

鲫血清转铁蛋白 cDNA 克隆及其序列分析*

龙 华

(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)

摘 要: 从 GenBank 数据库查询发表的鱼类转铁蛋白 cDNA 或基因序列, 根据铁离子结合转运功能位点, 设计并合成了两对引物 P1、P4 以及 P2、P3, 克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 中的核心片段, 长度为 866 bp。再根据克隆出的核心片段分别设计上游及下游两对引物 P5、P6 以及 P7、P8, 随后用 RACE 方法分别克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 的 5' 端 (787 bp) 和 3' 端 (1 081 bp) 以及全长 cDNA, 最后用计算机程序排列出鲫血清转铁蛋白全长 cDNA, 长度为 2 444 bp。比较了 12 种鱼类血清转铁蛋白 cDNA 序列的同源性。

关键词: 鲫; 转铁蛋白 cDNA; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q781; S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) S1-0231-04

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, 相对分子质量在 70 000 ~ 80 000 之间^[1], 是鱼体内铁的运输者。已经证实鱼类血清 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^[2-8]。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]。银大麻哈鱼 *O. 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 推导的氨基酸序列分别有 48%、46%、67% 和 85% 的同源性^[15-20]。进一步的研究表明: Tf 由一个大小超过 10 kb 的基因编码, 而且存在大量的重复结构^[21-23]。本项研究克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA, 应用 NCBI 数据库和计算机分析软件对基因库 (GenBank)^[24] 基因序列数据库中的鱼类转铁蛋白 cDNA 以及基因序列的同源性进行了比较, 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。

1 材料与方法

1.1 材 料

采样前, 用含 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 的水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。从本所试验场获得 300 g 左右新鲜鲫

Carassius auratus 若干, 经鉴定后, 选取一条鲫 50 ~ 100 mg 新鲜肝组织, 用含 0.1% DEPC 的水清洗样品。

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 提取液加入到新鲜鲫肝组织中, 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, 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' - GCTGGTGAAGCAGATGCCATCACT - 3'

P2: 5' - TGCAGGCTGGAACATTCCTCAT - 3'

P3: 5' - CCTCCATCCACTGCCATTCGATC - 3'

P4: 5' - ACTGCTCCACCATGGCTGGAACC - 3'

P5: 5' - GCTGATAGTCCTGCCTCTCGCT - 3'

P6: 5' - TGTCTGAGCAGCTGCAGTCACCCT - 3',

P7: 5' - ACCGCCTTTCTCTGGACTACAAG - 3'

P8: 5' - CGCGTTTCTTCGTCTACGTTACCG - 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;

* 收稿日期: 2003-04-18

基金项目: 农业部“948”国际引进资助项目 (983094)

作者简介: 龙华 (1964 年生), 男, 副研究员; E-mail: longhua0000@yahoo.com.cn

聚合 72 ℃ 2 min; 循环数 35 个; 最后于 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 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, 相对分子质量标准用 DNA Ladder III (北京鼎国生物技术发展中心产), 1×TAE, 稳流 40 mA, 1 h。用 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒 (北京鼎国生物技术发展中心产) 回收 DNA 片段, 测定浓度, -20 ℃ 保存。

1.6 cDNA 亚克隆

用 Promega 公司产试剂盒, 含 pGEM-T 载体及 T₄ DNA 连接酶, 4 ℃ 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 RACE 法克隆 5'端和 3'端

“5'/3'RACE 试剂盒”由德国 Roche 诊断公司生产。先分别用两步 PCR 法克隆出 cDNA 的 5'端 (引物为 P5 和 P6) 及 3'端 (引物为 P7 和 P8), 再用 PCR 克隆出全长 cDNA (引物为 5'/3'RACE 引物)。操作方法见 “5'/3'RACE 试剂盒”说明书, cDNA 亚克隆方法同 1.6。

1.8 同源性比较

将克隆的 cDNA 序列提交基因库 (GenBank) 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 鲫血清转铁蛋白 cDNA 克隆

根据文献 [1, 11, 22-24], 确定了转铁蛋白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, 转铁蛋白 cDNA 的核心序列可以确定在 600~1 200 bp 之间。首先克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 的核心片段, 长度为 866 bp。随后用 RACE 方法分别克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 的 5'端 (787 bp) 和 3'端 (1 081 bp) 以及全长 cDNA, 最后用计算机程序排列出鲫血清转铁蛋白全长 cDNA。鲫血清转铁蛋白 cDNA 序列总长度为 2 444 bp, 单链 DNA 相对分子质量为 756 250, 双链 DNA 相对分子质量为 1 506 600。其中 A、C、G、T 数分别为 731、519、579、615, 所

占比例分别为 30%、21%、24%、25%。

2.2 12 种鱼类转铁蛋白基因序列的同源性分析

根据目前的研究, 转铁蛋白起源于大约 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转铁蛋白及其类似物的分支, 分布在不同动物的种属和动物体不同的细胞、组织中。转铁蛋白由一个大小超过 10 kb 的基因编码, 而且基因序列存在大量的重复结构, 通常其转录序列的片段大小为 2.5 kb 左右, 其编码的氨基酸序列也存在大量的重复结构。在同源性比较中, 搜寻到大量的同源序列, 但以转铁蛋白 cDNA 或基因的同源序列为主。12 种鱼类血清转铁蛋白基因序列同源性比较见表 1。由表 1 可见, 鲫血清转铁蛋白 cDNA 与其它鱼类的转铁蛋白 cDNA 的同源性在 30%~80% 之间。本研究结果再次证实了转铁蛋白的同源性和保守性。

表 1 12 种鱼血清转铁蛋白 cDNA 序列同源性比较¹⁾

Tab.1 Comparison of identity of cDNA sequences of 12 fish serum transferrins

	1	2	3	4	5	6	7 ²⁾	8 ²⁾	9	10 ²⁾	11
1											
2	80										
3	46	51									
4	44	55	65								
5	33	36	31	35							
6	36	37	33	34	38						
7 ²⁾	41	56	68	65	32	35					
8 ²⁾	47	51	67	62	34	36	79				
9	47	53	65	67	35	36	60	63			
10 ²⁾	43	34	36	36	35	34	34	35	35		
11	38	38	39	50	33	35	35	43	38	33	
12	46	56	77	70	33	33	74	72	69	38	35

1) 1, 鲫 *Carassius auratus*; 2, 银鲫 *Carassius gibelio*; 3, 青鳉 *Oryzias latipes*; 4, 银大麻哈鱼 *Oncorhynchus kisutch*; 5, 大鳞大麻哈鱼 *O. tshawytscha*; 6, 川鲮 *Platichthys flesus*; 7, 牙鲆 *Paralichthys olivaceus*; 8, 太平洋鲆 *Paralichthys olivaceus*; 9, 黑线鳕 *Melanogrammus aeglefinus*; 10, 日本鲆 *Paralichthys olivaceus*; 11, 鳟鱼 *Salmo trutta*; 12, 沙鳗 *Ammodytes marinus* 除本实验室克隆的鲫 cDNA 序列外, 其余基因序列均来源于 GenBank 数据库。

2) 日本鲆 *Paralichthys olivaceus*、太平洋鲆 *Paralichthys olivaceus* 与牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 虽拉丁名称相同, 但属不同亚种或品种, 文献中未提及具体名称

```

1   AGCCTCTCCT CCTCTTGGCA CTGCTCTAAT ATGACCATCA TGTCTTGCCG CTGCGTCTCG
61  TGTTTGTCCCT GCCTCTCTGT GGCAGTGGCC TCAGCCAGTG CTCAAAAAGT CAAATGGTGT
121 GTGAAGTCTC AGCAGCTGCA TAAACCTGCC AACACCTTGC CACCAAATCA CCAGAGCTTC
181 TCATCTTATA CAGACCTGAA AGACTGCGGC ATCTCCCTGA GTGCATGTCA AGCATCAAGA
241 AATGGTGATA CAGATGCTAT CACTGTAGGT GCAGACCATG TTTATCAGGC TGGACTCATA
301 AATTATGGCC TCCGTCCAT CATTGCCGAG AATAATAAAG CTGTATGTTC TTATGCTGTG
361 GCTTTGGTCA AGAGAGACAC AGACTTCAGC ATCAACGATC TCAAAGGAAA GACTTCATGC
421 CACAGTTGTT ATCAAAGCCC TCAGGCTGGT GAAGCAGATG CCGAAGACTG GTTGACAAAA
481 ACAAGATTCC CTGGGAGGGT ATTGATGAGA AAGCAGTGTA CCCAAACCTG TGTCAAGCTT
541 GCCAGGGTGA CTGCAGCTGC TCAGACAGTG AAAATCGCAT GCTCCCGGCC GCCATGGCCG
601 CGGGATTGTC AGGCTGGAAC ATTCCCATTG GAAGACTGGT TGCACAAAAT AAGATTCTCT
661 GGGATGGTCC TGATGACATG CCTCTTGAAA AGGCTGTGTC ACAATTCTTT TCAAGCAGTT
721 GCATTCTTGG AATATCGAAA GCACTGTACC CAAACCTGTG TCAAGCTTGC CAGGGTGACT
781 GCAGCTGCTC AGACAGGGAA AAGTACTCTG GTGATGGAGG AGCCTTCCAG TGCTTGTAAG
841 GTGGTCATGG ACAAGTTGCC TTTATGTGTT ATGATGAAAT CCCACCGAGC GAGAGGCAGG
901 ACTATCAGCT GTTGTGCATA TATGGCAGCA GGAAAAGCAT TGAGGAGTAC AAGGACTGCT
961 ACCTCCTCAA AGAGCTTCAC CATGCTGTGT TCAGTCGCAA GGATGCTGAT TCAGAGCAGA
1021 TTTATAAAGT CCTTAAACAG ATTCCGGATT CAGATCTTTT CTCTTCTGCT GCTTTTGGCG
1081 GAAAGGACCT GTTGTCTCA GACTCTATAT CTGATCTGTT GGAGCTTCCC AAGATCATGG
1141 ACTCCTTCCCT CTACCAGAGA GAAGATTATT ATGAAGCCAT GCGTGCCCTT AGAGCTGGGA
1201 ACCCACCAGC TCCACCTCAA GACGGTAAAA TGAATGGTG TACCATTGGC CATGCAGAGC
1261 AACAGAAAGT TGACAGTTTA CAGATTCTTC ATATGGAGTG CCGAAGGGCA TCATCTGTGG
1321 AAGAGTGCAT CCAGAAAATC ATGCGCAAAG AAGCAGATGC AATGGCAGTG GATGGAGGAA
1381 TCACTAGTGC GGCCGCCTGC AGGTCGACCA TATGGGAGAG CTCCCAACGC GTTGGATGCA
1441 CAAACATGTG TGAACGTGT AAAGGCAGTG AGAAGGCAGT GGGAGATGAC AGCAAGTGCA
1501 AAGCCTCTTC TGAAGAAAGA TATTATGGCT ATGATGGGGC TTTCAGGTGT CTTGCAGAAA
1561 AAAGTGGTGA AGTTGCTTTC ATCAAGCACA ATATTGTTGG GGATTACACT GATGGTAAAG
1621 GACCAGCGTG GGCTAAGGAT CTGTAGTCAG AAGATTTTGA ACTGTTCTGT CCAGAATTAC
1681 CAGAGACAAC AGCATGCCTC TTGTGAAGGC TGTGTCACAA TTCTTTTCAA GCAGTTGCAT
1741 TCCGGAATAT CTAAACACAC TGATTTAAAT GGTAGATGTA ATCTTGCCAA AGTGCCAGCT
1801 CATGCTGTGA TCACCCGAGA AGATGCACGG AAAGACGTGG TGAAGGTTCT GAAGGAGGCT
1861 CAAGCCAATA CAGATTTTCA AGACAAGCTG TTCAAGTCAG AGGGTGAAAG AAACAGGGGA
1921 AATTCTCTGA TTCCACTAAA CGTGGACAAT GCTTCAGGAG ATTACTCAAC GTTTAAGGAA
1981 TTCTTGACAC AAAAGTACAT TGACATGATT GAAAAGACCT ACATGACTGG CAAGGGGTCA
2041 TTAAACCAGA TCTGGTCAAG GCATGCACAA TGTAATTTG TATTTGTTAG TCGAGTTCCC
2101 GTGCAATCTC GACGCGCAAA GAAGCAGATG CCAATAAAAT TTTGTGCCAT TGAGCTTTAT
2161 CTTGCATGTT TCGGACAAAT AAGAATCTAC ATTTCTGAAT CACTCTACTT AATCAAATTA
2221 AGGACCAGAC AGGCGGCAAC TCCTGGGAAA GTTACCAGCA TGAGGAAAAC ACAATGTTCA
2281 TGTATGCAG CAGTTTTTCAT ATCTTATTAT CAAATTCAAA TCTATGATGA TCAAACGTGT
2341 CACACGCATG AAGTTACAA GTGTTTCAGT TTCTGTTTAT TATACCACAA GGGTTGTGAT
2401 CAACCTGTGT ATATAAAAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

```

图1 鲫血清转铁蛋白 cDNA 序列

Fig.1 Sequence of serum transferrin cDNA of Crucian carp

图中从上至下有下划线的部分分别为引物 P5、P6、P1、P2、P3、P4、P8 和 P7

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, 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, 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: 3149.
- [10] BARTFELD N S, LAW J H. Isolation and molecular cloning of transferring from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 21684 - 21691.
- [11] CARPENTER M A, BROAD T E. The cDNA sequence of horse transferrin[J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1173: 230 - 232.
- [12] COX L A, ADRIAN G S. Posttranscriptional regulation of chimeric human transferrin genes by iron[J]. Biochemistry, 1993, 32: 4738 - 4745.
- [13] JAMROZ R C, GASDASKA 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: 1320 - 1324.
- [14] JELTSCH 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, SAUCEDE O, et al. Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1132: 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 TGTTTGC motif present in this region [J]. J Biological Chemistry, 1991, 266 (35): 24220 - 24225.
- [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: 5288.
- [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: 3252 - 3258.
- [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: 3723 - 3727.
- [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]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1993, 2(4): 233 - 238.
- [24] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2003 - 02).
- [25] BROCK J H. Transferrins, Metalloproteins[M]. Hongkong: Machillan 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]. Biochemical Genetics, 1976, 14 (1/2): 27 - 45.

Cloning and Sequence Analysis of Serum Transferrin Gene in *Carassius auratus*

LONG Hua

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

Abstract: The two pairs of primers P1, P4 and P2, P3 were designed and synthesized according to the banding sites of iron while referring published cDNA or gene sequences of fish transferrins in the Database of GenBank. An 866 bp length key segment sequence of *Crucian carp* serum transferrin cDNA was cloned. The another two pairs of primers P5, P6 and P7, P8 were designed and synthesized according to the key segment sequence respectively. 5' end (787 bp), 3' end (1081 bp) and the full-length cDNA of *Crucian carp* serum transferrin cDNA were cloned by RACE respectively. The full-length cDNA (2444 bp) of *Crucian carp* serum transferrin cDNA was arranged by a computer program. The homology of cDNA sequences of 12 fish serum transferrins was compared.

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