

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)ferritin 基因 克隆及表达分析*

李美玉^{1,2} 李 健² 刘 萍² 李吉涛²

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用 RT-PCR 及 RACE 技术获得了总长度为 755bp 的脊尾白虾 ferritin 基因 cDNA 序列。该基因序列 5'和 3'的非编码区分别为 112bp 和 146bp, 开放阅读框 497bp, 推测编码 169 个氨基酸, 预测蛋白分子量 19.1kDa, 等电点 5.46, 该基因命名为 Ecfer 基因。利用 Neighbor-joining 法构建系统进化树分析结果表明, Ecfer 基因氨基酸序列与无脊椎动物中的甲壳动物聚为一支(同源率为 64%—67%)。此外, Ecfer 基因氨基酸序列与脊椎动物铁蛋白 H 链同源率为 53%—57%。采用荧光定量 RT-PCR 研究 Ecfer 基因在组织中以及经 WSSV 刺激后血淋巴、肝胰腺中的表达变化情况。研究结果表明, Ecfer 在肝胰腺、卵巢、肌肉、鳃和血淋巴中均有分布。注射 WSSV 后 3h 和 6h, 肝胰腺和血淋巴 Ecfer 基因表达较对照组均显著上调($P < 0.05$), 并具有显著的时间差异性。说明 Ecfer 基因可能参与了脊尾白虾抵抗 WSSV 入侵的免疫反应。

关键词 脊尾白虾, 铁蛋白, WSSV, 基因克隆, 表达

中图分类号 Q346

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)属甲壳纲、十足目、游泳亚目、真虾族、长臂虾科、白虾属, 为我国近岸广盐、广温、广布种, 对环境的适应性强, 其应用价值已经逐渐得到人们的关注。随着养殖规模的不断扩大, 病害问题亦日渐突出, 近年来不断有混养池塘中脊尾白虾感染疾病而造成经济损失(许文军等, 2010), 脊尾白虾的养殖技术、生态学及行为学等已有少量研究(董建波等, 2011), 而关于免疫方面的研究报道尚不多见。

铁蛋白(ferritin)是一种铁结合和存储蛋白, 广泛存在于生物体内, 是一种保守性较高的多功能多亚基蛋白(李成华等, 2011)。铁蛋白可通过调节铁的储存和释放来调控铁代谢平衡, 在参与核酸和蛋白质等的合成中发挥着重要的作用(Thomas *et al.*, 1999)。不仅如此, 铁蛋白还具有抗氧化胁迫的功能。铁蛋白通过截获细胞中过量的铁, 阻止铁参与 Fenton 反应,

避免产生具有强氧化性的羟自由基($\cdot\text{OH}$), 从而保护细胞免受因各种环境胁迫而导致的细胞氧化性损伤(袁小红等, 2002)。此外, 铁蛋白作为急性时相反应蛋白, 在病原入侵时可参与机体免疫反应(Torti *et al.*, 2002)。关于甲壳动物 ferritin 基因的研究, 在螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)及中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (Huang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2006; 郭慧芝等, 2010)等均有相关报道, 探讨了铁蛋白的免疫功能。而脊尾白虾 ferritin 基因的研究尚未见报道。白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是一种毒力最强, 危害最大的对虾病毒, 并已在多种对虾中研究中初见成果(张天时等, 2010), 但在脊尾白虾中的研究还未见报道。

本实验通过设计简并引物从脊尾白虾中克隆得

* 国家 863 计划“主要养殖甲壳类良种培育”课题资助, 2012AA10A409 号; 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助, 20603022012021 号; 国家虾产业技术体系, CARS-47 号。李美玉, E-mail: momo6860@sina.com

通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-04-02, 收修改稿日期: 2011-04-19

到铁蛋白基因的部分 cDNA 序列, 进而利用 RACE 技术获得其全长 cDNA 序列, 并对铁蛋白基因的组织分布和白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)攻毒刺激后其在转录水平的表达变化进行了分析, 以期探讨脊尾白虾铁蛋白生物学功能及对 WSSV 抗逆机理, 研究结果对认知甲壳动物免疫特点和脊尾白虾养殖具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)180 尾, 取自青岛胶州, 体长(6.2±0.4)cm, 体重(1.72±0.29)g。暂养于 200L 的 PVC 桶中, 每桶 30 尾。暂养海水水温 23℃, 盐度 23, pH 8.2, 持续充氧。每天投喂 3 次, 暂养时间 7d。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取健康脊尾白虾肝胰腺放入液氮中研磨, 按 Trizol 法提取总 RNA。总 RNA 的完整度用 1%凝胶电泳进行检测。RNA 经 DNase 处理后, 用 M-MLV Program 产品进行第一链 cDNA 合成, 将反转录产物置于-20℃冰箱保存备用。DEPC 水、Oligo(dT)₁₈、M-MLV、DNase 购自 TaKaRa 公司, Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司。

1.3 脊尾白虾 ferritin 基因 cDNA 片段的克隆

从 NCBI 中搜寻中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的 ferritin 基因, 利用 Clustal X 对这些序列进行同源性比较, 确定其保守区域, 根据保守序列设计兼并引物(由上海生工合成): ferritin-F: 5'-ACAAGCARATYAACATGG-3', ferritin-R: 5'-TCTCCAAGWCCWGYTGG-3'。以脊尾白虾肝胰腺 cDNA 为模板, 以 ferritin-F 和 ferritin-R 为引物, 进行脊尾白虾 ferritin 基因中间片段的扩增。PCR 反应体积为 50μl, 反应条件: 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 50.6℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 30 个循环, 72℃延伸 10min, 2%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。扩增的 PCR 产物使用上海生物工程技术服务公司生产的 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行纯化, 并克隆到 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司), 重组质粒转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞(TaKaRa 公司), 产生的阳性克隆经菌液 PCR 验证后测序。

1.4 cDNA 5'和 3'末端的扩增

测序结果经 NCBI 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)后, 其实验所得脊尾白虾 ferritin 基因部分序列与其它物种的 ferritin 基因同源。根据测序结果设计基因特异性引物: ferritin-race3': 5'-CAGTGACGAAGAGAGGCAGCATGCCGAA-3', ferritin-race5': 5'-GAGGTCGTGTTGTCCTTGAAACCATTGC-3' 两条引物用于 RACE 扩增 cDNA 全长序列。3'-RACE 和 5'-RACE PCR 扩增使用 Clontech 的 Smart Race 试剂盒进行, PCR 产物的分离纯化测序等方法同部分片段克隆。

1.5 脊尾白虾 ferritin 基因的序列分析

ferritin 基因的同源性分析使用的是 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTN 和 BLASTX 软件。开放阅读框的搜索及氨基酸序列的推测使用的是 DNASTar 软件中的 Expasy 网站(<http://expasy.pku.edu.cn>)的有关软件。蛋白质理化性质预测使用的是(<http://www.expasy.ch/tools/pi>)在线预测。编码蛋白的信号肽预测是 SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)_tool.html)。蛋白三级结构预测使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)在线预测。采用 Clustal W 软件和 Vector NTI Advance 10.3 软件进行多序列比对及同源性分析。系统进化树的构建在序列对比的基础上使用 MEGA 4.1 软件的邻接法构建 Neighbor-joining 系统树。

1.6 脊尾白虾本体表达及 WSSV 刺激下对 ferritin 基因的诱导性表达

1.6.1 WSSV 粗提液制备 称取实验室-80℃保存感染 WSSV 的凡纳滨对虾病虾(黄海水产研究所病研室赠送)取头尖组织(剔除肝胰腺)5g, 加入适量 4℃预冷生理盐水 20000r/min 冰浴匀浆。获得匀浆液, 4℃、3000r/min 离心 10min, 取上清液反复离心 3 次(4000r/min、6000r/min、8000r/min 各 10min), 上清液经 400 目筛绢网过滤去除杂质后, 用 0.45 μm 滤膜过滤除菌, 分装, 并于-80℃冰箱冻存。

1.6.2 试验分组及取样 选取健康的脊尾白虾随即分为对照组和 WSSV 感染组, 每组 50 尾, 实验前随机挑取 5 尾用 PCR 方法检测证实没有 WSSV 感染。实验组每尾在最后腹节注射 WSSV 粗提液 20μl, 对照组注射等量生理盐水。对照组和实验组分别于注射后的 0h、1.5h、3h、6h、12h、24h、48h, 分别取各时间抽取血淋巴和肝胰脏进行 RNA 提取, 每个时间点取 6 尾。此外, 为了检测脊尾白虾铁蛋白基因在不

同组织中的表达水平,另取 5 尾健康脊尾白虾取血淋巴、肌肉、肝胰腺、卵巢、鳃进行 RNA 的提取。

1.6.3 Ecfer 基因 mRNA real-time PCR 定量检测

取反转录好的脊尾白虾肝胰腺和血淋巴 cDNA 稀释 10 倍,按 25 μ l 体系配制反应液。分别加入 SYBR Premix Ex TaqTM II (2 \times) 12.5 μ l, PCR 正反引物 (10 μ mol/L)各 1 μ l, ROX Reference Dye II 0.5 μ l, 稀释好的 cDNA 模板 2 μ l, 灭菌水 8 μ l。脊尾白虾 ferritin 基因荧光定量引物 fer-F: 5'-GCTTTGGATTTTGGAGAAGAACG-3', fer-R: 5'-TATGAATGGCGTCTACCTG TTC-3', 扩增片段大小 133bp。以脊尾白虾 18S rRNA 为内参基因,内参引物 18S-F: 5'-TATACGCTAGTGGAGCTGGAA-3', 18S-R: 5'-GGGGAGGTAGTGACGAAAAT-3', 扩增片段大小 147bp。荧光定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34s, 反应进行 40 个循环。同一样品的目的基因和内参基因均在同一个 96 孔板上进行,每个样品做三个平行。实验仪器为 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, 数据分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法,显著性分析用 Spass11.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 说明具有显著性差异。

2 结果

2.1 Ecfer 基因全长 cDNA 序列分析

根据设计简并引物克隆出脊尾白虾 ferritin 基因的部分序列,并通过 RACE 方法克隆出 ferritin 的 3' 与 5'部分 cDNA 片段,用 DNAMAN 软件拼接得到脊尾白虾 ferritin 基因全长为 755bp 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: JN104389)。EcFer 基因包含 497bp 的开放阅读框(ORF), 5'和 3'的非编码区分别为 112bp 和 146bp, 编码一个由 169 个氨基酸组成的多肽, 预测理论等电点 pI 为 5.46, 分子量大小为 19.1kDa。有一个终止子, 并含有一个多腺苷酸信号 AATAAA 和一个 poly(A)尾巴。起始密码子 ATG 位于 113—115 位核苷酸, 并且在 -3 和 +4 位置均为嘌呤, 符合典型的 kozak 结构(图 1)。因此, 该 cDNA 编码一个全长蛋白质。用 SignalP3.0 程序分析该基因的推导氨基酸发现 Ecfer 无信号肽。根据 Expasy 网站(<http://www.expasy.ch>)提供的分析工具推测在 108—111 位点有一个 N-糖基化位点(图 1)。

通过 Durand 等(2004)方法分析其 5'-UTR, 发现在核酸序列 13—38 的位置有一金属响应组件(IRE)。Ecfer 的 IRE 与其它铁蛋白反应元件一样, 含有保守的序列 CAGUGN(图 2A), 对其 IRE 进行二级结构预

```

1  acgcggggtgaacgagccaagccagtgctctataagcttctcatctccaat
51  ttectacctttttctcttagctttctctctgtgtccacctgcaccage
101  cacagattcatc[atg]gccagccaaatccgcaaaactaccatggggactgc
      M A S Q I R Q N Y H G D C
152  gaacttgccatcaacaagcagatcaacatggaactacatgtagtcaagtc
      E L A I N K Q I N M E L H A S H V
203  tatctggccatgtccagctactttggcagggacgatgtagccctcttgga
      Y L A M S S Y F G R D D V A L L G
254  ttgcagaagtcttcaagaatccagtgacgaagagaggcagcatgccgaa
      L Q K F F K E S S D E E R Q H A E
305  actctcatcgagttccagaacaagcaggaggtcgtgtgtcttgaacc
      T L I E F Q N K R G G R V V L E T
356  attgcaagcccaacgcaattcatggaatggttctggaggccctccag
      I A S P N S N S W N G V L E G L Q
407  acagctttggattttgagaagaacgcaaccagagcctctagatcttca
      T A L D F E K N V N Q S L L D L H
458  aagttagccgcccagaggaacgaccacaactttgcaacttctggagtca
      K L A A E R N D P Q L C D F L E S
509  aaatacctgactgaacaggtagacccattcataagatcgggcagatgata
      K Y L T E Q V D A I H K I G Q M I
560  acacagctgaaacgcctggtccagcaggccttgagaacacctgtttgat
      T Q L K R A G P A G L G E H L F D
611  aagtaacttagtaacaactctgtaacaattgaagatttaggacttttct
      K S L *
662  gatgtttgaggacctgcatttgataacaacgacactggtagtgttgggtt
713  cgagcaagaataaagatacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 脊尾白虾铁蛋白基因 cDNA 的核甘酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of the ferritin encoding cDNA from *E. carinicauda* and its deduced aminoacid sequence
注: 方框内的 ATG 为起始密码子, 终止密码子由 * 表示, 下划线标出的 AATAAA 为加尾信号, 阴影标示铁响应组件。N Q S L 为 N-糖基化位点

测, 发现是一个典型的茎环结构(图 2B)。利用 SWISS-MODEL 对脊尾白虾铁蛋白三级结构域进行预测, 发现 EcFer 蛋白质序列在第 12—40 位, 47—74 位, 94—120 位, 124—156 位和 163—167 位氨基酸构成 5 段 α 螺旋(见图 3 阴影部分), 并形成 4-bundle 的螺旋结构, 而这个 4-bundle 的螺旋结构即是 H-亚基铁氧化酶活性中心。

2.2 Ecfer 基因多序列比对及系统进化树分析

将已经推导出来的脊尾白虾铁蛋白 Ecfer 氨基酸序列在 NCBI 上搜索同源序列, 并使用 Clustal W1.8 软件进行比对, 利用 Vector NTI Advance 10.3 进行排序的结果见图 3。对脊尾白虾铁蛋白 Ecfer 进行同源性分析, 发现脊尾白虾 ferritin 基因与中国对虾、凡纳滨对虾和斑节对虾的同源性最高, 都达到 67%。与其它无脊椎动物如: 中华绒螯蟹、罗氏沼虾、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、淡水螯虾、美洲钝眼蚌

脊尾白虾与中国对虾、克氏原螯虾和斑节对虾聚为一支。与脊椎动物如人、鼠、牛蛙、斑马鱼等的 H 链同源性均在 50% 以上, 目前研究发现脊椎动物铁蛋白 H 链是在铁蛋白分子中心形成一个由 5 个 α 螺旋组成的 4-bundle 的螺旋结构, 即为 H-亚基铁氧化酶活性中心(Hempstead *et al*, 1997; Theil, 1987; Andrews *et al*, 1992), 在脊尾白虾铁蛋白序列中同样找到了这个结构。同时, 也在该序列中找到了与金属结合位点相关的 7 个保守的氨基酸残基。根据以上分析可确定, 该序列为脊尾白虾 ferritin 基因。

铁蛋白是广泛存在于生物体的铁贮藏蛋白, 主要通过释放和储存铁离子的方式对铁代谢进行调控, 调节铁代谢的平衡(陈静等, 2010)。本实验研究发现脊尾白虾铁蛋白 mRNA 在肝胰腺、肌肉、鳃、卵巢和血淋巴中均有表达, 而在肝胰腺中表达量最高, 说明脊尾白虾肝胰腺是参与铁储存和释放的主要器官。铁蛋白可以分为胞质内铁蛋白和分泌型铁蛋白两种类型(Huang *et al*, 1996)。脊尾白虾铁蛋白氨基酸序列通过软件预测发现没有信号肽, 因此不能被转运, 并通过比对发现脊尾白虾的铁蛋白基因与脊椎动物的 H 亚基同源性最高, 而脊椎动物 H 亚基定位于细胞质中(Li *et al*, 2008), 因此可推断脊尾白虾铁蛋白为胞质内铁蛋白。

一些研究表明, 铁蛋白不仅在调节铁代谢平衡中发挥重要作用, 还可以作为急性时相反应蛋白, 参与机体非特异性免疫反应(Durand *et al*, 2002)。Masuda 等(2007)研究发现 ferritin 对外界应激及病原入侵时可起到细胞防御作用。

本实验用 WSSV 注射脊尾白虾, 发现脊尾白虾肝胰腺和血淋巴铁蛋白表达量均有明显的时间差异性。WSSV 注射后肝胰腺和血淋巴铁蛋白表达量均在

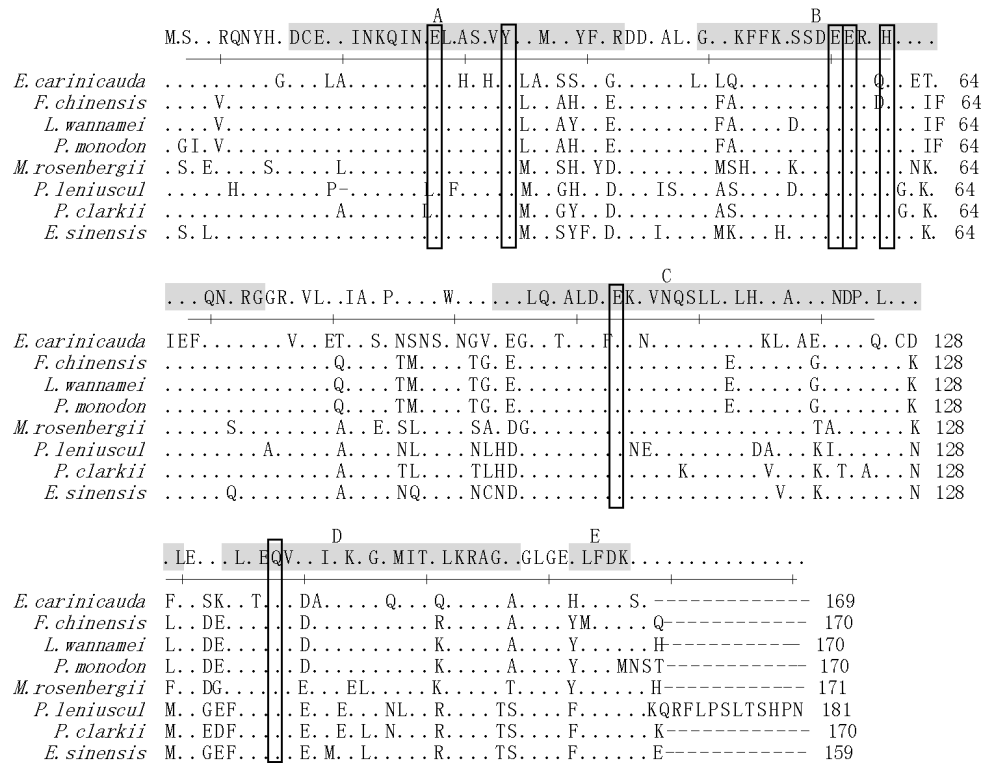


图 3 脊尾白虾铁蛋白与其它甲壳动物铁蛋白的氨基酸序列比对

Fig.3 The comparison of *E. carinicauda* in ferritin polypeptide sequence with other crustaceans
注: “.”: 相同的氨基酸; “-”: 优化比对后出现的间隔; 字母: 氨基酸发生替换; 方框: 与金属结合位点相关的 7 个氨基酸残基; A—E: 5 个 α 螺旋序列, 用阴影标示。所使用 ferritin 基因的 GenBank 登录号见图 4

6h 和 3h 后迅速上调, 其原因是铁蛋白作为急性时相反应蛋白, 在宿主受到病毒入侵后可以迅速上调其表达水平, 并且可能参与机体抵抗病毒感染的免疫反应。Zhang 等(2006)和 Pan 等(2005)均发现 WSSV 刺激下的中国对虾和抗 WSSV 的日本囊对虾 (*Marsupenaeu japonicus*) 肝胰腺中铁蛋白的表达量也会发生明显上调, 与本实验结果相同。在注射 WSSV 后血淋巴 Ecfer 基因表达比肝胰腺先上调, 其原因可能是器官功能的差异性导致的。血淋巴作为虾类非特异免疫防御的重要器官(Shi *et al*, 2005), 在病原入侵后担当着机体非特异免疫防御的重任, 因此血淋巴对病毒入侵的反应更敏感, 能比其它组织更迅速地上调铁蛋白基因表达。在 WSSV 刺激的 12h 和 24h 后, 肝胰腺和血淋巴铁蛋白表达量均开始出现下调, 这可能是由于病毒大量扩增导致机体细胞受到损伤, 开始抑制了铁蛋白基因的表达, 并且肝胰腺比血淋巴损伤更严重。通过分析 WSSV 感染后脊尾白虾肝胰腺和血淋巴 Ecfer 基因的时程表达变化, 更进一步认为 EcFer 参与了对虾免疫系统的运作, 推测 Ecfer

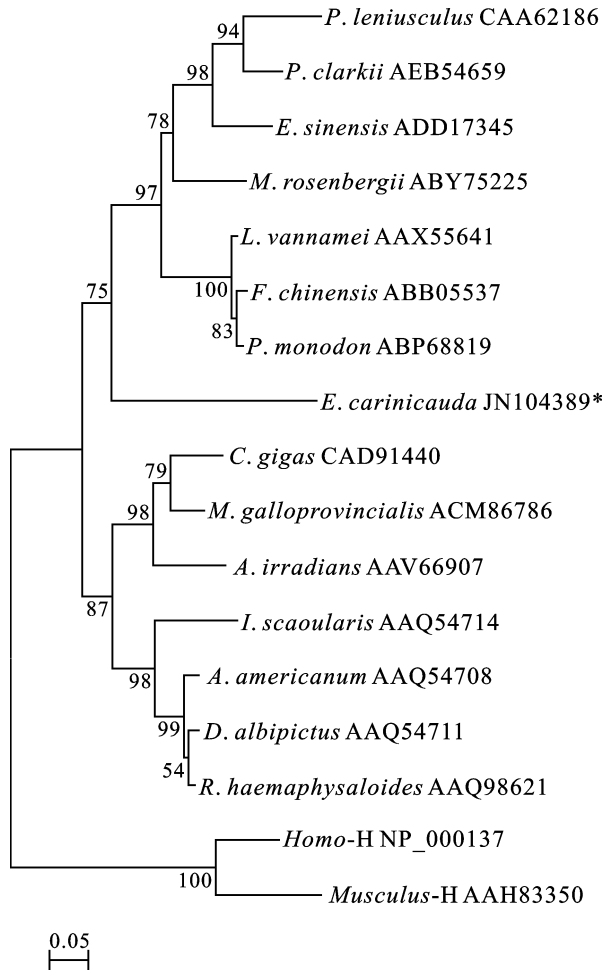


图 4 Ferritin 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of ferritins
H: ferritin 重链

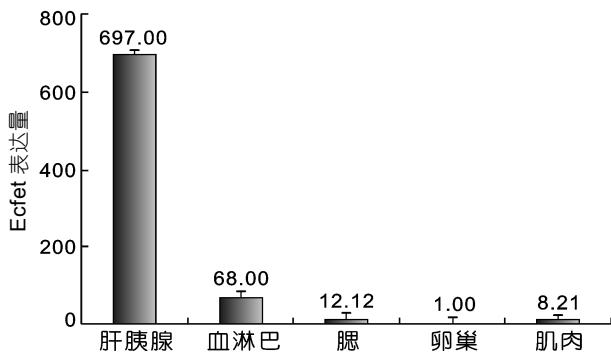


图 5 脊尾白虾铁蛋白基因在器官/组织中的表达分布

Fig.5 Distribution of Ecfet transcript in different organs and tissues in *E. carinicauda*

基因的表达与脊尾白虾抗病力相关。

近年来研究表明, ferritin 还具有抗氧化胁迫及消除重金属毒性的功能(Andrews *et al*, 1992)。如 Omiya 等(2009)研究发现铁蛋白在心肌细胞中对细胞坏死及

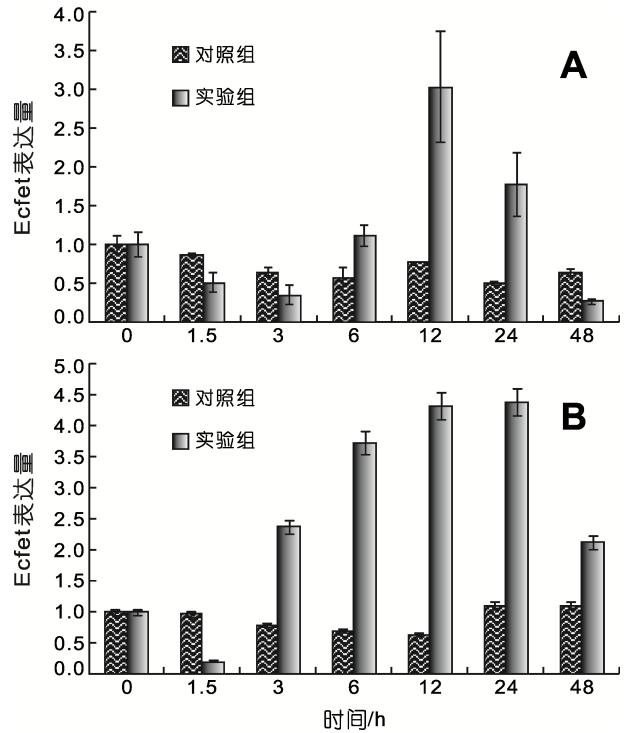


图 6 WSSV 刺激后对脊尾白虾肝胰腺(A)和血淋巴 (B)ferritin 基因在不同时间的表达变化

Fig.6 Expression of ferritin gene in *E. carinicauda* hepatopancreas (A) and haemolymph (B) with after WSSV injection

氧化调节发挥重要的作用。脊尾白虾铁蛋白功能的研究在此方面还处于空白。本实验成功获得了脊尾白虾 ferritin 基因 cDNA 全序列, 初步探讨了脊尾白虾铁蛋白的免疫功能, 为深入研究脊尾白虾 ferritin 基因铁代谢调控规律及其在环境和病原刺激下发挥免疫功能的途径和机理奠定基础。

参 考 文 献

许文军, 谢建军, 施 慧等, 2010. 池塘养殖脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)感染血卵涡鞭虫的研究. 海洋与湖沼, 41(3): 396—402

李成华, 崔 静, 李 晔等, 2011. 南移养殖仿刺参(*Stichopus japonicus* Selenka)铁蛋白基因的克隆及表达特征分析. 海洋与湖沼, 42(4): 567—572

张天时, 李素红, 孔 杰等, 2010. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)自然感染与人工感染 WSSV 抗病力的比较. 海洋与湖沼, 41(5): 763—768

陈 静, 赵永亮, 王 丹等, 2010. 铁蛋白研究现状. 河南师范大学学报(自然科学版), 38(1): 153—155

袁小红, 杨星勇, 罗小英等, 2002. 豌豆铁蛋白的纯化及其抗血清的制备. 中国生物化学与分子生物学报, 18(5): 614—618

郭慧芝, 付建平, 昌鸣先等, 2010. 中华绒螯蟹铁蛋白基因的克隆及表达分析. 水产学报, 34(6): 906—910

董建波, 程建新, 何 健等, 2011. 脊尾白虾和三疣梭子蟹可

- 控生态养殖技术探讨. 水产养殖, (3): 34—37
- Andrews S C, Arosio P, Bottke W *et al*, 1992. Structure function and evolution of ferritins. *J Inorg Biochem*, 47(3): 161—174
- Durand J P, Goudard F, Barbot C *et al*, 2002. Ferritin and hemo-cyan: 210 Pomolecular traps in marine fish oysterlobster. *Mar Eco Prog Ser*, 233: 199—205
- Durand J P, Goudard F, Pieri J *et al*, 2004. *Crassostrea gigas* ferritin: cDNA sequence analysis for two heavy chain type subunits and protein purification. *Gene*, 338: 187—195
- Hempstead P D, Yewdall S J, Fernie A R *et al*, 1997. Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J Mol Biol*, 268: 424—448
- Hsieh S L, Chiu Y C, Kuo C M, 2006. Molecular cloning and tissue distribution of ferritin in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunol*, 21(3): 279—283
- Huang T S, Law J H, Soderhall K, 1996. Purification and cDNA cloning of ferritin from the hepatopancreas of the freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Eur J Biochem*, 236(2): 450—456
- Li M, Saren G, Zhang S, 2008. Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: Evidence for its dual role in immune response and iron metabolism. *Comp Biochem Physiol (Part B)*, 150(3): 263—270
- Masuda T, Goto F, Yoshihara T *et al*, 2007. Construction of homo and heteropolymers of plant ferritin subunits using an *in vitro* protein expression system. *Protein Expression Purif*, 56: 237—246
- Omiya S, Hikoso S, Imanishi Y *et al*, 2009. Down regulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes. *Mol Cell Cardiology*, 46: 59—66
- Pan D, He N H, Yang Z Y *et al*, 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev Comp Immunol*, 29: 103—112
- Shi Z, Wang H, Zhang J *et al*, 2005. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. *J Fish Dis*, 28(3): 151—156
- Theil E, 1987. Ferritin: structure gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Ann Rev Biochem*, 56: 289—315
- Thomas A M, Rogers J T, Leedman P J, 1999. Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(10): 1139—1152
- Torti F M, Torti S V, 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10): 3505—3516
- Zhang J Q, Li F H, Wang Z Z *et al*, 2006. Cloning expression and identification of ferritin from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J Biotechnol*, 125(2): 173—184

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF FERRITIN GENE IN *EXOPALAE MON CARINICAUDA*

LI Mei-Yu^{1,2}, LI Jian², LIU Ping², LI Ji-Tao²

(1. Ocean University of Shanghai, Shanghai, 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The ferritin gene in *Exopalamon carinicauda* was first cloned using RT-PCR and RACE and a 755bp cDNA was acquired. The result of sequencing indicated that the 5'- and 3'-untranslated regions (UTR) of this gene were 112bp and 146bp, respectively. It had an open reading frame of 497bp that encoded a 169 amino-acid polypeptid (Mr 19.1kDa), which had the isoelectric point (pI) of 5.46. The cDNA sequence was named Ecfer. Phylogenetic analysis using neighbor-joining on amino acid sequence from different species showed that Ecfer was in the same category as those in the crustaceans (homology was 64%—67%). In addition, the amino acid sequence of Ecfer shares 53%—57% similarity with the ferritin H in vertebrates. We used quantitative real-time PCR to estimate mRNA expression of Ecfer in organs or tissues and its induced expression in haemolymph, hepatopancreas of *E. carinicauda* following WSSV infection. The results showed that Ecfer expression existed in all tested organs or tissues of *E. carinicauda*, including hepatopancreas, ovary, muscle, gills, and haemolymph. 3h and 6h after WSSV injection, the levels of Ecfer mRNA in hepatopancreas and haemolymph clearly increased, and this increase changed with time. We then concluded that Ecfer may be involved in the immune response of resisting WSSV invasion in *E. carinicauda*.

Key words *Exopalamon carinicauda*, Ferritin, WSSV, Gene cloning, Expression\