

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)转铁蛋白(Tf)基因 克隆及序列分析*

李星云 陈 炯 张祖兴 管丹东 张呈念

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

提要 应用 RNeasy animal mini 试剂盒抽提大黄鱼 total RNA, 逆转录合成模板 cDNA; 同时综合分析从 GenBank 数据库查询到已报道的转铁蛋白(Tf)基因序列, 先设计并合成扩增引物扩增出大黄鱼转铁蛋白部分基因序列, 再应用 RACE 技术, 克隆出大黄鱼转铁蛋白全长 cDNA 基因, 全长 2461 个核苷酸, 编码 661 个氨基酸。应用 WCG 软件包, 采用 DNADIST 和 NEIGHBOR 分析方法, 构建了转铁蛋白系统进化树。树图显示与传统的分类地位大致相符, 可以看出转铁蛋白在海水鱼和淡水鱼的进化上的差异, 同时也显示大黄鱼 Tf 与真鲷的同源性最高。

关键词 大黄鱼, 转铁蛋白, 克隆, 系统发育

中图分类号 S432.1

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)俗称黄鱼、黄花鱼, 隶属于脊索动物门(Chordata)、硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae), 是福建、浙江两省的重要经济鱼类。国内外有关大黄鱼的相关报道不多(张祖兴等, 2006), 其中主要为遗传多样性、消化生理及其种质资源等方面的研究报道。全成干等(1999)检测了厦门养殖大黄鱼遗传多样性的同工酶, 李星云等(2003a, b)研究了象山港养殖闽粤东族大黄鱼的数量和质量性状, 王军等(2001)在同工酶水平上及在分子水平上分析了官井洋大黄鱼的遗传多样性。转铁蛋白(Transferrin, 简称 Tf)是一种重要的 β -球蛋白, 是脊椎动物体内铁的运输者, 是机体铁代谢的重要组成部分。自 1945 年 Holmberg 和 Laurell 首次在人血清中发现这种非血红素结合铁的转铁蛋白以来(Holmberg *et al.*, 1947), 人们又在猪等其他哺乳动物以及鱼类、两栖类、爬行类的血清中发现了 Tf 的存在, 随后又相继发现了乳 Tf 和卵 Tf 以及 Tf 的蛋白类似物(Williams, 1968; Rey *et al.*, 1990; Rose *et al.*, 1986)。这些蛋白质(除半转铁蛋白外)具有一些共有的性质, 通常

为糖蛋白, 因而被统称为转铁蛋白家族(Lisa *et al.*, 2005)。Tf 是体液中不可缺少的成分, 不仅参与铁的运输与代谢, 参与呼吸、细胞增殖和免疫系统的调节, 还能调节铁离子平衡和能量平衡, 更具有抗菌杀菌的保护功能(Aisen, 1980)。Tf 的抗菌和抗病机理可能三个方面, 一是 Tf 的螯合铁特性(Suzumoto *et al.*, 1977); 二是 Tf 的遗传多态性(Winter, 1980); 三是 Tf 的糖基(碳水化合物)(Herschberger, 1970); 近年来发现 Tf 还是细胞生长和增殖所必需的生长因子(Barnes *et al.*, 1980); 鱼类转铁蛋白的研究多见于多态性报道, Tf 的多态性在多种鱼类(如鲃、南鲃、六带鲈、海七鳃鳗等)血清中也得到证实(Creysse *et al.*, 1964; Fine *et al.*, 1964; Richard *et al.*, 1967)。有研究指出 Tf 的高杂合度及其丰富的遗传多态性可能与其对于疾病的抵抗能力有关(Kirpichnikov, 1987)。目前尚未见有关大黄鱼转铁蛋白基因的研究报道, 作者通过抽提大黄鱼肝脏 RNA, 采用 PCR 扩增了大黄鱼转铁蛋白基因及其相应的序列分析, 以期为大黄鱼转铁蛋白的研究积累基础资料, 并促进大黄鱼养殖的发展。

* 国家高技术研究发展计划(“863”)项目, 2006AA10A405 号; 浙江省重大项目, 2006C12005 号; 宁波市重大项目, 2004C100040 号。李星云, 教授, E-mail: limingyun@nbip.net

收稿日期: 2006-05-13, 收修改稿日期: 2006-10-30

1 材料与amp;方法

1.1 材料

试验用大黄鱼样本(250g左右)取自宁波象山港养殖网箱,取肝脏和肌肉,盛放于1.5ml的离心管中,超低温冰箱-70℃保存备用。采样前,用含0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水浸泡与amp;样品接触的所有玻璃及金属器皿等24h以上,120℃高温高压灭菌之后高温烤干。克隆载体质粒pGEM-T和amp;大肠杆菌(*Escherichia coli*)购自Promega公司。

1.2 总RNA抽提

总RNA抽提采用Rneasy Plant Mini Kit(QIAGEN公司),方法略加修改:其间等体积的酚/氯仿抽提蛋白质两次,等体积的LiCl沉淀4h,70%的乙醇洗两次后,溶解于DEPC水处理过的ddH₂O中,-70℃保存备用。抽提好的RNA应用甲醛变性电泳检验质量,电泳后在紫外灯下观察并拍照纪录。以总RNA为模板,M₄-T(5'-GTTTTCCAGT-CACGAC(T)₁₅-3'为起始引物,M-MLV逆转录酶逆转录合成第一链cDNA,此cDNA第一链就作为扩增模板。

1.3 引物设计

引物设计是PCR成功的关键。根据已发表的Tf基因序列(Lisa *et al.*, 2005)设计了两对特异性扩增引物,分两次进行扩增:TF1a(+):5'-GARGCXGAYGXCXATXACXYTXGAYGGXGG-3'(其中R=A、G;Y=T、C;X=A、T、C、G)和M₄为引物;第二次的扩增引物为:M₄和TFdw(+):5'-GGAACAGAATACATGAATGC-3'。采用DNA Club软件,计算出引物的相关系数。

1.4 PCR扩增

以经逆转录合成的cDNA第一链作为扩增模板,采用ExTaq DNA聚合酶(TAKARA公司,50μl体系)进行PCR扩增;反应程序为:94℃预变性2min;30个循环扩增(94℃30s,56℃30s,72℃1min);56℃延伸反应10min;4℃保存。

1.5 末端序列的测定5'-RACE

前两步的PCR扩增没有扩增得到全序列,重新抽提一次大黄鱼肝脏total RNA用于基因组5'-末端序列的第一链cDNA合成,先用逆转录起始引物尽可能靠近5'-端,以保证合成足够量的包含完整5'-末端序列的cDNA。第一链cDNA/RNA杂合体用QIAquick胶纯化试剂盒纯化后,在100℃变性2min后立即冰浴冷却,此时cDNA以单链形式存在。随后将连接引物1[5'-CTC TTC CCC TCC

CTC CTC-3;修饰(5'-端磷酸化,3'-端氨基化)]用T₄ RNA连接酶以5'-磷酸连接到单链cDNA 3'-末端的羟基上,50μl反应体系37℃反应30min;以其为模板,引物2(5'-GAG GAG GGA GGG GAA GAG-3')和特异引物结合作半巢式PCR扩增cDNA 3'-末端序列(对应于mRNA 5'-末端序列),之后将产物检测后切胶纯化。

1.6 PCR产物的检测和DNA片断的切胶纯化回收

PCR产物检测应用1%的低熔点琼脂糖凝胶电泳(TAE溶液配制),EB染色后紫外灯下观察拍照纪录。PCR扩增产生的非特异性片断会影响连接反应中目的片断的连接效率,产生大量的假阳性克隆,因此切胶纯化在外源基因片断的克隆中是重要的步骤之一。将紫外灯下观察到的目的条带用干净锋利的刀片切下,转入一灭菌过的Eppendorf管中,应用切胶纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)纯化;获得稀释DNA后测定浓度,-30℃保存备用。

1.7 cDNA亚克隆

pGEM-T载体5'端连有未配对的单个胸腺嘧啶,可直接用于PCR产物的克隆,应用T₄ DNA聚合酶和pGEM-T,将其大小的纯化产物连接;将连接产物转化到*E. coli*感受态细胞。质粒载体多克隆位点在LacZ基因中,重组质粒用-互补进行筛选,转化的*E. coli*涂布含有X-gal/IPTG的LB平板,挑选白色菌落进行质粒鉴定。质粒PCR鉴定中将大的质粒送到上海博亚公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 PCR结果

引物设计分两次进行PCR扩增,均采用50μl体系。第一次扩增的产物大小为1.6kb左右,第二次扩增的产物大小为1.2kb左右;均符合预计的片段的大小。将PCR产物继续进行1%(w/v)琼脂糖电泳,紫外灯下切胶纯化。将纯化好的TF产物与载体pGEM-T相连接,转化大肠杆菌TG1感受态细胞。质粒大小检测正确后进行序列测定,具体扩增结果见图1a和图1b。

2.2 末端序列(Rapid Amplification of cDNA End)检测结果

前两步的PCR扩增没有扩增得到全序列,重新抽提一次大黄鱼肝脏total RNA进行RACE操作。将扩增产物进行1%(w/v)琼脂糖电泳,紫外灯下切下目的片段,转入Eppendorf管中,切胶

纯化。PCR 产物检测如图 1c。

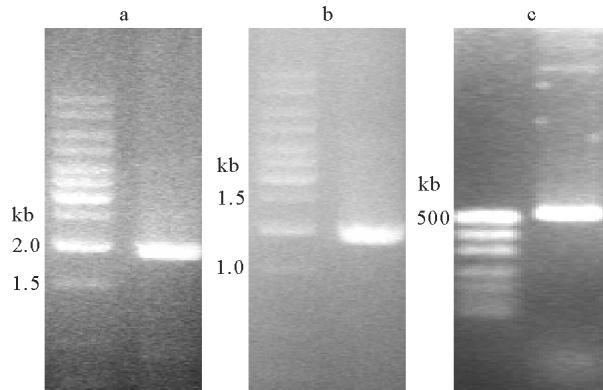


图 1 Tf 基因的 PCR 扩增产物和 RACE 结果

Fig. 1 The PCR product and amplification product of transferrin

a. PCR 扩增产物, Marker 为 GeneRuler TM 1kb DNA Ladder;

b. PCR 扩增产物, Marker 为 GeneRuler TM 1kb DNA Ladder; c. RACE 结果

2.3 大黄鱼转铁蛋白(Tf)基因序列分析

通过序列测定和与已经报道的转铁蛋白基因序列的比对,证实已克隆到了正确的基因。从大黄鱼肝脏 Tf 的序列可以看出,序列全长 2416 个核苷酸,其中 A、T、G、C 的含量分别为 633、599、600、624。有 4 个 ORF,编码总长 684 个的氨基酸链(图 2)。BLAST 结果表明与其他 Tf 核苷酸序列都有较高的同源性。

2.4 大黄鱼转铁蛋白进化树图

应用 WCG 软件包,采用 DNADIST 和 NEIGHBOR 分析方法,对大黄鱼 Tf 和其他物种 Tf 编码的核苷酸序列进行系统进化树分析,分支上表示 100 次成树中该簇出现的次数,仅数值大于 75 的显示,具体见图 3。图 3 中, X54530 为(*Xenopus laevis*, 非洲爪蟾), XM415252 为(*Gallus gallus*, 红原鸡), XM396618 为(*Apis mellifera*, 西方蜜蜂), NM079320 为(*Drosophila melanogaster*, 黑腹果蝇), AB047294 为(*Halocynthia roretzi*, 真海鞘), NM079035 为(*Drosophila melanogaster*, 黑腹果蝇), NM078677 为(*Drosophila melanogaster*, 黑腹果蝇), AY064537 为(*Aedes aegypti*, 埃及伊蚊), AF046126 为(*Riptortus clavatus*, 点蜂缘椿象), AY364430 为(*Galleria mellonella*, 蜡螟), AB158473 为(*Hilo suppressalis*, 二化螟), AF119098 为(*Bombyx mori*, 家蚕), M62802 为(*Heliothis virescens*, 烟草天蛾), AY940116 为

(*Solenopsis invicta*, 红火蚁), NM001011572 为(*Apis mellifera*, 蜜蜂), AY217097 为(*Apis mellifera*, 西方蜂), AY362358 为(*Romalea microptera*, 猛蝗), AY894342 为(*Apriona germari*, 粒肩天牛), AF535146 为(*Mastotermes darwiniensis*, 白蚁), L05340 为(*Lycoris radiata*, 蟑螂), NM205304 为(*Gallus gallus*, 红原鸡), AM262323 为(*Crocodylus niloticus*, 非洲鳄), BC105493 为(*Bos Taurus*, 家牛), BC059367 为(*Homo sapiens*, 人), NM001063 为(*Homo sapiens*, 人), X58533 为(*Oryctolagus cuniculus*, 长毛兔), AY288100 为(*Marmota monax*, 土拨鼠), BC087021 为(*Rattus norvegicus*, 褐家鼠), BC092046 为(*Mus musculus*, 小家鼠), BC022986 为(*Mus musculus*, 小家鼠), M69020 为(*Equus caballus*, 家马), X12386 为(*Porcine sp.*, 猪), NM177484 为(*Bos taurus*, 牛), BTU02564 为(*Bos taurus*, 牛), NM008522 为(*Mus musculus*, 小家鼠), NM001024862 为(*Ovis aries*, 绵羊), NM180998 为(*Bos taurus*, 家牛), AM262320 为(*Eublepharis macularius*, 豹纹壁虎), AM262321 为(*Lacerta agilis*, 沙蜥), AM262322 为(*Chamaeleo calypttratus*, 高冠变色龙), AM262315 为(*Chamaeleo chamaeleon*, 避役), AM262319 为(*Pogona vitticeps*, 鬃狮蜥), AM262318 为(*Anolis sagrei*, 沙氏变色蜥), AM262317 为(*Python molurus*, 印度蟒), AM262316 为(*Lamprophis fuliginosus*, 黄颌蛇), AM262314 为(*Natrix natrix*, 游蛇), NM001015057 为(*Danio rerio*, 斑马鱼), AY383546 为(*Ctenopharyngodon idella*, 草鱼), AF457152 为(*Cyprinus carpio*, 鲤鱼), AF457151 为(*Carassius auratus*, 鲫鱼), AY323918 为(*Carassius cuvieri*, 日本白鲫), AY045574 为(*Carassius auratus gibelio*, 鲫鱼), MAE300650 为(*Melanogrammus aeglefinus*, 黑斑鳕鱼), L40370 为(*Gadus morhua*, 大西洋真鳕), D89087 为(*Oncorhynchus masou*, 虹鳟), D89086 为(*Oncorhynchus rhodurus*, 鲑鱼), D89085 为(*Oncorhynchus nerka*, 大马哈鱼), D89083 为(*Oncorhynchus mykiss*, 硬头鳟), D89084 为(*Oncorhynchus kisutch*, 银鳟), D89091 为(*Salmo trutta*, 鳟鱼), L20313 为(*Salmo salar*, 大西洋鲑), D89090 为(*Salvelinus namaycush*, 远东哲罗鱼),

```

1  GAGCTCTGCT GACCTGGAGA CCCCGCCGTC CAGCATGAAG ACTCTCCTCC
51 TAGTGGCGTT TGTGGGATGC CTCGCCGCCG TGTCCGCGGC CCCCGCTAAC
101 ACGGTGAAAT GGTGCCTAAA ATCGGACCAA GAATATCAGA AATGTTTGCC
151 CCTCAAAGCC AAAGCTCCTG CATTGCGCTG CGTGAAGAAA GACAACACCC
201 TCGACTGCAT CATCGCAATC AAGGCTGGTG AAGCAGATGC CATCACTTTG
251 GATGGAGGAG ACATCTACAC TGCTGGACTG AACAACTACG ACCTGCATCC
301 CATTATTGCT GAGGACTACG GCAGCGCTTC GGACACCTGT TACTATGCTG
351 TTGCTGTGGT GAAGAAGGGC ACTGGATTTG GCATCGAAGA CCTCCAGTGG
401 TCAGGCATTG AAGACAGCCC TGTGGACGAA GCGGTGGCCA ATTACTTCCA
451 GGCCAGCTGT GCCCCGGGGG CAGCAGCAGG CAGCAAACCTG TGTGAGCTGT
501 GCAGAGGAGA CTGTTCCAGG TCCCACAAGG AGCCTTACTA TGA CTACGAC
551 GGAGCCTTCC AGTGTCTGGT GGAGGATGCC GGACAAGTGG CTTTCGTGAA
601 GCATCTCACC GTACCTGCTG CCGAAAAGGA CAAGTACGAG CTGCTGTGCA
651 AGGATAACAC CAGAGCATCT ATCGACAGCT ATAAAACCTG CCACCTGGCC
701 AGAGTACCAG CTCATGCTGT TGTCGCCCGC AAGGACGAAC AGCTGGAGGA
751 ATTAATCTGG ACAAGCCTCA ATTCAGTGCA GGGCTTTAAC CTTTTCTCCT
801 CAGAGGGCTA TCCATCTGGC AAAAATCTGA TGTTCAAGGA CTCAACACAG
851 AGGTTGGTGA GGGTGCCACC ACAAACCTGAT TCCTTCTGT ATTTGGGTGC
901 TGAATACATG GGCATTATCA GTTCTCTGAA GAGAGAACAA ACCCCAGCCG
951 CTACATCCAG TGCCATTAAG TGGTGTGCTG TGGGCCACGC TGAGACGGCC
1001 AAGTGTGACA CATGGAGCAT CAGCGCTGTG ACTGATGACG GCACCGACAT
1051 TGAATGCCAG AATGCCCCCA CAGTTGACGA TTGCCTGAAG AAGATTATGC
1101 GTAAAGAGGC TGACGCGATG GCAGTGGATG GAGGACAGGT TTACACTGCT
1151 GGGAAATGCG GTTTGGTTCC TGTTATGGTG GAGCAGTATG ATCAAGGGCT
1201 GTGCGGCACC TCTGGAGCCG CCTCCTCTTA CTATGCCGTC GCTGTGGTAA
1251 AGAAGGGTTC AGGGGTGACC TGGGAAACCC TGAAGGGCAA GAGTCCTGC
1301 CACACAGGCT TTGGCAGAAC AGCCGGCTGG AACATGCCCA TGGGCCACAT
1351 CCACAAACAG ACTAATGACT GTGACTTCAC TAAGTTCTTC AGTGCTGGCT
1401 GTGCCCCCGG ATCAGATCCC AACTCTCCAT TCTGTA CTCA GTGTGCCGGC
1451 AGTGGA AAAAG CTGTGGGAGA TGAATCCAAG TGCAAAGCCA AGTGCTGATGA
1501 GCAGTACTAC GGCTACGCTG CAGCCTTTAG ATGTCTTGTG GAGGGTGCCG
1551 GCGATGTCGC CTTTCATCAA CACACAATTG TCCCAGAAAA CAGTGATGGC
1601 AACGGTCCAT CATGGGCTAG CGCTGTGCAT GCTGCTGACT ACGAGCTGAT
1651 CTGCCCCGGT AAGGGTCCAG TGCCAATCAC CGATTACGCC TCTTGCAACC
1701 TCGGTGCTGT GCCCGCACAC GCAGTGGTGA CTCGTCCAAA TCTCCACAGC
1751 GAGGTGGTCC GTATTCTCCA GGACCAGCAG TCCAAGTTTG GTCCTGGTGG
1801 CAGTGATTCC TCATTTGAAC TGTTCAAGTC AGATTCAAGGA AAGAACCTCC
1851 TCTTCAAGGA CTCTACCAAG TGTCTCCAGG AGATTCAAGA AGCAACATCC
1901 TATGACCAGT TTTTGGGAAC AGAATACATG AATGCCATGA AATCTCTCAG
1951 GCAGTGCAGC GATAACACCC CAGATCTGGA GAAATCTTGC ACTTTCCACA
2001 CCTGCCAACA AAAAAACTAG TGCCGACGAT GGACGATGTG GTGCCTCATT
2051 TGGCCTTCAG TGATTGAGC ACCTTAGCCA CACTTCCCAC ACTAGGCCCG
2101 AAAATTGCCT GGTGTATTTT CCTGCTGATC TTGCTGTAGA CCTGTTTTTT
2151 TTTT TAGAAG TTGTAACCAA CATATCACAC CAACCACATC CTACAGTTCA
2201 ACTATTCCAC CATCAGTCAT GTCCTACTGT AGCTGTTGAA ACATAATGTT
2251 ACATTGCCTG TATTATTGGA TCAATGTTAT GTTTTGTTAA CACATGCCTA
2301 ACTAGCTCCA CTTCCACCAG CTACAAGTAA ATGCTACCTA TACATTGATT
2351 GATCGGTATT AAAGTATTGT AATATAATAA ATAAAAAAA TCACACAACA
2401 AAAAAAAAAA AAAAAA

```

图2 大黄鱼转铁蛋白核苷酸序列

Fig. 2 The transferrin nucleotide sequence of *P. crocea*

D89089 为(*Salvelinus fontinalis*, 七彩鲑), AY335444 *crocea*), AF219998 为(*Paralichthys olivaceus*, 牙鲆),
 为(*Pagrus major*, 真鲷), ZJ 为本实验材料大黄鱼(*P. D88801 为(Paralichthys olivaceus*, 牙鲆)。

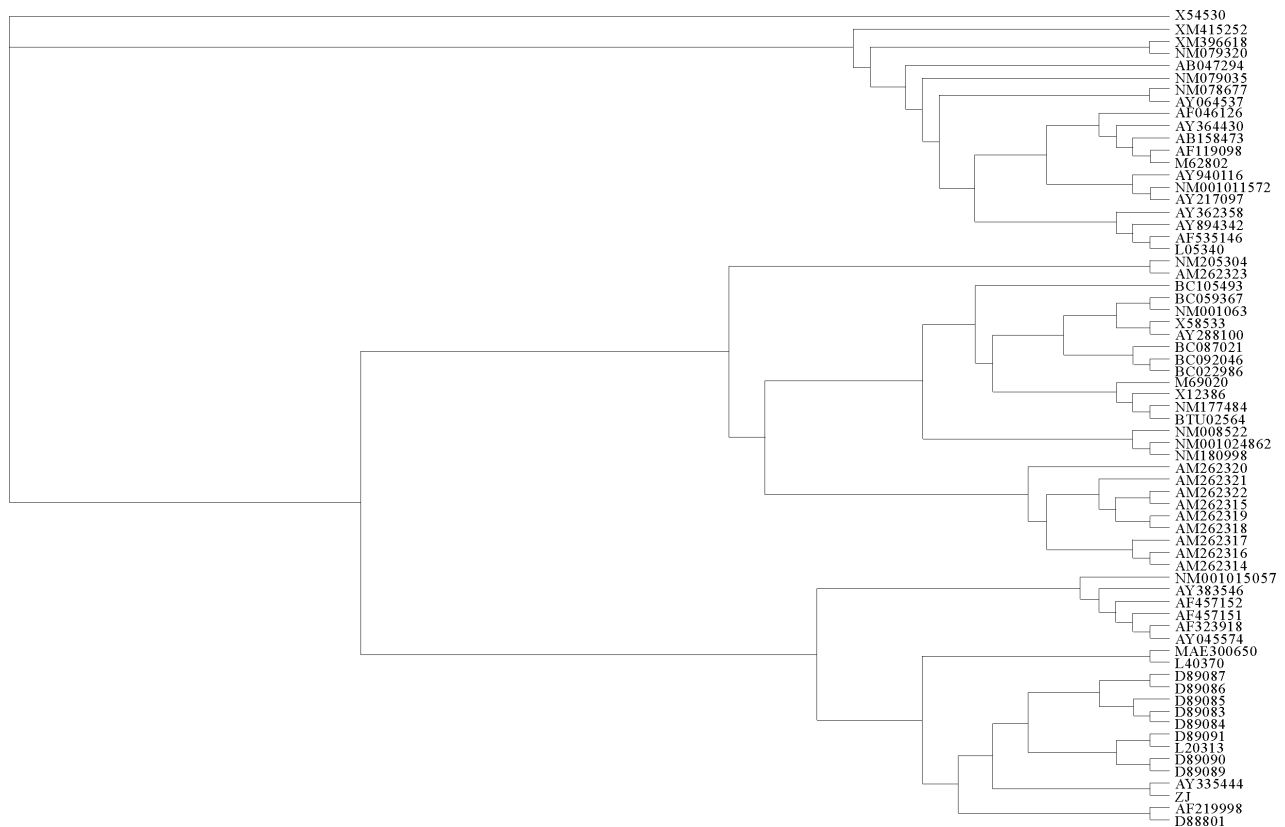


图3 各种 Tf 编码的氨基酸序列系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of AA sequences of transferrin in DNADIST and NEIGHBER

3 讨论与结论

上述转铁蛋白氨基酸序列分为 3 个大簇, 属于两栖类的非洲爪蟾(X54530)独立成簇、昆虫类为一簇、动物类(包括爬行类、哺乳类、鸟类和鱼类)形成一个大簇。按照 Williams 等(1982), 在概括转铁蛋白分子进化时的结论, 两栖类的转铁蛋白类似体有可能是半分子大小的祖先转铁蛋白甚至更早的前体蛋白过渡到更成熟转铁蛋白(动物类转铁蛋白, 有 2 个铁离子结合位点的过渡形式, 因此两栖类的非洲爪蟾独立成簇是有可能的。昆虫类聚类成一个簇, 在这个簇上, 各个目的种类均对应聚类成小分支, 如鳞翅目的蜡螟(AY364430)、二化螟(AB158473)、家蚕(AF119098)、烟草天蛾(M62802)等就聚类成一个小分支; 其他的如膜翅目和双翅目也是如此, 这与传统的系统分类是一致的。可以看出, 脊索动物门的真海鞘(AB047294)位于这个簇上, 提示转铁蛋白的进化上, 真海鞘更靠近昆虫的进化路线上。

另一个动物类聚类成的大簇则可以分成两个小分支: 鱼类(分支 1)和另一个由爬行类、哺乳类以及鸟类聚类成的分支(分支 2), 揭示了转铁

蛋白在这个进化方向上的两个分支。从分支 2 也可以明显地看出 3 个分叉, 分别显示为鸟类、哺乳类和爬行类的 3 个分支, 与分类地位非常对应。例外的是属于爬行类的非洲鳄(AM262323)和红原鸡(NM_205304)聚类成簇, 是否提示非洲鳄的转铁蛋白在进化上更接近鸟类有待进一步研究。在鱼类的分支上, 淡水鱼草鱼(AY383546)、斑马鱼(NM_001015057)、鲤鱼(AF457152)、鲫鱼(AF457151)和日本白鲫(AY323918)等聚类成小分支; 其他海水鱼则聚类成另一个分支; 这说明海水鱼和淡水鱼的转铁蛋白在进化上是有差异的。在海水鱼的分支上, 大黄鱼和真鲷(AY335444)最接近, 它们都隶属鲈形目; 其他的鲈形目(MAE300650 和 L40370)、鲑目和鲟形目都形成小分支, 与它们的分类地位相对应。从图 3 可以看出, 脊椎动物之间的差异都不大, 这可能是由于鱼类、鸟类、两栖类、爬行类与哺乳动物的 Tf 都有 2 个铁结合部位, 属于现代 Tf(侯宪玉等, 1988), 这些蛋白质性质相似但稍有不同, 每一类的不同种属差别不大, 这说明它们的 Tf 在进化上有密切关系, 这与以前的结论相一致(Greene *et al.*, 1968)。

参 考 文 献

- 王 军, 全成干, 苏永全等, 2001. 官井洋野生与养殖大黄鱼同工酶的研究. 海洋科学, 25(6): 39—41
- 全成干, 王 军, 丁少熊等, 1999. 大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶. 厦门大学学报(自然科学版), 38(4): 584—588
- 李明月, 张海琪, 竺俊全等, 2003a. 象山港养殖大黄鱼同工酶的分析. 海洋学报, 25(2 增刊): 231—236
- 李明月, 张海琪, 薛良义等, 2003b. 网箱养殖大黄鱼遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析. 中国水产科学, 10(6): 523—525
- 张祖兴, 李明月, 陈 炯等, 2006. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)热激蛋白的基因克隆、原核表达及抗血清的制备. 海洋与湖沼, 37(4): 337—341
- 侯宪玉, 冯佑民, 1988. 转铁蛋白结构域的研究及转铁蛋白的进化. 生物化学与生物物理进展, 15(4): 70—74
- Aisen P, 1980. Listowsky I. Iron transport and storage proteins. Ann Rev Biochem, 49: 357
- Barnes S D, Sato G, 1980. Serum-free cell culture: a unifying approach. Cell, 22: 649—655
- Creysse R, Silberzahn P, Ricard G *et al*, 1964. Etude du serum de carpe (*Cyprinus carpio*) par electrophorese en gel d'amidon. Bull Soc Chim Biol, 46(1): 149—159
- Fine J M, Drihlon A, Amouch P *et al*, 1964. Existence de groupes seriques chez *Anguilla anguilla* L. Mise en evidence par electrophorese etaurodiographie de plusieurs types de transferrines. C. r. heb Seanc Acad Sci, 258: 753—756
- Greene F C, Freen R E, 1968. Physical evidence for transferrin as single polypeptide chains. Biochemistry, 7: 1366—1372
- Herschberger W K, 1970. Some physicochemical properties of transferrins in brook trout. Trans Amer Fish Soc, 1: 207—218
- Holmberg C G, Lauerll C B, 1947. Investigations in serum copper I. Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. Acta Chem Scand, 1: 944—950
- Kirpichnikov V S, 1987. Genetics and selection of fishes. The Biochemical Genetics of Fishes, 6: 176—239
- Lisa A, Lambert D, Holly P *et al*, 2005. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 140: 11—25
- Rey M W, Woloshuk S L, deBoer H A *et al*, 1990. Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. Nucleic Acids Res, 18: 5288—5298
- Richard K K, Donald W J, 1967. Serum transferrin and serum estrase polymorphisms in an introduced population of the bigmouth buffalo fish, *Ictiobus cyprinellus*. Copeia, 4: 805—808
- Rose T M, Plowman G D, Teplow D B *et al*, 1986. Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. Proc Natl Acad Sci U S A, 83: 1261—1265
- Suzumoto B K, Schreck C B, McIntyre L, 1977. Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kistch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. J Fish Res Board Can, 34: 1—8
- Williams J, 1968. A comparison of glycopeptides from the ovotransferrin and serum transferrin of the hen. Biochem J, 108(1): 57—67
- Williams J, Grace S A, Williams J M, 1982. Evolutionary significance of the renal excretion of transferrin half-molecule fragments. Biochem J, 201: 417—419
- Winter G W, 1980. Resistance of different stocks and transferrin genotypes of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, and steelhead trout, *Salmogairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis. Fish Bull, 77: 795—802

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS ON PHYLOGENETIC EVOLUTION OF TRANSFERRIN (Tf) cDNA IN *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

LI Ming-Yun, CHEN Jiong, ZHANG Zu-Xing, GUAN Dan-Dong, ZHANG Cheng-Nian
(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University) Ministry of Education,
Life Science and Biotechnology Academy, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract Transferrin (Tf) is a type of important protein for iron transportation, and an important component in biological iron circle. RNeasy Animal Mini Kit was used to obtain total RNA from liver tissue of *Pseudosciaena crocea* cultured in Xiangshan Bay, Ningbo, China, and special primers were designed for the PCR amplification of Tf gene in the species and compared to the counterpart in Genbank. Full-length cDNA of the Tf was obtained after RACE for being 2461bp long. The entire cDNA was arranged and analyzed with WCG software package having a phylogenetic tree build-up in DNADIST and NEIGHBOR. The *Pseudosciaena crocea* shared the highest homology with *Pagrus major* (AY335444), and the difference between the two is clearly shown in phylogenetic tree.

Key words *Pseudosciaena crocea*, Transferrin (Tf), Clone, Phylogenetic evolution