

猪 *Nramp1* 基因多态性与免疫功能的相关性

吴宏梅¹, 王立贤¹, 程笃学¹, 马小军²

(¹中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094; ²甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要: 【目的】探讨 *Nramp1* 基因第 6 内含子多态在大白猪和松辽黑猪 (是由杜洛克、长白猪和民猪合成) 中的分布及其与猪免疫抗病的关系。【方法】采用 PCR-RFLP 法对 165 头大白猪和 109 头松辽黑猪 *Nramp1* 基因第 6 内含子多态性与免疫功能 (中性粒细胞还原力和单核细胞细胞毒百分率) 的相关性进行了研究。【结果】两个品种在该位点均存在多态性, 品种间、合并基因型间免疫功能差异不大, 但同一品种内不同基因型间差异显著; 大白猪 BB 基因型个体的单核细胞细胞毒百分率显著高于 AB 基因型个体 ($P < 0.05$), BB 基因型个体的中性粒细胞 NBT 还原力值极显著高于 AB 基因型个体 ($P < 0.01$), 而在松辽黑猪中则是 AB 基因型个体的中性粒细胞 NBT 还原力值显著高于 BB 基因型个体 ($P < 0.05$); 从断奶到出栏的死亡率分析显示大白猪 BB 基因型个体死亡率明显低于 AB 基因型个体, 松辽黑猪则是 AB 基因型个体的死亡率明显低于 BB 基因型个体。【结论】品种内不同 *Nramp1* 基因型与免疫功能间存在着显著相关, *Nramp1* 基因可作为抗病力性状的一个主要候选基因。

关键词: 猪; *Nramp1* 基因; PCR-RFLP; 免疫功能

Relationship Between Polymorphisms of *Nramp1* Gene and Immune Function of Pig

WU Hong-mei¹, WANG Li-xian¹, CHENG Du-xue¹, MA Xiao-jun²

(¹Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094;

²College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract: 【Objective】To study the distribution of polymorphism in natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) in two pig breeds and the association of this polymorphism with some immune functions. 【Method】PCR-RFLP technique was applied to analyze the correlation between the polymorphisms of *Nramp1* gene and immune function (value of polymorphonuclear leukocytes (PMN) by nitroblue tetrazolium (NBT) reduction and effect of cytotoxin of monocyte) in 165 individuals of Large White Pig and 109 individuals of Songliao Black pig. 【Result】There was one Nde I restriction loci in both Large White pig and Songliao Black pig. The immune traits was not significantly different in different breeds and different genotypes, but the difference was significant among different genotypes in the same breed. In Large White pig, both of values of polymorphonuclear leukocytes (PMN) by nitroblue tetrazolium (NBT) reduction and effect of cytotoxin of monocyte in genotype BB were higher than genotype AB ($P < 0.05$). The death rate of genotype BB was lower than that of genotype AB. By contraries in Songliao Black pig, the value of polymorphonuclear leukocytes by nitroblue tetrazolium reduction of genotype AB was higher than that of genotype BB ($P < 0.05$), and the death rate of genotype AB was lower than that of genotype BB. 【Conclusion】The results indicated that there was a significant correlation between different genotypes of *Nramp1* gene and immune function in the same breed, and it could be treated as a candidate gene of disease resistance.

Key words: Pig; *Nramp1* gene; PCR-RFLP; Immune traits

收稿日期: 2006-07-17; 接受日期: 2007-01-09

基金项目: 国家“863”项目 (2003AA243030) 和“十五”国家科技攻关项目 (2004BA514A-13)

作者简介: 吴宏梅 (1980-), 女, 陕西延安人, 博士研究生, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail: whm0212@sina.com。通讯作者王立贤 (1965-), 男, 山西山阴人, 研究员, 研究方向为猪的遗传育种。Tel: 010-62816011; E-mail: iaswlx@263.net

0 引言

【研究意义】在长期的动物育种中,人们一直只注重对主要经济性状的选育,在畜禽生产力得到不断提高的同时却往往导致了畜禽抗病力的下降,而且集约化程度的提高和饲养条件的改变又引起了许多新传染病的发生和流行。随着人们对食品安全的日益关注,传统的预防接种、药物治疗已不能有效控制和解决这些问题。迫切需要寻找新的防治办法。近年来,随着分子遗传学的飞速发展和一些与疾病抗性有关的基因或遗传标记的相继发现,采用分子生物技术实施畜禽的抗病育种,以从遗传本质上提高畜禽的抗病力已成为解决这些问题的有效途径,而当前的主要任务之一便是寻找控制综合抗病力(畜禽先天的、无病原特异性的综合防御能力)的主效基因或优秀候选基因。【前人研究进展】天然抗性相关巨噬蛋白(natural resistance associated macrophage protein, Nramp)基因家族成员最初发现于小鼠(*mus musculus*)中, Belouchi 等随后将该类基因命名为 Nramp 基因家族^[1]。Nramp 1 基因作为该家族的成员之一,可编码具有完整膜的磷酸糖蛋白,含有 10~12 个推定的转膜区域,具有离子通道和转运功能特征,是一个较为保守的基因^[2]。其主要存在于血液外周白细胞、脾脏、肺等网状内皮细胞器官,可抵抗多种胞内病原微生物^[3],作用机理是通过转运细菌自身合成防御酶系所必需的金属离子如 Mn^{2+} 或 Fe^{2+} 等使细菌无法合成防御酶系,从而使动物抗病菌侵染^[4]。现有研究表明,人、鼠、猪的 Nramp 1 基因均包括 15 个外显子和 14 个内含子,但人 Nramp 1 基因的全长为 13 604 bp,小鼠与猪的则分别为 12 kb 和 15 kb 左右^[5-7],其中猪的 cDNA 序列为 1 617 bp,共编码 539 个氨基酸,氨基酸序列与人、鼠的一致性达 87%和 85%^[8]。目前猪的 Nramp 1 基因已被定位于第 15 号染色体的 q23-26^[9]。由于 Nramp 1 基因主要在吞噬细胞如巨噬细胞和嗜中性粒细胞及外周血细胞中特异表达,既可影响动物的固有免疫,又与多种胞内寄生病原菌的抵抗作用有关,而且对疾病的抗性是非病原特异性的,所以是猪综合抗病力的良好候选基因之一。目前,国内外学者对 Nramp 1 基因的抗病性研究作了不少工作, Liu 等通过对鸡的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析发现,保守区的 SNP 与肠炎沙门氏菌疫苗接种及病原攻击后的免疫应答相关^[10]; Sanchez-Robert 等发现狗的利什曼菌感染病例组和对照组间的 Nramp 1 基因多态性

存在显著差异^[11]; Tatiane 等通过 SSCA 法分析荷斯坦牛、瘤牛 Nramp 1 基因 3'UTR 区的遗传变异,发现不同品种间基因频率差异显著,且不同基因型对布鲁氏菌的抗性和敏感性差异显著^[12]; 罗文华研究发现猪 Nramp 1 基因的第 6 内含子存在多态性位点^[7]。【本研究切入点】但这些研究多集中于小鼠、鸡、牛及狗上,而对猪 Nramp 1 基因的研究报道却很少,而且在猪上也仅仅是对该基因的多态性进行了研究,但并未以猪的 Nramp 1 基因为功能基因来研究基因结构与抗病性状的相关性。【拟解决的关键问题】本研究以松辽黑猪、大白猪两个中外猪种为试验材料,采用限制性内切酶 *Nde* I,对猪 Nramp 1 基因第 6 内含子 PCR-RFLP 多态性与单核巨噬细胞的细胞毒作用、中性粒细胞硝基蓝四氮唑(nitroblue tetrazolium reduction test, NBT)还原力等抗病力指标的相关性进行分析,拟研究 Nramp 1 基因第 6 内含子多态性与猪抗病力的关系,为利用标记辅助选择进行猪抗病育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 分子试验材料和方法

1.1.1 试验材料 大白猪(165 头)、松辽黑猪(109 头)血样均采自中国农业科学院畜牧研究所昌平试验基地种猪场。所有试验猪均在相同条件下、按常规生产要求统一饲养管理与防疫,出生时间相差控制在 20 d 内,30 d 断奶,且为消除接种前后的抗病差异,试验猪在 60 日龄接种疫苗,10 d 后前腔静脉采血 6 ml/只(10%EDTA 抗凝),并均匀分装成 2 份,其中 1 份用于免疫指标测定。

1.1.2 分子试验方法

(1) DNA 样品 猪血液基因组按照常规苯酚/氯仿抽提法提取,TE 溶解^[13]。

(2) 主要试剂 DNTP 购自北京三泰生物制品有限公司, Taq DNA Polymerase 购自清华大学北京天为时代科技有限公司,限制性内切酶 *Nde* I 购自宝生物工程(大连)有限公司。

(3) 引物设计与 PCR-RFLP 分析 根据猪 Nramp 1 基因第 6 内含子序列(GenBank: AY368470)设计引物,扩增片段长约 483 bp。引物由上海博亚生物技术有限公司合成,序列如下:上游 5'-GCCAGCTTCCACA GTCTCCAG-3'; 下游 5'-GGGGGTACAAAGGGGAA GAAG-3'。

PCR 反应体系(25 μ l): 10 \times buffer 2.5 μ l、2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μ l、5U· μ l⁻¹ Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l、

10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 1 μl 、基因组 2 μl (约 50 ng)、ddH₂O 16.3 μl 。

PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 64°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 30 s, 36 个循环后, 72°C 延伸 8 min, 4°C 保存。

取 6 μl PCR 产物加 2 μl 6× 溴酚蓝上样缓冲液, 上样于 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.05% EB), 5 V·cm⁻¹ 电压, 电泳 1 h, 紫外灯下观察电泳结果, 并拍照。

PCR-RFLP 分析: 选用 *Nde* I 限制性内切酶对 PCR 产物进行单酶切反应。反应体系为 15 μl , 其中扩增产物 8 μl , 限制性内切酶 4 u (0.4 μl), buffer 1.5 μl , 加水至 15 μl , 37°C 反应过夜。酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。选用 5 V·cm⁻¹ 电压电泳 2~3 h, 紫外灯下观察电泳结果, 并拍照。

1.2 免疫试验材料和方法

1.2.1 试验材料 将上述 1.1.1 部分采集血样中的 1 份用于分离单核细胞和中性粒细胞, 且血液采集后立即进行免疫指标的测定, 以免影响测定结果。另外, 单核细胞的细胞毒作用百分率检测只对 85 头大白猪进行了检测。

1.2.2 主要试剂 淋巴细胞分离液: 比重 1.077±0.001 (上海恒信化学试剂有限公司), RPMI-1640 培养液 (经科宏达经销 GIBCO), 小牛血清 (三利生物), K562: 人白血病细胞 (购自协和医院基础医学研究所), MTT (三泰生物公司), 硝基蓝四氮唑 (三泰生物公司), 二甲基亚砷 (北京化学试剂公司)

1.2.3 试验方法

(1) 细胞的分离 根据血细胞密度不同, 利用淋巴细胞分离液分离所需细胞。具体试验步骤参见文献 [14] 的“不连续密度梯度离心分离法”。

(2) 免疫指标测定原理与方法 中性粒细胞 NBT 还原力 (PN) 测定的原理与具体步骤参见文献 [14] 的“中性粒细胞的功能测定”; 单核细胞细胞毒作用 (CM) 测定: 利用 MTT 比色法测定单核细胞对 K562 (人白血病细胞) 的细胞毒百分率, 具体步骤参见文献 [15] 的“单核-噬细胞细胞毒作用检测”。

1.3 统计分析方法

对单核巨噬细胞的细胞毒作用, 因所作个体数量有限 (85 头), 只作大白猪品种内 AVONA 方差分析; 对中性粒细胞 NBT 还原力, 配合下列模型, 利用 SAS 软件 GLM 过程分析其基因型效应、品种效应等。固定模型为:

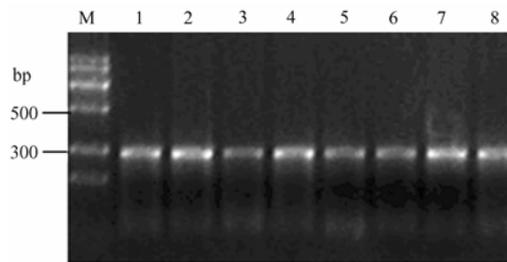
$$y_{ij} = g_i + b_j + (g \times b)_{ij} + e_{ij}$$

式中, y_{ij} 为中性粒细胞 NBT 还原力性状观察值; g_i 为基因型效应; b_j 为品种效应; $(g \times b)_{ij}$ 为基因型效应与品种效应的交互; e_{ij} 为随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的扩增结果

对整个试验猪群的基因组进行扩增, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶进行检测, 获得与目标片段大小一致的产物, 且产物条带清晰无杂带、稳定性和特异性好, 可直接用于酶切分析 (图 1)。



M 为 Marker; 1~8 泳道是随机个体扩增产物
M: 100 bp DNA Marker; 1-8: Individual PCR product

图 1 *Nramp1* 基因 483 bp 的 PCR 产物

Fig. 1 483 bp PCR product of *Nramp1* gene

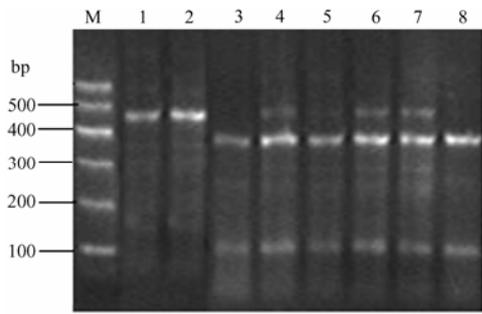
2.2 PCR 产物的酶切结果 利用限制性内切酶 *Nde* I 对 PCR 产物进行酶切, 并用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。发现在两品种内均存在 *Nde* I 酶切多态位点, 酶切位点的缺失 (A) 与存在 (B) 共产生 3 种基因型。其中 AA 基因型显示 1 条带 (483 bp), BB 基因型显示 2 条带 (373 bp、110 bp), 杂合子 AB 基因型显示 3 条带 (483 bp、373 bp、110 bp)。酶切图谱见图 2。

2.3 不同品种基因频率与基因型频率分析

由表 1 可以看出, 3 种基因型在两品种中均存在, 且基因频率和基因型频率差异不大。在两品种中 AA 型都很少, 各有一个, AB 型较多, BB 型较少, 基因 A 的频率均低于基因 B 的频率。

2.4 *Nramp1* 基因多态性与免疫性状的相关性分析

对 CM 的方差分析显示 (表 2), 大白猪中不同基因型间 CM 差异显著 ($P < 0.05$), BB 基因型个体显著高于 AB 型。对 PN 的最小二乘分析显示, 品种效应、合并基因型效应对 PN 影响不显著, 但品种和基因型间的交互效应对 PN 值影响极显著 ($P < 0.01$)。



1, 2: AA; 3, 5, 8: BB; 4, 6, 7: AB 1. 3. 6 为大白猪的基因型; 2, 4, 5, 7, 8 为松辽黑猪的基因型
1, 2: AA; 3, 5, 8: BB; 4, 6, 7: AB 1. 3. 6: genotype of Large White pig; 2, 4, 5, 7, 8: genotype of Songliao Black pig

图 2 *Nde* I 酶切 483 bp PCR 产物的琼脂糖凝胶 (2%) 电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel (2%) image of digested 483bp PCR product with *Nde* I

表 1 不同品种猪 *Nramp1* 基因 PCR-RFLPs 的基因型和等位基因频率

Table 1 Genotypes and allele frequencies of PCR-RFLPs of the *Nramp1* gene in two pig breeds

品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency		等位基因 Allele	基因频率 Gene frequency
	基因型 Genotype	个体数 No.		
LW	AA	1	0.006	A
	AB	110	0.667	B
	BB	54	0.327	
SB	AA	1	0.009	A
	AB	79	0.725	B
	BB	29	0.266	

LW: 大白猪 Large White pig; SB: 松辽黑猪 Songliao Black pig

大白猪中不同基因型的 PN 差异极显著 ($P < 0.01$), BB 基因型个体的 PN 值显著高于 AB 基因型个体, 与 CM 结果一致。松辽黑猪两种基因型的 PN 也差异显

表 2 品种内不同基因型间免疫性状结果比较

Table 2 Comparison of the immune traits in different genotypes of each breed

免疫性状 The immune traits	LW		SB	
	AB	BB	AB	BB
细胞毒百分率 Rate of MT (%)	(48) 80.40 ± 8.0a	(37) 85.50 ± 6.3b		
NBT 还原值 Reduction value	(110) 0.217 ± 0.114A	(54) 0.279 ± 0.136B	(79) 0.258 ± 0.093a	(29) 0.217 ± 0.095b

LW: 大白猪 Large White pig; SB: 松辽黑猪 Songliao Black pig。下同 The same as below

肩标中字母表示差异显著水平, 不同的大写字母之间表示显著水平 $P < 0.01$, 不同的小写字母间表示显著水平 $P < 0.05$

Different letters of superscript between the means indicate different level of significance, the small letters indicate the level is significant $P < 0.05$, the capital letters indicate the level of significance is $P < 0.01$

著 ($P < 0.05$), 相反的是 AB 基因型个体的 PN 值显著高于 BB 基因型个体。

2.5 死亡率分析

从断奶到出栏的死亡率 (表 3) 结果表明, 品种

间和合并基因型间死亡率相差不大; 品种内不同基因型间, 大白猪的 AB 基因型个体死亡率高于 BB 基因型个体, 而松辽黑猪的 BB 基因型个体的死亡率高于 AB 基因型个体, 与免疫性状结果一致。

表 3 品种内不同基因型间死亡率比较

Table 3 Comparison for death rate of different genotype of each breed

品种 Breed	基因型 Genotype	死亡个体数 Death number	正常个体 Normal	总和 Sum	死亡率 Death rate (%)	总死亡率 Sum death rate (%)
Lw	AB	11	99	110	10	9.15
	BB	4	51	54	7.41	
SB	AB	7	72	79	8.86	9.26
	BB	3	26	29	10.34	
总和 Sum		25	247	272		9.19

3 讨论

3.1 免疫指标选择 PN 和 CM 的理由

免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成。当有微生物入侵机体时, 不同的免疫细胞和免疫分子之间相互协作, 识别进入体内的微生物或外来抗原, 调动相应细胞和分子起作用, 限制微生物在体内的繁殖, 直至将其彻底消灭、清除。本研究选择中性粒细胞 NBT 还原力 (PN) 和单核细胞细胞毒作用作为免疫指标是考虑到: (1) 中性粒细胞是机体抗细菌和真菌的主要免疫细胞, 占血液白细胞总数的 2/3 以上, 在先天免疫中具有重要的作用。当炎症反应时, 其第一个到达感染或损伤部位, 吞噬并清除入侵的异物抗原; (2) 单核-巨噬细胞具有较强的吞噬和杀伤能力, 是微生物穿过体表之后所遇到的第一道防线, 而且其表面还有较多的 MHC I 类和 II 类分子, 与抗原递呈有很大关系; (3) Zhang 等的研究表明, 猪的 *Nramp1* 基因的 mRNA 在细胞和特异性组织中都可表达, 但在巨噬细胞和中性粒细胞中表达量最高^[16]。因此, 进行 *Nramp1* 基因多态性与中性粒细胞以及单核巨噬细胞吞噬功能的相关性研究具有重要意义。

3.2 *Nramp1* 基因多态性中 AA 型较少原因的探讨

本研究所得的基因多态为 *Nramp1* 基因序列第 278-279 位的 CA→TG 突变造成 *Nde* I 酶切位点缺失引起的。该多态在大白猪和松辽黑猪中均存在, 且基因频率和基因型频率在两品种中的分布趋近, 均是 AA 型很少 (各有 1 个)、AB 型较多、BB 型较少, 等位基因 A 的频率均低于等位基因 B 的频率, AA 基因型频率很低。这与罗文华的研究结果一致^[7]。出现这种基因型分布极不平衡的原因可能是 AA 基因型是一种不利基因型, 所以在选择过程中没有被选留。本研究中的突变位点在 *Nramp1* 基因的第 6 内含子内, 对氨基酸序列不会有太大影响, 如果它与某些性状有联系, 可能是与影响该性状的功能位点存在连锁不平衡引起的或者是点突变对内含子剪接及蛋白质高级结构产生影响, 并不是由其本身功能引起的。

3.3 *Nramp1* 基因不同基因型在不同品种群中的免疫功能相反的探讨

许多研究表明, *Nramp1* 基因和抗病性能之间存在一定的关系。但是目前尚无关于猪的 *Nramp1* 基因和免疫功能相关性研究的报道。在此背景下, 本研究初步分析了大白猪和松辽黑猪 *Nramp1* 基因多态性与相关免疫功能的关系。结果表明, *Nramp1* 基因的不

同基因型与免疫功能在两品种间差异不显著, 但在品种内却差异显著, 而且不同基因型在两品种群中的免疫功能表现相反: 大白猪 BB 基因型个体的单核细胞细胞毒百分率 (CM) 和中性粒细胞 NBT 还原力值均显著高于 AB 型; 而松辽黑猪 AB 基因型个体的中性粒细胞 NBT 还原力值 (PN) 显著高于 BB 型。这与表 3 中的死亡率分析结果一致。据此推测, 大白猪的 BB 基因型个体较 AB 基因型个体抗病力强、死亡率低, 而松辽黑猪的 AB 基因型个体较 BB 基因型个体抗病力强、死亡率低。通过分析, *Nramp1* 基因不同基因型在不同品种群中免疫功能表现不同可能是由于:

(1) 不同基因型与个体免疫功能表现间的效应可能与品种的遗传背景有关; (2) 机体的免疫抗病性状的遗传机制和作用机制极其复杂, 可能除 *Nramp1* 基因第六内含子的多态性起一定作用外, 还存在 *Nramp1* 基因的其它位点或其它一些基因影响该免疫功能; (3) 动物的抗性基因与病原体间还可能存在着复杂的互作等。

4 结论

由于畜禽的抗病性能是一个复杂的数量性状, 受遗传和环境因素的共同影响, 而且猪对疾病的抗性属中等遗传力, 因此利用常规表型选育技术对其加以改良难以获得理想的效果, 但利用标记辅助选择 (MAS) 进行分子抗病育种却可以较好的解决这个难题。当然, 找到与这种数量性状座位相连锁的遗传标记则是实现其标记辅助选择的先决条件。本研究通过对大白猪和松辽黑猪 *Nramp1* 基因多态性与相关免疫功能相关性的初步分析发现, *Nramp1* 基因的遗传变异对猪的免疫功能具有一定影响, 是进行分子抗病育种的优良候选基因, 这将为进一步进行猪的抗病育种提供理论依据。但是本研究结果显示, 品种与基因型的互作效应对中性粒细胞 NBT 还原力值影响显著, 这可能与品种的遗传背景有关, 还需要在其它品种的大样本群体中深入研究其它位点的遗传变异对免疫功能的影响。

References

- [1] Belouchi A, Cellier M, Kwan T, Saini H S, Leroux G, Gros P. The macrophage specific membrane protein *Nramp* controlling natural to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29: 1181-1196.
- [2] Vidal S M, Pinner E, Lepage P, Lepage P, Gauthier S, Gros P. Natural resistance to intracellular infections. *Nramp1* encodes a membrane

- phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1*^{D169}) mouse strains. *Journal of Immunology*, 1996, 157: 3559-3568.
- [3] Blackwell J M. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (*Nramp1*), a candidate protein for infections and autoimmune disease susceptibility. *Molecular Medicine Today*, 1996, 2(5): 205-211.
- [4] Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 5105-5110.
- [5] Marquet S, Lepage P, Hudson T J, Musser J M, Schurr E. Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 gene region on chromosome region 2q35. *Mammalian Genome*, 2000, 11(9): 755-762.
- [6] Govoni G, Vidal S, Cellier M, Lepage P, Malo D, Gros P. Genomic structure, promoter sequence and induction of expression of the mouse NRAMP1 gene in macrophage. *Genomics*, 1995, 27: 9-19.
- [7] 罗文华. 猪 *Nramp1* 基因内含子测序及 *Nramp1* 和 *FUT1* 基因多态性研究. 华南农业大学硕士学位论文, 2004.
- Luo W H. Study on the sequencing of the intron of NRAMP1 gene and its *FUT1* gene's polymorphism in pigs. *Master's Degree Paper of Huanan Agriculture University*, 2004. (in Chinese)
- [8] Tuggle C K, Schmitz C B, Gingerich-Feil D. Rapid communication: cloning of a pig full-length NRAMP1 cDNA. *Journal of Animal Science*, 1997, 75: 277.
- [9] Sun H S, Wang L, Rothschild M F, Tuggle C K. Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene to pig chromosome 15. *Animal Genetics*, 1998, 29: 138-140.
- [10] 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. *Poultry Science*, 2003, 82: 259-266.
- [11] Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O. Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *Journal of Heredity*, 2005, 96(7): 755-758.
- [12] Paixão T A, Ferreira C, Borges A M, Oliveira D A A, Lage A P, Santos R L. Frequency of bovine *Nramp1* (*Slc11a1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 109: 37-42.
- [13] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术(第二版). 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002.
- Shen G X, Zhou R L. *The Experiment Technique of Modern Immunology*. (2nd ed). Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2002. (in Chinese)
- [15] 吴雄文, 梁智辉. 实用免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002.
- Wu X W, Liang Z H. *The Experiment Technique of Applied Immunology*. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2002. (in Chinese)
- [16] Zhang G L, Wu H, Ross C R, Minton J E, Blecha F. Cloning of porcine NRAMP1 and its induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 β : Role of CD14 and mitogen-activated protein kinases. *Infection and Immunity*, 2000, 68(3): 1086-1093.

(责任编辑 林鉴非)