

鲫血清转铁蛋白 cDNA 片段的克隆与序列分析

龙 华¹, 李 谷¹, 魏令波²

(1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室, 湖北 荆州 434000; 2. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要:取体重约 300 g 鲜活鲫 (*Carassius auratus*) 的肝组织进行总 RNA 提取。从 GenBank 数据库查询已发表的 8 种鱼转铁蛋白 cDNA 或基因序列, 根据铁离子结合转运功能位点, 设计并合成了 2 对引物 P1、P4 以及 P2、P3, 克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 中的从大约 550 bp 至 1 450 bp 的核心片段, 长度为 0.9 kb。同时, 比较了几种鱼血清转铁蛋白 cDNA 序列的同源性, 并推导出鲫血清转铁蛋白 cDNA 核心片段的氨基酸序列, 并分析了该氨基酸序列的结构和特性。

关键词: 鲫; 转铁蛋白 cDNA; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q959.468; Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)04-0345-05

鱼类血清转铁蛋白 (transferrin, Tf) 又称为铁传递蛋白、运铁蛋白, 是鱼类血清中一种非血红素结合铁的 β -球蛋白, 分子量为 70~80 kD^[1], 是鱼体内铁的运输载体。业已证实, 鱼类血清 Tf 的血清铁浓度、铁饱和度与鱼类的耐低氧性能 (鱼类耗氧量及窒息点临界含氧量) 和栖息水层有明显的关系^[2-4]。20 世纪 80 年代后期, 人们开始对各类 Tf 基因的结构、序列以及表达等进行较为深入的研究^[9-14]。据报道^[15-20], 银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 血清 Tf 的 cDNA 氨基酸序列与人、滑爪蟾 (*Xenopus laevis*)、青鳉 (*Oryzias latipes*) 和大西洋鲑 (*Salmo salar*) 血清 Tf 的氨基酸序列分别有 48%、46%、67% 和 85% 的同源性。进一步的研究表明^[21-23], Tf 由 1 个大小超过 10 kb 的基因编码, 而且存在大量的重复结构。本研究克隆出鲫血清 Tf 基因的核心片段 (即铁离子结合与转运功能部位), 并应用 NCBI 数据库和计算机软件对 GenBank^[24] 基因序列数据库中的鱼类转铁蛋白进行比较, 再次证实了鱼类血清转铁蛋白进化的保守性和氨基酸序列的同源性, 同时, 为克隆鲫血清 Tf 全长 cDNA 以及序列结构和系统发育进化分析提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2002-11-04; 修订日期: 2003-01-17.

基金项目: 农业部“九四八”国际引进项目 (983094).

作者简介: 龙 华 (1964-), 男, 副研, 硕士, 从事鱼类分子生物学方面研究. Tel: 0716-8212277-3002, E-mail: longhua0000@yahoo.com.cn

1.1.1 器皿处理 用含 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 的水溶液处理与样品接触的所有玻璃及金属器皿和器材并高温烘烤。

1.1.2 样品采集 从中国水产科学研究院长江水产研究所试验场采集体重 300 g 左右鲜活鲫 (*Carassius auratus*), 经鉴定, 选取 1 条鲫, 取其新鲜肝组织 50~100 mg, 用 0.1% DEPC 水溶液清洗样品。

1.2 总 RNA 提取

用 GIBCO 公司产 Trizol 试剂盒一步法提取样品, 1 mL 总 RNA 提取液加入到新鲜肝组织中, 可获得总 RNA 约 600 μ g。用日本岛津 UV-1601 分光光度计测定 RNA 浓度。总 RNA 样品于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 引物

从 GenBank^[24] 查询发表的鱼类转铁蛋白 cDNA 或基因序列, 设计并合成引物: P1: 5'-GCTGGTGAAGCAGATGC CATCACT-3'; P2: 5'-TGCAGGCTGGAACATTCCTCAT-3'; P3: 5'-CCTCCATCCACTGCCATTGCATC-3'; P4: 5'-ACT GCTCCACCATGGCTGGAACC-3'。采用 DNA Club 计算机程序, 计算出引物的相关数据。

1.4 PCR 扩增

经逆转录合成 cDNA 第 1 链后作为扩增模板, 采用日本 NIPPON FERROFLUIDICS 公司产 PCR 仪进行扩增。引物 P1 和 P4 的 PCR 扩增条件为: 预变性 96 $^{\circ}$ C、4 min; 变性 96 $^{\circ}$ C、1 min; 退火 60 $^{\circ}$ C、1 min; 聚合 72 $^{\circ}$ C、2 min; 循环数 35 个; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。回收后的 DNA 片段再扩

增,用引物 P2 和 P3,PCR 条件同上。

1.5 DNA 片段的纯化回收

1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳,分子量标准用 DNA Ladder III (北京鼎国生物科技发展中心产),1 × TAE,稳流 40 mA,1 h。用 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒(北京鼎国生物科技发展中心产)回收 DNA 片段,测定浓度,−20 °C 保存。

1.6 cDNA 亚克隆

用 Promega 公司产试剂盒,含 pGEM-T 载体及 T4DNA 连接酶,4 °C 连接过夜。将亚克隆质粒转化到 JM109 感受态受体菌,在含有 100 μg/mL 的氨苄青霉素以及 IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板上筛选阳性克隆。通过质粒 DNA 提取鉴定重组子并测序。

1.7 同源性比较

将克隆的 cDNA 片段序列于 NCBI 的非冗余序列数据库中,以 BLAST 程序进行核苷酸序列同源性比较。采用的计算机程序包括 DNA Club、DNAMAN v4.0、DNA Tool v5.1、BLAST v2.0 等。

2 结果与分析

2.1 鲫血清 Tf cDNA 核心序列同源性分析

根据文献^[1,11,22-24],可确定 Tf 中铁离子结合与转运功能位点位于 cDNA 上游的 600 bp 左右以及下游的 1 200 bp 左右,Tf cDNA 的核心序列可以确定在 600 bp 至 1 200 bp 之间。本实验克隆出鲫血清 Tf cDNA 中的从 550 bp 至 1 450 bp 的核心片段(图 1)。

```

1 TCGCATGCTC CCGGCCGCCA TGGCCGCGGG ATTTGCAGGC TGAACATTC CCATTGGAAG ACTGGTTGCA CAAAATAAGA
81 TTCTCTGGGA TGGTCTGAT GACATGCCTC TTGAAAAGGC TGTGTACAA TTCTTTTCAA GCAGTTGCAT TCCTGGAATA
161 TCGAAAGCAC TGTACCCAAA CCTGTGTCAA GCTTGCCAGG GTGACTGCAG CTGCTCAGAC AGGGAAAAGT ACTCTGGTGA
241 TGGAGGAGCC TTCCAGTGCT TGAAAAGTGG TCATGGACAA GTTGCCCTTA TGTGTTATGA TGAAATCCCA CCAGGCGAGA
321 GGCAGGACTA TCAGCTGTTG TGCATAGATG GCAGCAGGAA AAGCATTGAG GAGTACAAGG ACTGCTACCT CCTCAAAGAG
401 CTTCAACATG CTGTGATCAG TCGCAAGGAT GCTGATTCAG AGCAGATTTA TAAAGTCCTT AAACAGATTG CGGATTCAGA
481 TCTTTTCTCT TCTGCTGCTT TTGGCGGAAA GGACCTGATG TTCTCAGACT CTATAACTGA TCTGATGGAG CTTCCCAAGA
561 TCATGGACTC TTCTCTCTAC CAGAGAGAAG ATTATTATGA AGCCATGCGT GCCCTTAGAG CTGGGAACCC ACCAGCTCCA
641 CCTCAAGACG GTAAAATTGA ATGGTGTACC ATTGGCCATG CAGAGCAACA GAAGTGTGAC AGTTTACAGA TTCTCATAT
721 GGAGTGCAGA AGGGCATCAT CTGTGGAAGA GTGCATCCAG AAAATCATGC GCAAAGAAGC AGATGCAATG GCAGTGGATG
801 GAGGAATCAC TAGTGCGGCC GCCTGCAGGT CGACCATATG GGAGAGCTCC CAACGCGTTG GATGCA

```

图1 鲫血清转铁蛋白 cDNA 核心序列

Fig. 1 Key sequence of serum transferrin cDNA of Crucian carp

在同源性比较中,我们搜寻到大量的同源序列,但以 Tf 基因的同源序列为主。几种鱼类血清 Tf cDNA 序列同源性比较见表 1。由表 1 可见,鲫血清 Tf cDNA 与大多数海洋性鱼类的 Tf cDNA 的同源性在 40%~50%。

根据目前的研究^[7-8],Tf 起源于大约 5×10^9 年前奥陶纪时期的共同祖先,在长期的进化过程中,形成了若干具有同源性的 Tf 及其类似物的分支,分布在不同动物的种属和动物体不同的细胞、组织中。Tf 的分子量、结构和结构域的研究,证明了 Tf 是由含单铁结合部位的原始 Tf 分子进化而来的假说,Tf 基因结构的分析为这一进化过程提供了更直接的证据。不同来源 Tf 结构与功能的相似性也是基于其基因的相似性。本研究结果再次证实了 Tf 的同源性和保守性。

2.2 鲫血清 Tf 氨基酸核心序列分析

用 DNAMAN v4.0 等工具软件,推导出鲫血清 Tf 氨基酸核心序列(图 2)。可以形成 α -螺旋的丙氨酸 Ala(A)、谷氨酸 Glu(E)和赖氨酸 Lys(K)的数目分别是 21、17 和 16,而可以形成 β -折叠的甘氨酸

Gly(G)数目为 16。图 2 的结果与文献报道结果接近^[1,26]。这些氨基酸的存在对形成和维护 Tf 的三维结构以及最终完成其生理功能等起着关键作用。此外,二硫键对于蛋白质维持其构象起很重要的作用,这不仅可以稳定 2 级和 3 级的肽链内部结构,而且可以介导肽链间 4 级结构的形成。由于每个 Tf 分子可逆地结合 2 个三价铁离子,二硫键对于 Tf 结合金属离子及其受体显得十分重要。进一步的研究表明:Tf 是由 2 个结构相似的分别位于 N-端和 C-端的球形结构域组成的单一肽链,氨基酸序列有重复结构、保护性阴离子链、铁链、半胱氨酸残基和 2 个糖基位点,并含有 600~700 个氨基酸残基和多个 Cys 形成的二硫键^[25]。二硫键是形成空间结构和结合铁离子的重要单元,直接影响 Tf 的结构域结合铁离子,而 Tf 的整合铁特性,也可能是 Tf 的抗菌和抗病的机理之一。

表1 几种鱼血清转铁蛋白基因或 cDNA 序列同源性比较

	Table 1 Identity comparison of gene or cDNA sequences between several fish serum transferrins								%
	鲫 <i>Carassius auratus</i>	银鲫 <i>Carassius gibelio</i>	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	倭大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	* 大比目鱼 <i>Paralichthys olivaceus</i>	黑线鳕 <i>Melanogrammus aeglefinus</i>
鲫 <i>Carassius auratus</i>									
银鲫 <i>Carassius gibelio</i>	89								
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	42	38							
倭大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	44	45	44						
大鳞大麻哈鱼 <i>O. tshawytscha</i>	53	55	44	35					
川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	43	56	53	65	33				
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	31	32	36	37	34	35			
* 大比目鱼 <i>Paralichthys olivaceus</i>	51	51	44	62	33	79	35		
黑线鳕 <i>Melanogrammus aeglefinus</i>	52	53	44	67	35	61	35	63	

注: ①除本实验室克隆的鲫 cDNA 片段序列外, 其余鱼的基因或 cDNA 序列均来源于 GenBank 数据库;

② * 大比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*) 与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 属同一物种不同品种。

Note: ①Sequences of fish transferrin genes or cDNA are from GenBank except the cDNA fragment sequence of Crucian carp cloned in this laboratory;

② * Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) and left-eye flounder (*Paralichthys olivaceus*) are the same species and the different varieties.

```

1    AAAGGCTGTGTACAATTCTTTTCAAGCAGTTGCATTCCTGGAATATCGAAAGCACTGTA
1    K A V S Q F F S S S C I P G I S K A L Y
61   CCCAAACCTGTGTCAAGCTTGCCAGGGTGACTGCAGCTGCTCAGACAGGGAAAAGTACTC
21   P N L C Q A C Q G D C S C S D R E K Y S
121  TGGTGATGGAGGAGCCTTCCAGTGCTTGAAAAGTGGTCATGGACAAGTTGCCTTTATGTG
41   G D G G A F Q C L K S G H G Q V A F M C
181  TTATGATGAAATCCCACCGAGCGAGAGGCAGGACTATCAGCTGTTGTGCATAGATGGCAG
61   Y D E I P P S E R Q D Y Q L L C I D G S
241  CAGGAAAAGCATTGAGGAGTACAAGGACTGCTACCTCCTCAAAGAGCTTCACCATGCTGT
81   R K S I E E Y K D C Y L L K E L H H A V
301  GATCAGTCGCAAGGATGCTGATTCAGAGCAGATTTATAAAGTCCTTAAACAGATTCCGGA
101  I S R K D A D S E Q I Y K V L K Q I P D
361  TTCAGATCTTTCTCTTCTGCTGCTTTTGGCGGAAAGGACCTGATGTTCTCAGACTCTAT
121  S D L F S S A A F G G K D L M F S D S I
421  AACTGATCTGATGGAGCTTCCAAGATCATGGACTCCTTCTCTACCAGAGAGAAGATTA
141  T D L M E L P K I M D S F L Y Q R E D Y
481  TTATGAAGCCATGCGTGCCCTTAGAGCTGGGAACCCACCAGCTCCACCTCAAGACGGTAA
161  Y E A M R A L R A G N P P A P P Q D G K
541  AATTGAATGGTGATACCATGGCCATGCAGAGCAACAGAAGTGTGACAGTTTACAGATTCC
181  I E W C T I G H A E Q Q K C D S L Q I P
601  TCATATGGAGTGCCGAAGGGCATCATCTGTGGAAGAGTGCATCCAGAAAATCATGCGCAA
201  H M E C R R A S S V E E C I Q K I M R K
661  AGAAGCAGATGCAATGGCAGTGGATGGAGGAATCACTAGTGCGGCCGCTGCAGGTCGAC
221  E A D A M A V D G G I T S A A A C R S T
721  CATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCA
241  I W E S S Q R V G C

```

图2 鲫血清转铁蛋白 cDNA 核心序列和推导的氨基酸核心序列

Fig. 2 Key sequence of serum transferrin cDNA of Crucian carp and deduced amino acid sequence

参考文献:

- [1] Spik G. The biochemistry and physiology of iron, section I: structure and function of transferrins [M]. New York: Elsevier Science Publishing Co, Inc, 1982. 49-56.
- [2] 龙 华, 汤伏生, 曾 勇, 等. 12 种鱼血清转铁蛋白的比较[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1996(11): 71-76.
- [3] 龙 华, 汤伏生, 曾 勇, 等. 淡水鱼类血清转铁蛋白遗传多态性研究[J]. 水产学报, 1996, 20(2): 168-174.
- [4] 龙 华, 曾 勇, 刘曼西. 淡水鱼类血清转铁蛋白抗菌性能研究[J]. 淡水渔业, 1998, 28(增刊): 34-41.
- [5] 龙 华, 刘曼西. 淡水养殖鱼类血清转铁蛋白耐低氧特性的研究[J]. 华中理工大学学报, 2000, 28(1): 85-88.
- [6] 龙 华, 曾 勇, 刘曼西. 鲤鱼血清转铁蛋白的纯化及铁离子结合特性的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 20(1): 68-71.
- [7] 龙 华, 曾 勇, 李 谷. 鱼类血清转铁蛋白的研究现状与应用前景[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 181-186.
- [8] 龙 华, 李 谷, 郑 英. 转铁蛋白的研究与发展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(2): 32-39.
- [9] Park I, Schaeffer E, Sidoli A, et al. Organization of the human transferrin gene: direct evidence that it originated by gene duplication[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 3 149.
- [10] Bartfield N S, Law J H. Isolation and molecular cloning of transferrin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 21 684-21 691.
- [11] Carpenter M A, Broad T E. The cDNA sequence of horse transferrin [J]. Biochim Biophys Acta, 1993(1 173): 230-232.
- [12] Cox L A, Adrian G S. Posttranscriptional regulation of chimeric human transferrin genes by iron[J]. Biochem, 1993, 32: 4 738-4 745.
- [13] Janusz R C, Gaedaka J R, Bradfield J Y, et al. Transferrin in a cockroach: molecular cloning, characterization, and suppression by juvenile hormone[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 1 320-1 324.
- [14] Jeltach J M, Chambon P. The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA[J]. Eur J Biochem, 1982, 122: 291-295.
- [15] Lyndon J P, O'Malley B R, Saucedo O, et al. Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin[J]. Biochim Biophys Acta, 1992(1 132): 97-99.
- [16] Petropoulos I, Corinne A G, Zakin M M. Characterization of the active part of the human transferrin gene enhancer and purification of two liver nuclear factors interacting with the TGTTCG motif present in this region[J]. J Biol Chem, 1991, 266(35): 24 220-24 225.
- [17] Rey M W, Woloshuk S L, DeBoer H A, et al. Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin [J]. Nuc Acids Res, 1990, 18: 5 288.
- [18] Pierce A, Colavizza D, Benaissa M, et al. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactoferrin [J]. Eur J Biochem, 1991, 196: 177-184.
- [19] Zakin M M. Regulation of transferrin gene expression [J]. FASEB J, 1992, 6: 3 252-3 258.
- [20] Rejean L I, Helmut H, Clement A F, et al. Rat transferrin gene expression: Tissue-specific regulation by iron deficiency [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 3 723-3 727.
- [21] Lee J Y, Tange N, Yamashita H, et al. Cloning and Characterization of Transferrin cDNA from Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Fish Pathology, 1995, 30(4): 271-277.
- [22] Hirono I, Uchiyama T, Aoki T. Cloning, Nucleotide Sequence Analysis, and Characterization of cDNA for Medaka (*Oryzias latipes*) Transferrin [J]. J Mar Biotechnol, 1995, 2: 193-198.
- [23] Kvingedal A M, Rørvik K A, Alestrøm P. Cloning and Characterization of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Serum Transferrin cDNA [J]. Molec Mar Biol Biotechnol, 1993, 2(4): 233-238.
- [24] GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2002-07).
- [25] Brock J H. Transferrins, Metalloproteins [M]. HongKong: Macmillan Press, 1985. 183.
- [26] Valenta M, Stratil A, Slechtova V, et al. Polymorphism of transferrin in carp (*Cyprinus carpio* L.): Genetic determination, isolation, and partial characterization [J]. Biochim Genet, 1976, 14(1/2): 27-45.

Cloning and sequence analysis of serum transferrin cDNA fragment in *Carassius auratus*

LONG Hua¹, LI Gu¹, WEI Ling-bo²

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology, Ministry of Agriculture,
Yangtze River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. Institute of Genetics & Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: The total RNA was extracted from the liver tissues of *Carassius auratus*. Two pairs of primers P1, P4 and P2, P3 were designed and synthesized according to the banding sites of iron while referring to the published cDNA or gene sequences of fish transferrins (Tf) in the Database of GenBank. A key segment sequence (0.9 kb in length) of Crucian carp serum transferrin cDNA was cloned from 550 bp to 1 450 bp. The comparison of gene or cDNA sequence identity in serum transferrins between several fishes was researched and the results showed that the identity of Tf gene or cDNA between *C. auratus* and most sea water fishes, such as *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus kisutch*, *O. tshawytscha*, *Platichthys flesus*, *Paralichthys olivaceus*, *P. olivaceus*, *Melanogrammus aeglefinus*, was at 40% - 50%. The amino acid sequence of the key segment sequence was deduced and the structure and characteristics of the amino acid sequence were analyzed also.

Key words: *Carassius auratus*; transferrin cDNA; cloning; sequence analysis

欢迎订阅《农业质量标准》

农业部主管 中国农业科学院主办

在农业部和科技部支持下,经国家新闻出版总署批准,《农业质量标准》从今年开始在国内公开出版发行。这是我国惟一的一份关于农业质量标准、食品安全、检验检测的综合指导性刊物,由农业部主管,中国农业科学院主办。本刊以市场为导向,以农产品质量安全为中心,以农业质量标准为重点,宣传我国农业质量标准的有关政令法规,反映我国农业质量标准制定、实施和监测检验的进展情况,开展有关农业质量标准的学术研讨,交流农业质量标准的工作经验,发布新的农业质量标准,提供有关农业质量标准和市场的信息动态,介绍国外农业标准和质量管理的先进经验与动态,集综合性、法规性、权威性、指导性和服务性于一体,设有标准制定与实施、质量认证与管理、质量监督与检验、农业检验检测体系建设、农业标准公告、研究与探讨、无公害食品行动、名企名品、质量标准经纬、质检中心之窗、市场信息与动态等十几个栏目,是各级农业行政管理、科研教学、检验检测、技术推广、生产企业等部门有关人员的益友。欢迎大家到当地邮局或向本刊直接办理订阅手续。本刊为双月刊,每期定价6.00元。邮发代号:82-223。本刊地址:北京海淀区中关村南大街12号中国农业科学院科技局质量标准处,邮政编码100081。联系电话:(010)62138026、68919422,传真(010)68975104, E-mail: aqs@caas.net.cn。