC 和 NRAMP1。其中 NRAMP1 基因是一个较为保守的基因, 在各种进化程度不同的物种如: 细菌(包括分支杆菌)、酵母、植物、昆虫、蠕虫、鸟类、哺乳类以及在人上都能找到它的踪影^[1-5]。而 NRAMP1 蛋白可抵抗沙门氏菌、利什曼原虫、分支杆菌等多种胞内病原菌的侵害而发挥重要的免疫功能^[6,7], 且对疾病的抗性是非病原特异性的, 所以可作为畜禽综合抗病力的良好候选基因。

1 NRAMP1 基因

1.1 抗病基因 NRAMP1 的发现 NRAMP1 基因家族首先在动物中发现并得以克隆。最初发现小鼠对胞内病原微生物的侵害所具有的抗性或敏感性是受 1 号染色体上显性基因 BCG, JTY 或 LSH 控制的, 由此将该类基因命名为 NRAMP1 (Natural resistance associated macrophage protein) 天然抗性相关的巨噬蛋白。NRAMP1 基因在网状内皮细胞器官的巨噬细胞中表达, 如血液外周白细胞、脾脏、肺等, 可抵抗多种胞内病原微生物。

1.2 NRAMP1 基因的序列结构 通过对 NRAMP1 基因分子遗传连锁图谱和原位荧光杂交分析现已得出其遗传图谱和物理图谱。该基因位于鸡的第 7 号染色体的 Q13(这一位置还包含了其他 3 个基因 CD28、NDUSF1 和 EFF1B), 老鼠的 1 号染色体上, 人的 2 号染色体上, 猪的 15 号染色体上, 牛的 2 号染色体上, 绵羊的 2 号染色体 Q11-Q12 区段^[8]。NRAMP1

基因与长茸毛基因有着非常密切的联系。经分析发现 NRAMP1 基因家族编码具有典型的膜整合蛋白特征的多肽分子, 具有 12 个推定的跨膜区(Transmembrane, TM), 3 个糖基化的胞质外环结构和 1 个胞质内的转运蛋白特征结构域, 具有高度的氨基酸序列同源性和相似的二级结构。跨膜区 1~8 具有高度的同源性, 这些跨膜区可能在 NRAMP1 家族蛋白结构和功能方面起着重要作用。

1.3 NRAMP1 的可能功能与作用机制 通过对小鼠 NRAMP1 基因的敲除和基因重组证实了其功能^[9], NRAMP1 基因可能是通过消耗含有胞内病原微生物的吞噬体中 2 价阳离子, 如亚铁离子、锰离子、钴离子等, 使病原微生物缺乏增殖所必需的离子而达到抵抗胞内微生物的作用。这种依靠金属离子的多种细胞功能可以解释 NRAMP1 基因的多效性, 包括其在传染疾病和自动免疫疾病方面的复杂作用。

通过对病菌侵染具有抗性和易感性的小鼠 NRAMP1 基因的序列比较分析及基因标签试验结果表明, 单个密码子突变(Gly169-ASP) 即可导致基因功能的丧失, 但 NRAMP1 家族基因通过何种方式, 即具体的作用机理迄今仍不很清楚。

2 鸡 NRAMP1 基因的研究现状 1996 年, HU^[11] 等对鸡的 NRAMP1 基因进行了克隆分析表明: 鸡 NRAMP1 基因由 554 个氨基酸组成, 有 15 个外显子分散在 5 kb 的 DNA 序列中, 它能够编码具有完整膜的磷酸糖蛋白, 含有 12 个推定的跨膜区域和 2 个糖基化位点, 具有离子通道和转运功能的特征。同时 NRAMP1 基因在鸡、老鼠和人类有 68% 的同源性。Northern 杂交得出 NRAMP1 基因在网状内皮组织(如脾和肝肺、肺和胸腺) 中表达, 如同老鼠和人的一样, 鸡的巨噬细胞也是 NRAMP1 基因 mRNA 的主要表达场所。这一基因在鸡的胸腺中能高水平地表达, 但在哺乳动物的胸腺中却不能表达。

通过对肠炎沙门氏菌抗性鸡群和感性鸡群脾中 NRAMP1 基因 mRNA 水平的研究表明: 抗性鸡群和感性鸡群 NRAMP1 基因的表达水平相同。Bunstead 和 Barrow^[13] 在 1993 年的时候按照鸡群对 *Salmonella typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* 和 *S. enteritidis* 这 4 种血清型的抗性和易感性鸡群分为 6 组, 其中 6₁、W 和 N 这 3 组是对这 4 种血清型具有抗性的, 15I、7₂ 和 C 是对它们非常容易感染的。通过对这 6 组鸡群 NRAMP1 基因编码区核苷酸序列分析得到它们有 11 处发生突变(表 1)。其中有 8 个位点并没有发生氨基酸的变化, 另外 3 个位点有氨基酸的变异, 分别是: 191 位的 Thr55 Ala55, 696 位的 Arg223 Gln223, 946 位的 Val307 Ile307。第 1 个氨基酸变异位点(Thr55 Ala55) 位于 NRAMP1 蛋白质的

作者简介 游小燕(1980-), 女, 重庆垫江人, 硕士研究生, 研究方向: 家禽遗传育种。* 通讯作者, 博士生导师, 教授, E-mail: zhuqing5959@vip.163.com.

收稿日期 2006-05-31

氨基末端,该区域上 NRAMP 基因相关的多肽在长度和序列方面因品种的不同而有较大的差异。第 2 个氨基酸变异位点(Val307 Ile307)位于第 7、8 个推定的转膜区域之间。对沙门氏菌具有抵抗性的 N 和 61 这两组中,在 55 位有 Thr 和在 307 位上有 Val,但是在具有抗性的 W 和 3 个易感性组都存在 55 位 Ala 的变异和在 307 位存在 Ile 的变异。也就是说:可能 55 位的 Thr 转变为 Ala 和 307 位的 Val 转变成 Ile,它们的改变与鸡群对沙门氏菌有无抵抗性没有直接的关系。第 3 个氨基酸的变异是因为核酸序列中 696 位的 G 突变为 A,最终导致位于第 5~6 推定的转膜区域中的 Arg223 Gln223,这一突变也只在易感的 C 鸡群中发现。第 5 推定的转膜区域在不同物种(如哺乳动物、果蝇、酵母和植物)间也是高度的保守区域,研究结果表明:第 5 推定的转膜区域在抵抗沙门氏菌的侵染方面可能起着非常重要的作用,也就是说如果这一区域第 223 位的密码子发生了突变的话,鸡群就会对沙门氏菌易感。

表 1 感性和抗性鸡群 NRAMP1 核酸序列变异

组别	Thr/ Ala55	Thr67	Thr209	Arg/ Gln223	Ser267	Leu297	Val/ Ile307	Phe311	Gly312	Ile356
N	GCG	ACC	ACT	CGG	TCA	CTC	ATC	TTC	GGC	ATT
6 ₁	GCG	ACC	ACT	CGG	TCA	CTC	ATC	TTC	GGC	ATT
W	ACG	ACT	ACT	CGG	TCA	CTG	GTC	TTC	GGC	ATC
7 ₂	ACG	ACT	ACC	CGG	TCA	CTG	GTC	TTC	GGC	ATC
15I	ACG	ACC	ACC	CGG	TCA	CTG	GTC	TTC	GGT	ATC
C	ACG	ACC	ACT	CAG	TCC	CTC	GTC	TTC	GGC	ATC

注:N、6₁、W 对沙门氏菌有抵抗性;7₂、15I、C 对沙门氏菌易感。

3 展望

由沙门氏菌引起的鸡白痢、禽伤寒和禽副伤寒给家禽生产带来了极大的经济损失。一直以来采用抗生素和疫苗来抵御沙门氏菌的侵害,这不仅增加了生产成本,还因为药物残留和耐药性等问题的出现而影响产品品质和消费者健康。采用遗传学原理和方法从遗传素质上提高鸡对沙门氏菌的抵抗力从而培育出整体免疫力高的品种,将成为今后的一大研究目标。但 NRAMP1 的具体作用机理目前并不清楚,因此对鸡的 NRAMP1 基因与抗沙门氏菌的关系需深入研究。

参考文献

- [1] CELIER M, BELOUCH A, GROS P. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Namp[J]. *Trends Genet*, 1996, 21: 201.
- [2] BELOUCH A, CELIER M, KWAN T, et al. The macrophage-specific membrane protein Namp controlling natural resistance to infections in rice has homologues expressed in the root system of plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 1181.
- [3] WEST A H, CLARK D J, MARIEN J, et al. Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 24625.
- [4] RODRIGUES V, CHEAH P Y, RAY K. The Drosophila homologue of mouse Namp-1 (Btg) is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behavior[J]. *EMBO J*, 1995, 14: 3007.
- [5] HUJ, BUMSTEAD N, SKAMENE E, et al. Structural organization, sequence, and

expression of the chicken NRAMP1 gene encoding the natural resistance-associated macrophage protein 1[J]. *DNA Cell Biol*, 1996, 15: 113.

Grard^[12]等通过对 373 只 13 周龄的商品鸡和 312 只 L2 血清型的鸡静脉注射肠炎沙门氏菌,3 d 后分析脾、肝脏和生殖器官中沙门氏菌的数量,结果表明:商品代蛋禽内脏对肠炎沙门氏菌的抵抗有着遗传上的差异,这些差异至少有很大一部分取决于 NRAMP1 基因的遗传多态性。

Liu^[13]等利用远交公鸡和 3 个不同的高度近交母鸡产生的 F1 代来评估肠炎沙门氏菌(SE)接种后的脾、肠的细菌附着量或 SE 疫苗接种后的抗体水平。在 NRAMP1 基因 3.1 kb 的基因组 DNA 上发现了 37 个单核苷酸多态性(SNP),利用 PCR-RFLP 法识别保守转运区的 SNP。在 8170 父本和 2 种来航鸡杂交后代中,公鸡 NRAMP1 基因的 SNP 与 SE 疫苗接种后的抗体水平相关($P < 0.02$);在 8296 公鸡的后代中, NRAMP1 的 SNP 与脾的细菌附着量相关($P < 0.02$)。研究结果表明, NRAMP1 基因高度保守区的 SNP 与青年鸡 SE 疫苗接种及病原攻击后的免疫应答有相关性。由此可以推测 NRAMP1 基因或相邻的基因控制 SE 疫苗的应答性状。

- [6] VIDAL S, MALO D, VOGAN K, et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate gene for Btg[J]. *Cell*, 1993, 3: 469-475.
- [7] VIDAL S, TREMBLAY ML, GOVON G, et al. The Ity/ Lsh/ Btg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the NRAMP1 gene[J]. *Exp Med*, 1995, 182: 655-666.
- [8] HUJ, BUMSTEAD N, BURKE D, et al. Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken[J]. *Mamm Genome*, 1995, 6(11): 809-815.
- [9] SUPEKF, SUPEKOVA L, NELSON H, et al. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5105.
- [10] HUJ, BUMSTEAD N, SKAMENE E, et al. Structural organization, sequence, and expression of the chicken NRAMP1 gene encoding the natural resistance-associated macrophage protein 1[J]. *DNA Cell Biol*, 1996, 15(2): 113-123.
- [11] JINXIN HU, NAT BUMSTEAD, PAUL BARROW, et al. Resistance to *Salmonella* non-typhoid in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC[J]. *Genome Research*, 1997, 7(7): 696-704.
- [12] OGRARD SANTOSUCOSO, LANIER F, LANIERI, et al. Heritability of susceptibility to *Salmonella enteritidis* infection in fowls and test of the role of the chromosome carrying the NRAMP1 gene[J]. *Genet Sel Evol*, 2002, 34(2): 211-219.
- [13] LIU W, KAISER M G, LAMONT S J. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella enteritidis* in young chicks[J]. *Poult Sci*, 2003, 82(2): 259-266.