

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00051

草鱼转铁蛋白基因的克隆及其组织表达

王娜 陈琼 胡成钰

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要: 转铁蛋白(Transferrin, Tf)功能广泛, 不仅参与机体内铁离子的运输和代谢, 还在细胞呼吸、细胞生长和增殖中起重要作用, 而且它具有抗菌杀菌的功能。研究从草鱼肝肾全长 cDNA 文库中克隆得到草鱼转铁蛋白基因(*CtTf*), 该基因全长 cDNA 5'非编码区包含 31 bp, 最大开放阅读框为 2025 bp, 编码 674 个氨基酸, 3'非编码区为 266 bp。研究使用了 Signal P、SMART 等在线软件对草鱼转铁蛋白全长 cDNA 的分子特征进行预测, 结果显示 *CtTf* 编码的蛋白质 N-端有 1 个由 15 个氨基酸残基组成的信号肽, 第 24—334 个和第 338—665 个氨基酸为 2 个保守的结构域, 二者同源率为 31%。与其他物种的转铁蛋白类似, 草鱼转铁蛋白每个结构域包含 4 个铁离子结合位点, 它们在两个结构域中的位置相对保守, 除了这 8 个铁离子结合位点外, 还存在多个完全保守的氨基酸位点。草鱼转铁蛋白与人及其他物种有很高的同源性, 与其他鲤科鱼类的同源性为 65%—73%; 与海洋鱼类同源性为 43%—50%; 与两栖、爬行、鸟类、哺乳类的同源性为 40%—42%。系统进化树也显示草鱼转铁蛋白基因与斑马鱼和鲤鱼的亲缘关系最近。RT-PCR 的实验结果表明, 在草鱼肝、肠、肾、脾、心、肌肉、鳃和脑 8 种组织中, 草鱼转铁蛋白基因在肝中的表达量最高, 其次为脾和肠, 在鳃和脑中有痕量表达。

关键词: 草鱼; 转铁蛋白; 表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0051-06

转铁蛋白(Transferrin, Tf)为 70—80 kD 的蛋白质, 包括 N-端和 C-端 2 个相似的结构域, 每个结构域都能结合一个铁离子。转铁蛋白的主要功能是将铁离子从吸收、储存的地方运到红细胞用以合成血红蛋白, 或到其他需要铁的部位, 因此, 它是铁离子运输和代谢过程中不可缺少的重要因子。此外, 转铁蛋白在细胞呼吸、能量平衡中起重要作用; 并具有抗菌杀菌的功能^[1]; 还是细胞生长和增殖所必需的生长因子^[2,3]。因此, 转铁蛋白的功能十分广泛而受到广泛的关注。迄今, 已鉴定和分离了人及多种动物的转铁蛋白基因及其蛋白质, 并对铁离子结合位点、功能机制等进行了一些研究^[4—6]。近年来, 多种鱼类转铁蛋白基因也获得了克隆^[7—9]。鱼类转铁蛋白基因全长约为 2100—2500 bp, 编码 666—691 氨基酸。对转铁蛋白基因特征、组织差异表达、遗传多

态性及其与鱼类先天免疫的关系等的研究^[10—13], 为探索其在鱼体内特殊的生理功能、提高鱼类抗病性和作为优良品种选育的指标等方面有重要的意义。

cDNA 文库作为获取基因全长及进行 EST 分析的基本方法之一近年已经得到广泛应用^[14,15]。本文从之前构建的草鱼肝肾 cDNA 文库中克隆草鱼转铁蛋白基因(*CtTf*), 并分析其分子特征和组织表达特性。结果表明: *CtTf* 与其他鱼类的有较高的同源性, 其组织表达特征也与其他脊椎动物和鱼类的相似, 即在肝脏中表达量最高, 在脾、肠、鳃和脑中也能检测到不同程度的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

草鱼肝肾 cDNA 文库(载体为 pBluescript II SK,

收稿日期: 2008-07-17, 修订日期: 2009-05-19

基金项目: 江西省重点科技攻关项目(No. 20061B0260301)资助

作者简介: 王娜(1983—), 女, 汉族, 黑龙江肇源县人; 硕士研究生; 研究方向为水生生物学。E-mail: wangna858858@126.com

通讯作者: 胡成钰, E-mail: hucy2008@21cn.com

宿主菌为 DH5 α)由上海联合基因公司构建。草鱼由江西省水产科学研究所提供, 体重约 5—10 g。于流水实验槽中暂养一周。

UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(上海生工)提取草鱼肝、肠、肾、脾、心、肌肉、鳃、脑 8 种组织的总 RNA。M-MLV 反转录酶(宝生物有限公司)反转录得到 cDNA。

1.2 方法

草鱼转铁蛋白基因的克隆 用 pBluescript II SK 载体的通用引物在草鱼肝肾 cDNA 文库中, 获得 1 个 > 2000 bp 的克隆。经测序为草鱼转铁蛋白全长 cDNA (EU790874)。

草鱼转铁蛋白的分子特征 使用 ORF finder、Signal P、SMART 等在线软件对草鱼转铁蛋白全长 cDNA 的开放阅读框、信号肽、保守结构域等进行推译和预测, 初步确定其性质和相关信息。

转铁蛋白系统进化和同源性分析 在 GenBank 中检索转铁蛋白, 经查对文献确认, 下载氨基酸序列和核苷酸序列。氨基酸序列经 Clustal W 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)排序比对分析同源性。再经 EMBOSS win 软件(<http://emboss.sourceforge.net/>)的 tranalign 程序转换成相应的核苷酸序列排布。然后用 PHYLIPY (<http://evolution.Genetics.Washington.edu/phyliip.html>)软件包采用邻接法(NJ)构建进化树, 自展重复设为 1000 次。

草鱼转铁蛋白基因的组织表达 根据草鱼转铁蛋白基因序列设计特异性引物(Tf-upper 和 Tf-lower)。其中 Tf-upper (5'-GCCTTC CAGTGCT-TGAAAAGTG-3'), Tf-lower(5'-TTCGG GTAGAGG-AAGGAGTCTG-3'), 扩增目的片段长度为 338 bp。 β -actin 为内参。使用凝胶定量软件 Quantity one 分析条带的光密度, 绘制柱形图显示草鱼转铁蛋白基因在不同组织中的相对表达量。

反应体系为 25 μ L: 水 19.25 μ L, 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 μ mol/mL 引物各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, *Taq* 酶 1.25U。PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30s, 28 个循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 10min。

2 结果

2.1 草鱼转铁蛋白基因的克隆

在草鱼肝肾 cDNA 文库中编号为 YG003B01 的

克隆其分子量>2 kb, 经测序为 *CtTf*(图 1)。

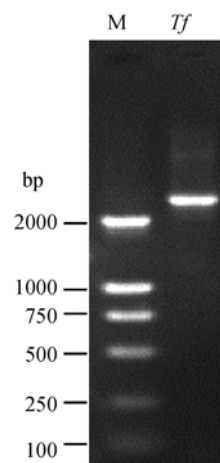


图 1 *CtTf* 的克隆

Fig.1 Clone of grass carp transferrin gene

M. DL2000; Tf. 草鱼转铁蛋白基因

M. DL2000; Tf. transferrin gene of grass carp

2.2 草鱼转铁蛋白分子特征及其同源性分析

CtTf 全长为 2322 bp, 其中 2284 bp 处为加尾信号(AATAAA), 3'端有 18 bp 的 poly(A)尾巴, ORF 位于 32—2056 bp 处, 编码 674 个氨基酸(EU790874)。

草鱼转铁蛋白 N-端有 1 个 15 氨基酸组成的信号肽, 缺乏糖基化位点。其中, 第 24—334 氨基酸, 第 338—665 氨基酸为 2 个保守的结构域, 二者同源率为 31%。同时, 铁离子结合位点在两个结构域中的位置也相对保守, 分别为 D50/D45(N-端结构域的第一个铁离子结合位点为 D50, 对应的 C-端结构域的第一个铁离子结合位点为 D45)、Y78/Y84、D176/Y179、R232/H249。除了这 2 个结构域中的 8 个铁离子结合位点相当保守外, 还存在多个完全保守的氨基酸位点(结果未列出)。

CtTf 与人的及其他物种的有很高的同源性。即与其他鲤科鱼类的同源性约 65%—73%, 与海洋鱼类同源性约 43%—50%, 与两栖、爬行、鸟类、哺乳类的同源性约 40%—42% (结果未列出)。

2.3 转铁蛋白系统进化

图 2 所示转铁蛋白分为三大簇。其中, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, NM_001086343)、高冠变色龙(*Chamaeleo calyptratus*, AM262322)、红原鸡(*Gallus gallus*, NM_205304)、鼠(*Mus musculus*, NM_133977)、牛(*Bos taurus*, BTU02564)、猪(*Sus scrofa*, X12368)、黑猩猩(*Pan troglodytes verus*, AB222114)、人(*Homo*

sapiens, NM_001063)为一簇。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, D89083)、褐鳟(*Salmo trutta*, D89091)、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*, D88801)、大西洋鲑(*Salmo salar*, L20313)等海洋鱼类为一簇。鲫鱼(*Carassius auratus*, AF518746)、日本白鲫(*Carassius cuvieri*, AY323916)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*, AF457152)、斑

马鱼(*Danio rerio*, BC064001)和 *CtTf* 等淡水鱼类与昆虫类和真海鞘(*Halocynthia roretzi*, AB047294)为一簇。其中, 真海鞘的转铁蛋白最原始, 为单一结构域。因此, 淡水鱼类转铁蛋白的进化相对于海洋鱼类地位较低。*CtTf* 与斑马鱼和鲤鱼的亲缘关系最近(图 3)。

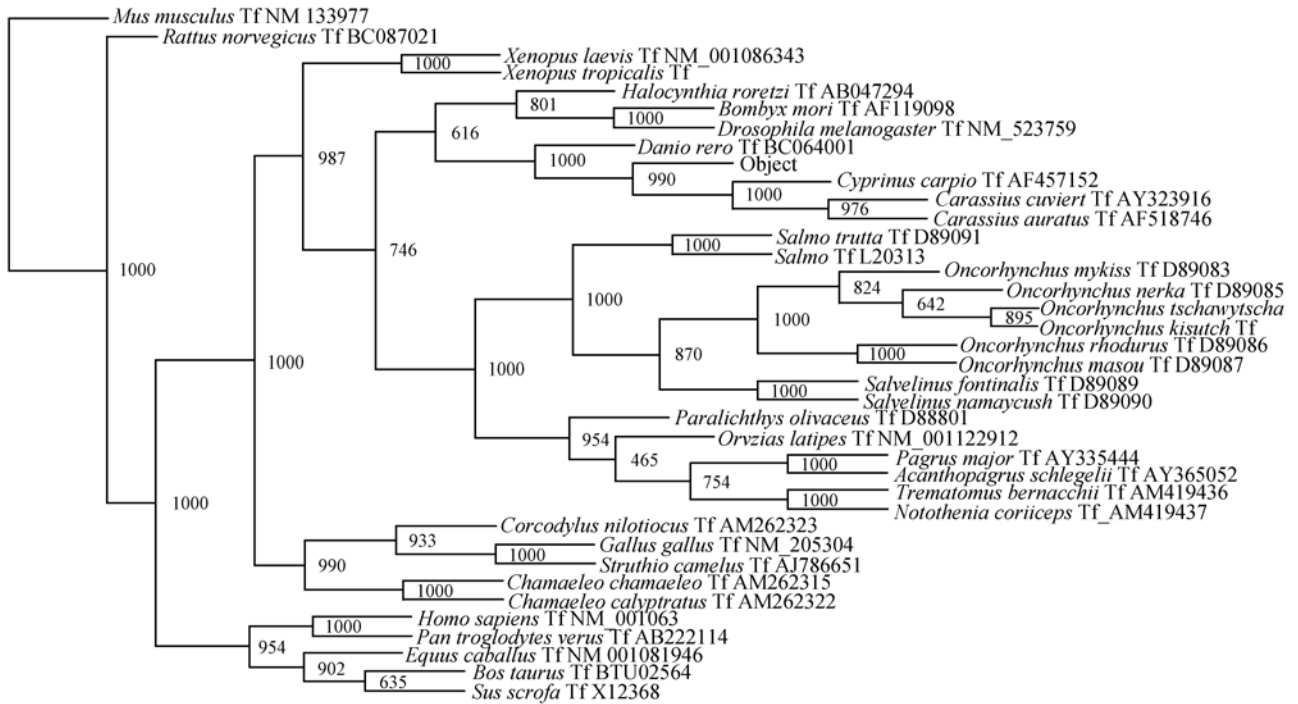


图 2 转铁蛋白基因的系统进化

Fig. 2 Phylogeny of transferrin gene

树枝上的数字为 bootstrap 验证的支持率, 表示在构建的 1000 个树中分隔成这两枝的次数。Object 为草鱼转铁蛋白。斜体为该物种(略)的拉丁文, 其下面的编号为 GenBank 登录号

The numbers upon the branch were support rate of bootstrap verification which indicated the number of times the partition of species into two sets among one thousand trees. "Object" represented grass carp transferrin gene obtained in our study. Italic letters were the latin names of these species, and the number under them were GenBank accession number

2.4 草鱼转铁蛋白基因的组织表达

图 3A 所示, RT-PCR 获得的目的条带在 300 bp 与 400 bp 之间, 与预期结果(338 bp)一致。图 3B 为内参 β -actin 在各组织的表达。图 3C 为 *CtTf* 在各组织中相对表达强度柱形图。图 3 表明 *CtTf* 在草鱼肝脏中表达量最高, 其次是脾和肠, 在鳃、脑中也有痕量表达。

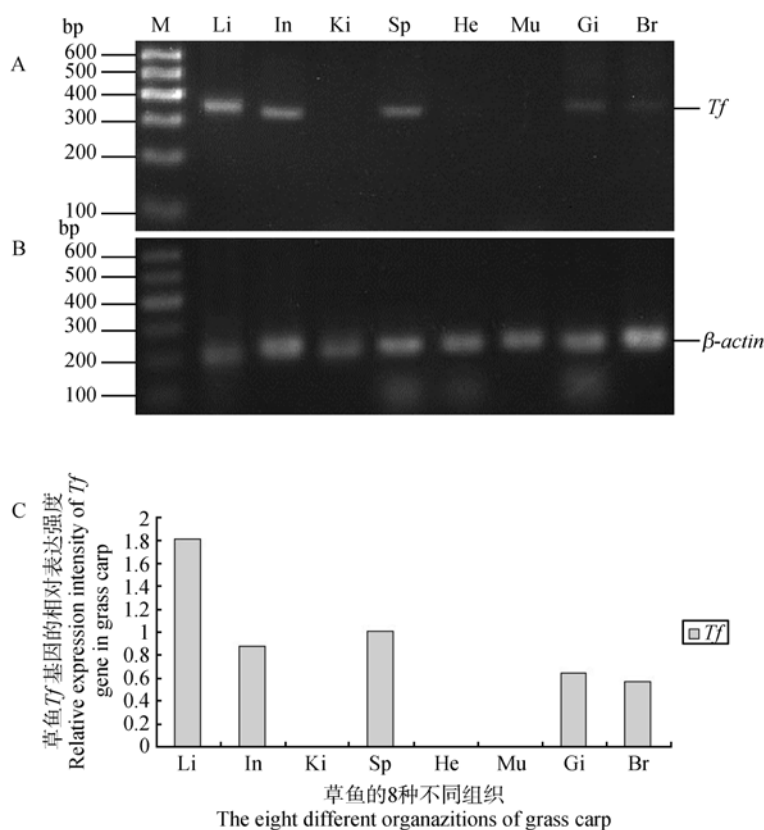
3 讨论

3.1 转铁蛋白的分子特征

转铁蛋白的 N-端和 C-端的 2 个结构域被认为是机体在进化过程中通过基因复制形成的, 以加强对铁离子的转运。单独的 N-和 C-端结构域都可体外结

合铁离子, 但 C-端与铁离子的结合更稳定^[15—18]。同源性比对显示这 2 个结构域在不同物种转铁蛋白中的位置、氨基酸种类和数目很相近, 铁离子结合位点也相当保守, 如两者在人转铁蛋白中同源率为 40%^[19]、真鲷的为 36%^[11]、草鱼的为 31%。其中, 一些行使结合铁离子功能的氨基酸残基在结构域中特别保守。例如人转铁蛋白 N-端 D82、Y114、Y207、H268 和位于 C-端 D411、Y445、Y536、H604 等氨基酸。点突变证实了这 8 个氨基酸在结合铁离子上的重要作用^[20]。

草鱼转铁蛋白也有这 8 个保守的氨基酸, 但其 N-端结构域中的第 3 个和第 4 个铁离子结合位点分别突变为 D 和 R。Lambert, et al.在昆虫转铁蛋白 N-

图3 *CtTf*的组织表达Fig. 3 Tissue-specific expression of *CtTf*

M. DL600; Li. 肝脏; In. 肠; Ki. 肾; Sp. 脾; He. 心; Mu. 肌肉; Gi. 鳃; Br. 脑

M. DL600; Li. liver; In. intestine; Ki. kidney; Sp. spleen; He. heart; Mu. muscle; Gi. gill; Br. brain

端铁离子结合位点中也发现类似的情况, 即其第4个铁离子结合残基也由H突变为其他氨基酸, 这些氨基酸的改变可能与选择压力作用有关^[20]。现有的证据证明转铁蛋白正处于进化之中, 其N和C-端结构域具有多个正选择位点^[8,21], 这些位点都位于铁离子结合位点附近的一个氢键网络中并可能会影响铁离子结合氨基酸。对其中的两个保守的位点W8Y、W128Y点突变, 会降低转铁蛋白与铁离子的亲和力^[22]。当然, 这些保守氨基酸(结果未列出)对草鱼转铁蛋白与铁离子的结合有何影响还需更多的证据来证明。

鱼类转铁蛋白基因同源性较高。特别是先前报道的草鱼转铁蛋白基因(AY383546)^[9]与本文报道的(EU790874)约有98%的同源性, 它们的主要差异存在于5'端。其中, AY383546编码的蛋白质N-端比EU790874编码的少58个氨基酸。这58个氨基酸在斑马鱼、鲫鱼、鲤鱼等鲤科鱼类中同样存在, 且同源性很高。草鱼转铁蛋白的差异是否为基因剪切方式的不同而造成, 有待进一步的研究。

3.2 草鱼转铁蛋白基因的组织表达特征

对基因组织表达图谱的分析是研究其功能的重要方面。虽然有关转铁蛋白的研究很多, 但涉及该基因在动物各组织中本底表达的研究还较少。在所检的草鱼8种组织中, 转铁蛋白基因的表达与在其他脊椎动物和鱼类中的表达水平非常类似^[11,23], 即该基因主要在肝脏中表达, 这可能与转铁蛋白主要在肝脏中合成有关。此外, 转铁蛋白基因在脾和肠中有较强的表达水平, 而在鳃和脑中表达水平较低。

参考文献:

- [1] Oppenheimer S J. Iron and its relation to immunity and infectious disease [J]. *J Nutr*, 2001, **131**(2S-2): 616—635
- [2] Partanen A J, Thesleff I. Growth factors and tooth development [J]. *Int J Dev Biol*, 1989, **33**: 165—172
- [3] Liu Y L, Sun J H, Zhang J, *et al*. Effects of transferrin on the growth and proliferation of porcine hepatocytes: a comparison with epidermal growth factor and nicotinamide [J]. *Chin Med J*, 2003, **116**(8): 1223—1227
- [4] Adams T E, Mason A B, He Q Y, *et al*. The position of ar-

- gine 124 controls the rate of iron release from the N-lobe of human serum transferrin [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(8): 6027—6033
- [5] Ford M J. Molecular evolution of transferrin: evidence for positive selection in salmonids [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, **18**(4): 639—647
- [6] Paz Y, Katz A, Pick U. A multicopper ferroxidase involved in iron binding to transferrins in *Dunaliella salina* plasma membranes [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(12): 8658—8666
- [7] Rojo I, Ilárduya ÓM, Estonba A, *et al.* Innate immune gene expression in individual zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, **23**(6): 1285—1293
- [8] Yang L, Gui J F. Positive selection on multiple antique allelic lineages of transferrin in the polyploid *Carassius auratus* [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, **21**(7): 1264—1277
- [9] Chang M X, Nie P, Liu G Y, *et al.* Identification of immune genes in grass carp *Ctenopharyngodon idella* in response to infection of the parasitic copepod *Sinergasilus major* [J]. *Parasitol Res*, 2005, **96**(4): 224—229
- [10] Long H, Yu Q X. Studies on resistance characteristic and cDNA sequence conservation of transferrin from crucian carp, *Carassius auratus* [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, **303**(1—2): 201—209
- [11] Cai Z H, Song L S, Gao C P, *et al.* Molecular cloning and expression characterization of transferrin in red seabream (*Pagrus major*) [J]. *High Technology Letters*, 2005, **15**(5): 105—110 [蔡忠华, 宋林生, 高春萍, 等. 真鲷转铁蛋白基因的克隆与表达特征分析. 高技术通讯, 2005, **15**(5): 105—110]
- [12] Wojtczak M, Dietrich G J, Imazarov I, *et al.* Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, **148**(4): 426—431
- [13] Stafford J L, Belosevic M. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, **27**(6—7): 539—554
- [14] Zhou X X, Huang R, Guo Q L. Construction of a subtractive cDNA library from the internal organs of *Trionyx sinensis* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 509—515 [周秀霞, 黄容, 郭琼林. 嗜水气单胞菌感染的中华鳖主要器官差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 509—515]
- [15] Zhang X J, Qu G, Zhu W L, *et al.* Construction of intestinal cDNA library and analysis of some expressed sequence tags sequencing of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2): 251—258 [张学俊, 屈刚, 朱文漓, 等. 草鱼肠道 cDNA 文库构建及部分 ESTs 分析. 水生生物学报, 2007, **31**(2): 251—258]
- [16] Zak O, Aisen P, Crawley J B, *et al.* Iron release from recombinant N-lobe and mutants of human transferrin [J]. *Biochemistry*, 1995, **34**: 14428—14434
- [17] He Q Y, Mason A B, Woodworth R C. Iron release from recombinant N-lobe and single point Asp⁶³ mutants of human transferrin by EDTA [J]. *Biochem J*, 1997, **328**: 439—445
- [18] Zak O, Aisen P. Iron release from transferrin, its C-Lobe, and their complexes with transferrin receptor: presence of N-Lobe accelerates release from C-Lobe at endosomal PH [J]. *Biochemistry*, 2003, **42**(42): 12330—12334
- [19] Wang F, Huang L Y. Cloning and sequence analysis of human transferrin gene [J]. *Journal of Jinan University* (Medicine edition), 2007, **28**(2): 111—119 [王峰, 黄璐圆. 人转铁蛋白基因的克隆及序列分析. 暨南大学学报(医学版), 2007, **28**(2): 111—119]
- [20] Lambert L A, Perri H, Halbrooks P J, *et al.* Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2005, **142**: 129—141
- [21] Fan T H, Tao M, Xu L Z, *et al.* Detection and analysis of positive selection sites at the transferrins [J]. *Journal of Nanchang University* (Natural Science), 2007, **31**(3): 298—306 [樊棠怀, 陶敏, 徐立中, 等. 转铁蛋白正选择位点的检测及分析. 南昌大学学报(理科版), 2007, **31**(3): 298—306]
- [22] He Q Y, Mason A B, Lyons B A, *et al.* Spectral and metal-binding properties of three single-point tryp tophan mutants of the human transferrin N-lobe [J]. *Biochem J*, 2001, **354**: 423—429
- [23] Yang L. Studies of genetic diversity of transferrin and other related molecular marker among silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [D]. Ph.D. Thesis, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2002 [杨林. 鲫鱼转铁蛋白及其相关分子标记的遗传多样性研究. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2002]

CLONING AND TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF TRANSFERRIN GENE IN GRASS CARP

WANG Na, CHEN Qiong and HU Cheng-Yu

(College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Transferrin has diverse functions that not only participates in the transportation and metabolism of organism iron ions, but also plays key effect in cellular respiration, cellular growth and proliferation, moreover, it has the antimicrobial bactericidal bioactivity. This study screened and cloned *Ctenopharyngodon idellus* transferrin gene (*CtTf*) from grass carp cDNA library. This full *CtTf* sequence was 2322bp and contained a 5'untranslated region of 31bp and a 3'untranslated region of 266bp. The *CtTf* ORF contained 2025bp which could code a 674 amino acids peptide. Forecasting molecular characteristics of this *CtTf* by the online software, the result showed that N-lobe of grass carp transferrin was a signal peptide of 15 amino acids. This gene was composed of two similar domains, and the identity of the two domains was 31%. Similarly with the transferrin in other animals, grass carp transferrin has four iron ion binding sites in each domain, and positions of them were relatively conservative. There were several other conservative sites besides the eight iron ion binding sites in the domains. Grass carp transferrin had the high homology with human and other species, such as it shared the identity of about 65%—73% with other Cyprinid fish, 43%—50% with marine fish, and 40%—42% with amphibians, reptiles, aves and mammals. Phylogenetic tree analysis revealed that grass carp transferrin gene shared the highest homology with zebra fish and cyprinoid. The result of RT-PCR experiment indicted that, among the liver, intestine, kidney, spleen, heart, muscle, gill and brain of grass carp, the transferrin gene had the highest expressional level in liver, the spleen and intestine ranked secondly, which had trace amount in gill and brain.

Key words: Grass carp; Transferrin; Expression