

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0641 - 09

缢蛏铁蛋白基因的分子特性及其表达分析

牛东红¹, 冯冰冰², 李家乐^{1,3}

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306; 2. 江苏省水产技术推广站, 江苏南京 210036; 3. 上海海洋大学 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海 201306)

摘要: 从缢蛏(*Sinonovacula constricta*) cDNA 文库中筛选出一条铁蛋白同源序列, 直接扩增质粒获得全长 cDNA 序列, 共 1 106 bp, 包括 128 bp 的 5' 非翻译区和 309 bp 的 3' 非翻译区, 以及 669 bp 的开放阅读框。阅读框共编码 222 个氨基酸, N 端含有 17 个氨基酸的信号肽序列, 推算的分子量约为 25.47 ku, 理论等电点为 5.48。氨基酸序列分析结果表明, 该基因含有保守的铁氧化酶活性中心的 7 个氨基酸残基, 但是不具有糖基化位点(NQS)和 5' 非编码区铁蛋白的铁反应元件(iron response element, IRE), 属于 H 型铁蛋白基因, 该基因被命名为 *ScFERs*。系统进化显示, 基本上同一个物种的不同亚型铁蛋白首先聚在一起, 然后和其他物种的铁蛋白聚在一起。缢蛏 *ScFERs* 首先与日本花棘石鳖(*Liolophura japonica*) *LjFERs* 聚在一起, 然后与缢蛏另一种 *ScFER* 以及文蛤(*Meretrix meretrix*) *MmFERs* 聚在一起。荧光定量 PCR 检测结果显示 *ScFERs* 基因在肝胰腺中高度表达, 肝胰腺与其它组织间的表达量存在着极显著差异。经鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)诱导后, *ScFERs* 基因表达水平呈显著上调。为进一步研究缢蛏铁蛋白基因的结构和功能奠定了基础。

研究亮点: 铁蛋白基因在贝类上的研究报道较少。本研究克隆出了缢蛏的铁蛋白基因 *ScFERs*, 属于 H 型铁蛋白基因, 具有信号肽序列, 而不具备 5' 非编码区铁蛋白的铁反应元件, 为特殊的铁蛋白基因。*ScFERs* 基因在肝胰腺中高度表达, 在斧足和水管中的表达量最低, 且在鳃弧菌和副溶血弧菌诱导后, *ScFERs* 基因表达水平呈显著上调, 该研究结果为进一步研究缢蛏 *ScFERs* 基因的结构和功能奠定基础。

关键词: 缢蛏; 铁蛋白基因; 序列分析; 基因表达

中图分类号: S 917

文献标志码: A

铁蛋白(Ferritin)是与铁离子储存和铁代谢密切相关的蛋白, 广泛存在于各种生物体内, 并且结构非常保守^[1-2]。脊椎动物的铁蛋白由两类亚基组成, H 型亚基(在心脏中发现)和 L 型亚基(在肝脏中发现), 并分别由不同的基因编码^[3]。H 亚基与 L 亚基在分子量和结构上都存在着明显的差异。H 亚基含有大量的酸性氨基酸, 位于四螺旋束的中心, 形成铁氧化中心。L 亚基不含有这些酸性氨基酸, 但存在成核位点(polynuclear Fe-complex formation), 其主要功能是促进铁的水解和铁核的形成^[4-5]。大多数的无脊椎动物铁蛋白与脊椎动物 H 型具有高度相似性^[6]。然而, 昆

虫铁蛋白的特性更接近于脊椎动物 L 亚基^[7]。对于哺乳动物来说, 同种个体铁蛋白的 H 亚基和 L 亚基之间有 54% 的保守氨基酸序列, 不同种哺乳动物之间 H 亚基和 L 亚基的氨基酸组成分别有 90% 和 85% 同源性。在哺乳动物体内, H 亚基和 L 亚基的组成比例可随动物细胞的增殖、分化、发育阶段的不同而变化, 这种非均匀性与铁蛋白在不同的器官和发育阶段的功能是相一致的。

脊椎动物的铁蛋白多为胞内型, 因最近发现其合成在转录与转译水平均受到炎症细胞因子的调控而被认为参与了非特异性免疫反应^[8]。

收稿日期: 2012-07-03

修回日期: 2012-07-31

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A400-3); 国家自然科学基金(31101897)

作者简介: 牛东红(1978—), 女, 博士, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: dnhnu@shou.edu.cn

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

相对于脊椎动物,无脊椎动物中的铁蛋白则更加多元化,在静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)发现了两种不同的 H 型铁蛋白基因,其中体细胞铁蛋白(soma ferritin)含有 IRE,为胞内型蛋白,而卵黄铁蛋白(yolk ferritin)不含有 IRE,但包含一段信号肽序列,属于分泌型铁蛋白^[9]。同样在曼森氏裂体吸虫(*Schistosoma mansoni*)中也发现了胞内型和分泌型铁蛋白^[10]。

铁蛋白在进化中也是相当保守的,动物、植物和微生物中的 ferritin 样蛋白是从相同的祖基因(progenitor)进化而来^[11]。但其在表达调控机制上有显著的不同,在哺乳动物中,调节铁蛋白表达的典型体系是在转录后基于靶 mRNA 上铁调控蛋白(iron-regulatory proteins, IRP)和铁反应元件(IRE)相互作用的铁依赖性调节体制^[12]。在植物和昆虫体内, ferritin 基因表达的调控主要发生在转录水平^[13-14]。

缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamarck)俗名蛏子、蜻子,属于双壳纲(Bivalvia)、帘蛤目(Veneroida)、截蛏科(Solecurtidae)、缢蛏属(*Sinonovacula*)^[15],是中国、日本、韩国特有种类。缢蛏作为我国四大养殖贝类之一,其自然分布于河口或有少量淡水注入的内湾潮间带中、下区软泥滩上,在浙江和福建一带已有数百年的养殖历史。近年来,缢蛏病害频频发生。而关于缢蛏的研究在过去几年中,主要集中在种质资源的评价^[16-18],而功能基因的研究则起步不久,曾对缢蛏肌动蛋白和热休克蛋白基因有所报道^[19-20],本文则对缢蛏铁蛋白基因的序列特征,组织表达以及细菌诱导表达进行了分析,以期为进一步了解缢蛏铁蛋白基因的结构和功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

缢蛏为采自福建省宁德市漳湾镇二屿村沿海滩涂上的野生 1 龄蛏。于 2010 年 4 月份带回本实验室,在水箱中 18~20℃ 的充气过滤海水中养殖,实验前暂养两周。

随机挑选 9 个目测健康的缢蛏,分别取水管、鳃、斧足、外套膜、肝脏和性腺组织,将每个个体的相同组织等量混合作为一个样品,共制成 3 个样品组。

按照常规方法,在 28℃ 条件下,用终浓度为 0.4% 的福尔马林分别浸泡鳃弧菌和副溶血弧菌(由农业部上海海洋大学水生动物病原库提供)48 h。无菌检验确认菌体灭活后,用 PBS 缓冲液清洗 3 次,去掉残存的福尔马林,最终用 PBS 缓冲液制成 OD₆₀₀ = 0.4 的细菌悬液。

实验设置 4 个组,以注射等量 PBS 缓冲液者作为对照组,以每只缢蛏斧足内注射 50 μL 鳃弧菌或副溶血弧菌菌悬液者作为鳃弧菌实验组和副溶血弧菌实验组,每组缢蛏为 80 个。注射完毕后,将缢蛏放回对应的水族箱暂养。在暂养后 0 h 取对照组样品,然后在注射后的第 4、8、12、20、30、48 和 72 h,每个注射组取 9 个缢蛏个体,将每 3 个个体的肝脏组织等量混合成一个样品,共制成 3 个样品组。提取每个样品的总 RNA,用于细菌诱导后不同时间点的表达分析。

1.2 缢蛏 *ScFERs* 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

根据缢蛏 cDNA 标准化文库中 EST 序列比对的结果,选取一条与其它生物的铁蛋白基因具有高度相似性的 EST 序列,以文库质粒为模板,利用通用引物 M13F 和 M13R(表 1)对其扩增并测序,得到该基因的全长 cDNA,命名为 *ScFERs*。

1.3 缢蛏 *ScFERs* 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化分析

将获得的 *ScFERs* 基因的全长 cDNA 序列分别与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库做 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)分析。应用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)确定正确的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)并推导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)预测氨基酸序列的物理参数,SignalP 3.0server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>)预测信号肽。利用 BLASTp 在 NCBI 上进行相似性检索,Clustal W2 软件对相应的氨基酸序列进行多重比对分析。利用 MEGA 4.0 软件,采用邻位相接法(NJ)构建铁蛋白氨基酸序列的系统进化树,采用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

1.4 缢蛏 *ScFERs* 基因组织表达以及细菌感染后的表达分析

根据已获得的缢蛏 *ScFERs* 基因的 cDNA 序列,分别设计定量 PCR 引物 fn-F 和 fn-R。按 TaKaRa 的 RNAsiso Plus 方法分别提取总 RNA。参照 TaKaRa 的 Primescript™ RT-PCR Kit 中 RT-PCR 体系,逆转录 RNA 为 cDNA 第一条链,实时荧光定量 PCR 体系以 cDNA 第一条链为模板,以 18S rRNA 为内参基因(表 1),定量表达分析通过 Bio-Rad CFX 96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)完

成。荧光定量检测试剂采用 SYBR 定量检测试剂盒(TaKaRa)。采用 20 μ L 反应体系,内含 Mix 10 μ L、正反引物(10 mmol/L)各 0.6 μ L、ddH₂O 6.8 μ L 及模板 cDNA 2 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;随后进行溶解曲线检测。所得的数据应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行相对定量分析,所有值均为平均值 \pm 标准偏差($x \pm SD$),所得数据采用 SPSS 16.0 软件包进行 *t*-test 统计分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

表 1 引物序列表

Tab. 1 Sequence of primers

引物	序列(5' - 3')	扩增用途
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	质粒扩增
M13R	AAACAGCTATGACCATGTTCA	
fn-F	GGATGTTGCTCTGCCAGGATT	荧光定量 PCR 扩增
fn-R	GCCGCCACGTTTGTTCATCT	
18S-F	TCCGTTCTATTGCGTTGCTTTT	荧光定量 PCR 扩增
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGCTCA	

2 结果与分析

2.1 缢蛏铁蛋白基因 cDNA 序列特征分析

缢蛏铁蛋白基因 *ScFERs* cDNA 全长 1 106 bp,包括 128 bp 的 5'端非翻译区(UTR),309 bp 的 3'端非翻译区(UTR),以及 669 bp 的开放阅读框,可编码 222 个氨基酸残基。N 端含有 17 个氨基酸组成的信号肽序列(Met¹-Gly¹⁷),序列为 MIGKLAVLALLGLCVSG,3'UTR 区有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列 AATAAA 和 PolyA 尾(图 1)。

本研究中,缢蛏 *ScFERs* 与缢蛏另一种铁蛋白基因 *ScFER* (GenBank 登录号为 GQ906972),均有保守的铁氧化酶活性中心的 7 个氨基酸残基,2 个铁蛋白的同源性为 49%。二者不同之处在于,本研究 *ScFERs* 分子量为 25.47 ku,具备 17 个氨基酸的信号肽序列,具有 38 个氨基酸插入序列,不具有糖基化位点(NQS)和 5'非编码区铁蛋白的铁反应元件(iron response element, IRE)。而缢蛏另一种铁蛋白基因 *ScFER* 分子量为 19.76 Ku,不具备信号肽序列,具有 NQS 和 IRE^[21]。

2.2 海水贝类铁蛋白基因的相似性分析

在 NCBI 上搜索铁蛋白基因,选择海水贝类的 13 个物种共 21 条铁蛋白氨基酸序列(表 2),

利用 ClustalW2 进行氨基酸序列的相似性分析,结果表明缢蛏 *ScFERs* 与其他海洋贝类的相似性均大于 40%,与缢蛏另一种铁蛋白基因 *ScFER* 相似度为 49%。与人 L 型铁蛋白相似性只有 26.41%。图 2 中标示了在 21 条序列中,本研究中的缢蛏铁蛋白基因(*ScFERs*)和日本花棘石鳖(*Liolophura japonica* LjFER-S)含有信号肽序列。同时标示出了铁蛋白基因共有的保守的亚铁氧化活性中心,证实缢蛏 *ScFERs* 为 H 型铁蛋白基因。通过多重比对发现,具有信号肽序列的 *ScFERs* 和 *LjFER-S* 均具有一段大约三十多个氨基酸的插入序列,其分子量大于其他铁蛋白基因。

2.3 海水贝类铁蛋白基因的系统进化分析

基于氨基酸序列采用 MEGA 4.0 软件以 NJ 法构建了 13 种海洋贝类的系统进化树(表 2,图 3),结果显示,基本上同一个物种的不同亚型铁蛋白首先聚在一起,然后和其他物种的铁蛋白聚在一起,其中本研究中缢蛏 *ScFERs* 首先与日本花棘石鳖(*L. japonica*)的 *LjFERs* 聚在一起,缢蛏另一种铁蛋白基因 *ScFER* 与文蛤(*M. meretrix*)的 *MmFERs* 聚在一起,之后二者再聚为一支,最后与其他贝类聚类。

2.4 缢蛏 *ScFERs* 基因组织表达分析

以 18S rRNA 为内参基因, 荧光定量 PCR 检测缢蛏 *ScFERs* 基因在水管、鳃、斧足、外套膜、肝胰腺、性腺 6 个组织表达, 结果显示 *ScFERs* 基因

在肝胰腺中高度表达, 在鳃和性腺中有一定量的表达, 在其它组织中表达量很低, 肝胰腺与其它组织间的表达量存在着极显著差异(图 4)。

```

1  gccccacgatgtatcgcaagcgaacattggccggaaatagctgctcttacttcaagtatagcagtcgtacaaacggacgaacaaggagactatcctcaaaagctatcttagctgctagc
121  gaaggaagATGATGGAAACTAGCAGTCTTCCCTTTTAGGGCTATGTGTCTGGAGATTTCGTCGATCGTGTGAGTCAAACTTCGAGAAGAAGACGAACCGCTCGCTCACACAGC
    M I G K L A V L A L L G L C V S G D F V D R V S Q N F E K K T N A R L T Q 37
241  AGATCGCCTATGAACGTAGCGCCAGTTACTTTTACCAGTCGTATGCCACTACTTTGATCGCGGGATGTGCTCTGCCAGGATTGCTAAGTGGTTCGAAAAAGCGCTCAAGGAGGAAC
    Q I A Y L S A S F Y Q S Y A H Y F D R A D V A L P G F A K W F E K A S K E E 77
361  GTGATCAGCTACTGGTTTGATGAATACATCAACAAACGTGGCGGAGGTCAATCTGCAGGATCTTAACCTCAACAGCATCTGTACCCTGGTCGGAGAACAATGGAAAAATGAATG
    R D A T G L M E Y I N K R G G E V N L Q D L N F N S I C T L V G E Q L E K M N 117
481  AGTTCGGCAGAACAAAAGCCTGTATCTGTTCCCTTTATGTCCGACAAAAATGACAAATCTTTCGAGTCTCGGACCGGAGAGCTGGAAGAACGGGCTGTGGACCATGCAGGACACTCTGG
    E F G R T K A C I C S F M S H K N D K S F E C S D R E S W K N G L W T M Q D T L 157
601  TACTGGAGCGCTTTGTTAACGACGAGCTTCTAAGCTGCACGCCCGTTCGACAGCGACCTCACCTTGCTCAGTGTGCTGAGCACCCTACTTGGATGAACAAGTGGAGCCATTAAT
    V L R F V N D E L L K L H A A V D S D P H L A H V L E H H Y L D E V D A I K 197
721  CCGTGGCAGACCACATTCGAAACTGCAGCGTGTGGAGACGGACTTGGAGATACATGTACGACAAGGAATTGTAGacctggtcccaggatacagatgtcaaggagccgcaaaatagacc
    S V A D H I R K L Q R V G D G L G E Y M Y D K E L * 222
841  tactttttcaaaatggcgctagctataactttctaaatstataaaaaactataaaaaataaaaggttttaaaatgltctacaagaaatggaagaaacgaatagaacaaatacaacacg
961  tgaagttcagcaggataaagtgaattgtatgacataaacattttgtactaatacctaaccatattcatgtgttaaaagtcttaaaaagaacagaaataaattggcaaacattatata
1081  aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 1 缢蛏 *ScFERs* 编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of *ScFERs* gene from *S. constricta*

小写字母代表 3', 5' 端非翻译区; 大写字母部分为编码区, 且上面为核苷酸序列, 下面为氨基酸序列; 下划线为预测的信号肽序列; 起始和终止密码子及多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA 用粗体字标识; 阴影部分表示 7 个氨基酸残基是组成亚铁氧化中心的保守氨基酸。

表 2 用于多重比对和系统进化分析的序列信息

Tab. 2 Information of the sequences used in the multiple alignment and phylogenetic analysis

缩写	物种名称	GenBank 登录号
CaFER	<i>Crassostrea ariakensis</i> 近江牡蛎	ABE99842
CgFER	<i>Crassostrea gigas</i> 太平洋牡蛎	CAD91440
CgFER-GF1	<i>Crassostrea gigas</i> 太平洋牡蛎	AAP83793
CgFER-GF2	<i>Crassostrea gigas</i> 太平洋牡蛎	AAP83794
CgFER-S	<i>Crassostrea gigas</i> 太平洋牡蛎	CAD92096
HdhFER	<i>Haliotis discus hannai</i> 皱纹盘鲍	ABH10672
HdFER	<i>Haliotis diversicolor</i> 杂色鲍	ABY87353
HddFER-S2	<i>Haliotis discus discus</i> 盘鲍	ABG88846
Cffer-CFA	<i>Chlamys farreri</i> 栉孔扇贝	AAV66904
Cffer-CFB	<i>Chlamys farreri</i> 栉孔扇贝	AAV66905
Cffer-CFC	<i>Chlamys farreri</i> 栉孔扇贝	AAV66906
AiFER-AF	<i>Argopecten irradians</i> 海湾扇贝	AAV66907
AiFER-S1	<i>Argopecten irradians</i> 海湾扇贝	AAP83793
AiFER-S2	<i>Argopecten irradians</i> 海湾扇贝	ADR71732
MgFER	<i>Mytilus galloprovincialis</i> 紫贻贝	ACM86786
PfFER-LP	<i>Pinctada fucata</i> 合浦珠母贝	AAQ12076
PmFER-LP	<i>Pinctada maxima</i> 大珠母贝	ACS72281
MmFER-S	<i>Meretrix meretrix</i> 文蛤	AAZ20754
LjFER-S	<i>Liolophura japonica</i> 日本花棘石鳖	BAA21810
ScFER	<i>Sinonovacula constricta</i> 缢蛏	ACZ65230

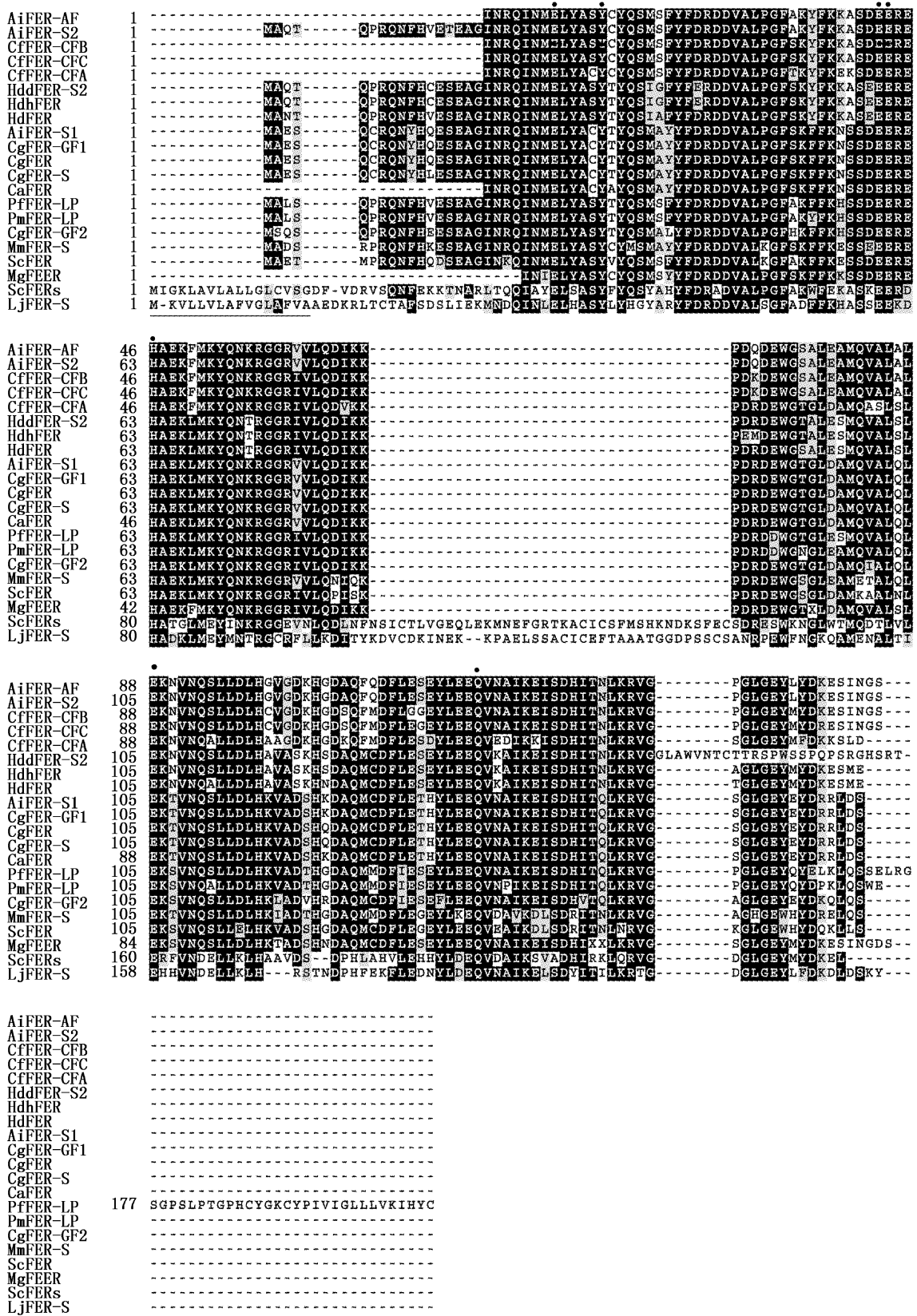


图 2 海水贝类铁蛋白基因的多重比对分析

Fig.2 Alignment analysis of ferritin from marine shellfish

横线表示 *ScFERs* 和 *LjFER-s* 的信号肽序列。圆点表明了铁氧化中心的 7 个保守氨基酸。

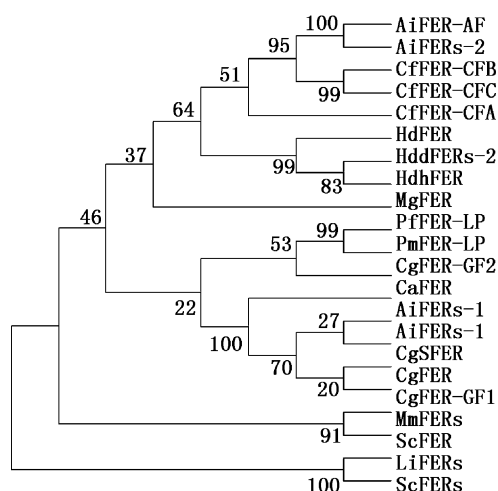


图3 NJ法构建的海洋贝类铁蛋白基因的NJ系统进化树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of ferritins of marine mollusk species

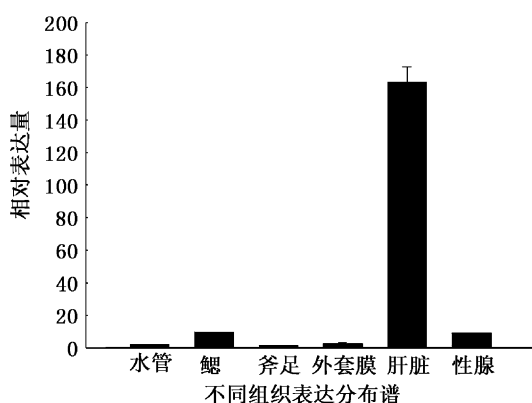


图4 *ScFERs* 基因在缢蛭6个组织中的相对表达水平

Fig.4 *ScFERs* gene mRNA expression level in six different tissues

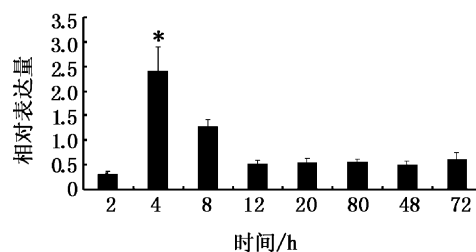
2.5 缢蛭 *ScFERs* 基因在细菌诱导后的表达分析

在肝胰腺中,经副溶血弧菌诱导4 h和8 h后,*ScFERs*表达上调,其中4 h后上调最高,达到显著差异(图5a);经鳃弧菌诱导4 h,*ScFERs*表达上调,达到极显著差异(图5b)。

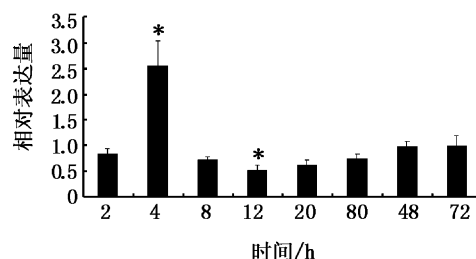
3 讨论

铁是宿主和病原微生物两者生长繁殖所必需的金属元素,因此与病原竞争自身体内的铁元素一直是宿主对病原免疫防御的一种有效手段。铁扣留机制作为非特异免疫的一部分,在无脊椎

动物的免疫反应中发挥着重要作用。而作为铁扣留机制中关键的调节铁代谢的蛋白,铁蛋白必定也参与了宿主的非特异免疫。本研究获得缢蛭一个铁蛋白基因的完整cDNA序列,其被命名为*ScFERs*,含有一个长为669 bp的ORF,编码的蛋白由222个氨基酸残基构成,具有1个ferritin蛋白结构域,具有保守的铁氧化酶活性中心的7个氨基酸残基,这和其他海洋贝类的H型铁蛋白类似^[21-28],而轻链不具备这些结构。同时,本研究*ScFERs*与另一种H型*ScFER*相似性为49%,与其他海洋贝类H型铁蛋白的相似度均高于40%。但是与人L型铁蛋白的相似度只有26.41%。以上结果表明本研究获得的*ScFERs*属于H型铁蛋白。



(a) 不同时间点表达分布谱



(b) 不同时间点表达分布谱

图5 细菌诱导后*ScFERs* mRNA在肝胰腺中的相对表达水平

Fig.5 *ScFERs* expression in liver following bacterium induced at different time by qRT-PCR

a为副溶血弧菌诱导表达谱,b为鳃弧菌表达谱。以18S为内参基因,*ScFERs* mRNA的表达以相同时间点处理组相对于对照组的表达量的倍数变化表示。*表示差异显著($P < 0.05$)。

铁蛋白的铁反应元件(iron response element, IRE)在脊椎动物和无脊椎动物中被认为是近帽位置(cap-proximal position)上保守的序列,而在本研究中5'非编码区未找到铁蛋白保守的IRE。但是,在该序列N端具有一段17个氨基酸残基的信号肽,在该铁蛋白结构域中具有三十多个氨

基酸的插入序列,这一特殊结构,区别于大多数胞内型铁蛋白,属于分泌性铁蛋白。同样这种特殊结构的 H 型铁蛋白在静水椎实螺 (*L. stagnalis*) 和曼森氏裂体吸虫 (*S. mansoni*) 的研究中也有所报道^[9-10]。此外,脊椎动物的铁蛋白一般为 170~185 个氨基酸残基^[27]。而大部分软体动物和棘皮动物的铁蛋白为 170~180 个氨基酸残基,如太平洋牡蛎 (*C. gigas*) 为 171 个,章鱼 (*Octopus dofleini*) 为 172 个,蜗牛 (*Helix*) 为 172 个,静水椎实螺 (*L. stagnalis*) 为 174 个^[29]。也有一些软体动物的铁蛋白氨基酸远远高于 180 个,如合浦珠母贝 (*P. fucata*) 的有 206 个,日本花棘石鳖 (*L. japonica*) 的有 223 个。本研究获得的缢蛏的 ScFERs 编码的蛋白有 222 个,属于编码较多数量氨基酸的铁蛋白,而且这些铁蛋白含有插入片段和 N 端信号肽序列,分子量明显大于胞内型铁蛋白,比如缢蛏胞内型 ScFER 分子量只有 19.76 ku,而本研究分泌型 ScFER 分子量则为 25.47 ku。这些特殊结构暗示铁蛋白基因可能是从一种 H 型分化为 H 和 L 两种亚型的进化过程^[30]。

近年来,人们对于软体动物中铁蛋白的免疫防御功能研究越来越重视。本研究发现缢蛏 ScFERs 基因在健康缢蛏各组织中均有表达,其中在肝胰腺中高度表达,在鳃和性腺中有一定量的表达,在其它组织中表达量很低,肝胰腺与其它组织间的表达量存在着极显著差异 ($P < 0.01$)。这与肝胰腺是大多物种的一个具有解毒功能的重要组织器官有关,也说明其是合成无脊椎动物免疫相关蛋白的重要组织。HE 等^[22]克隆并获得 2 个海湾扇贝 (*A. irradians*) ferritin 基因,并研究发现 2 个 ferritin 基因在调控铁离子平衡、免疫应答和抗氧化等方面起到重要作用。GUEGUEN 等^[25]在研究太平洋牡蛎 (*C. gigas*) 经混合细菌诱导后, ferritin 在血淋巴细胞中的表达未表现出明显细菌诱导上调表达趋势。同样,任红林^[23]报道关于杂色鲍 (*H. diversicolor*) ferritin 基因的结果表明,细菌诱导后 ferritin 在血淋巴细胞中的表达也未表现出明显细菌诱导上调表达趋势。本研究缢蛏经过副溶血弧菌和鳃弧菌诱导处理后, ScFERs 在肝胰腺中的表达出现了显著上调,表明 ScFERs 能被副溶血弧菌和鳃弧菌刺激有效诱导,在一定程度上参与了对弧菌的免疫防御作用。

本研究获得的缢蛏 ScFERs 基因的 cDNA 全长及其组织表达和细菌诱导表达结果,为今后深入了解铁蛋白的结构和功能,以及在缢蛏免疫防御过程中的作用机理奠定基础。

参考文献:

- [1] HARRISON P M, AROSIO P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1275(3): 161-203.
- [2] ANDREWS S C, AROSIO P, BOTTKE W, et al. Structure, function, and evolution of ferritins [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1992, 47(3/4): 161-174.
- [3] ORINO K, EGUCHI K, NAKAYAMA T, et al. Sequencing of cDNA clones that encode bovine ferritin H and L chains [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 118(3): 667-673.
- [4] KIM S R, LEE K S, YOON H J, et al. Molecular cloning, expression and characterization of cDNAs encoding the ferritin subunits from the beetle, *Apriona germari* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 138(4): 423-433.
- [5] THEIL E C. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism [J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(s 5): 1549-1553.
- [6] DURAND J P, GOUDARD F, PIERI J, et al. *Crassostrea gigas* ferritin: cDNA sequence analysis for two heavy chain type subunits and protein purification [J]. *Gene*, 2004, 338(2): 187-195.
- [7] DUNKOV B C, ZHANG D, CHOUMAROV K, et al. Isolation and characterization of mosquito ferritin and cloning of a cDNA that encodes one subunit [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1995, 29(3): 293-307.
- [8] ONG D S, WANG L H, ZHU Y, et al. The response of ferritin to LPS and acute phase of *Pseudomonas* infection [J]. *Journal of Endotoxin Research*, 2005, 11(5): 267-280.
- [9] DARL M, HARRISON P M, BOTTKE W. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 222(2): 353-366.
- [10] SCÜHSSLER P, PÖTTERS E, WINNEN R, et al. Ferritin mRNAs in *Schistosoma mansoni* do not have iron-responsive elements for post-transcriptional regulation [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 241(1): 64-69.
- [11] PAGLAND M, BRIAT J F, GAGNON J, et al. Evidence for conservation of ferritin sequence among plants and animals and for a transit peptide in soybean [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(30): 18339-18344.

- [12] TORTI F M, TORTI S V. Regulation of ferritin genes and protein [J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3505–3516.
- [13] 郑亮. 外源 Fe^{3+} 诱导罗氏沼虾铁蛋白 mRNA 的表达[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(4): 307–313.
- [14] PROUDHON D, WEI J, BRIAT J F, et al. Ferritin gene organization: different between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 42(3): 325–336.
- [15] 徐凤山, 张素萍. 中国海产双壳贝图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 211–213.
- [16] NIU D, FENG B, LIU D, et al. Significant genetic differentiation of 10 populations of the razor clam (*Sinonovacula constricta*) along the coast of China revealed by microsatellite analysis [J]. *Zoological Studies*, 2012, 51(3): 406–411.
- [17] 牛东红, 冯冰冰, 刘达博, 等. 我国缢蛭主产区浙闽沿海群体遗传结构的微卫星和线粒体 COI 分析[J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1806–1814.
- [18] 刘达博, 牛东红, 冯冰冰, 等. 乐清湾和三沙湾缢蛭群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(3): 350–357.
- [19] 冯冰冰, 牛东红, 钟玉民, 等. 缢蛭 ScHsc70 cDNA 的分子特性和表达分析[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(1): 1–12.
- [20] 冯冰冰, 钟玉民, 牛东红, 等. 缢蛭 β actin 基因的分子特性及其表达分析[J]. *水产学报*, 2011, 35(5): 1–10.
- [21] LI C H, LI H, SU X, et al. Identification and characterization of a clam ferritin from *Sinonovacula constricta* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 1147–1151.
- [22] HE X C, ZHANG Y, WU X Y, et al. Cloning and characterization of two ferritin subunit genes from bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(3): 2125–2132.
- [23] 任红林. 杂色鲍 *Haliotis diversicolor* 响应细菌攻毒血淋巴细胞差异表达基因的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [24] WANG X M, LIU B Z, XIANG J H. Cloning, characterization and expression of ferritin subunit from clam *Meretrix meretrix* in different larval stages [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(1): 12–16.
- [25] GUEGUEN Y, CADORET J P, FLAMENT D, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Gene*, 2003, 303: 139–145.
- [26] ZHANG Y, MENG Q, JIANG T, et al. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 135(1): 43–54.
- [27] DE ZOYSA M, LEE J. Two ferritin subunits from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Cloning, characterization and expression analysis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 624–635.
- [28] SALINAS-CLAROT K, GUTIERREZ A P, NUNEZ-ACUNA G, et al. Molecular characterization and gene expression of ferritin in red abalone (*Haliotis rufescens*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 430–433.
- [29] XIE M, HERMANN A, RICHTER K, et al. Nitric oxide up-regulates ferritin mRNA level in snail neurons [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2001, 13: 1479–1486.
- [30] DIETZEL J, HIRZMANN J, PREIS D, et al. Ferritins of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1992, 50: 245–254.

Molecular characteristics and expression analysis of ferritin gene from *Sinonovacula constricta*

NIU Dong-hong¹, FENG Bing-bing², LI Jia-le^{1,3}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Jiangsu Station for Fisheries Technology Extension, Nanjing 210036, Jiangsu, China; 3. Aquaculture Division E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: One EST sequence with high homology with ferritin gene of other species was found from the cDNA library of *Sinonovacula constricta* and then the complete expression sequence was obtained by PCR. The cDNA of this gene was 1 106 bp, which consists of a 128 bp 5' untranslated region (UTR), a 669 bp open reading frame (ORF) and a 309 bp 3' UTR. The translated protein is composed of 222 amino acids, containing a signal peptide of 17 amino acids, with 25.47 ku molecular weight, and its calculated isoelectric point was 5.48. Sequence analysis of the protein revealed that the protein contained a highly conserved motif for the ferroxidase center, which consisted of seven residues of a typical vertebrate heavy-chain ferritin, but lacking a N-glycosylation site and an iron-responsive element (IRE) with a typical stem-loop structure in the 5' UTR position. This gene is H subunit ferritin gene and designated as *ScFERS*. Phylogenetic analysis suggested that the same species of different subsets of ferritin first gathered together, and then clustered with other marine animals. *ScFERS* of *S. constricta* clustered with *LjFERS* of *L. japonica* firstly, and then clustered with *ScFER* of *S. constricta* and *MmFERS* of *M. meretrix*. The quantitative reverse transcriptase (qRT-PCR) analyses showed that the expression level of *ScFERS* gene was highest in liver, significantly higher than other tissues. The expression of *ScFERS* gene in liver tissue was up-regulated following the challenge with *Vibrio anguillarum* and *Vibrio parahaemolyticus*, respectively. This study will be helpful for further understanding the structure and function of ferritin from *S. constricta*.

Key words: *Sinonovacula constricta*; ferritin gene; sequence analysis; gene expression