

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*

李成华¹ 崔 静¹ 李 晔¹ 周 君¹ 苏秀榕¹ 李太武^{1,2}

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

提要 采用 cDNA 文库、RACE、荧光定量 PCR 和 Western blot 技术, 克隆了南移养殖仿刺参铁蛋白基因的全长序列, 并对其表达特征进行了研究。结果表明, 南移养殖仿刺参铁蛋白 cDNA 全长 1222bp, 包括 187bp 的 5'UTR; 513bp 的 3'UTR 和编码 173 个氨基酸残基的 522bp 的开放阅读框。诸如铁结合序列标签和铁调控元件等铁蛋白特征结构基元在南移刺参铁蛋白中也高度保守; 养殖环境条件的改变影响了铁蛋白在某些组织的表达水平, 南方养殖仿刺参肌肉带铁蛋白表达量近乎北方养殖仿刺参的 2 倍, 而在呼吸树中两者表达水平没有明显差异。Western blot 揭示本研究获得的铁蛋白多克隆抗体不仅与重组蛋白起强的特异性反应, 而且还特异性识别肌肉中的天然蛋白, 该抗体可用于仿刺参铁蛋白功能的后续研究。

关键词 仿刺参, 铁蛋白, 荧光定量 PCR, 蛋白印迹 Western blot

中图分类号 Q346

铁蛋白(ferritin)是一类广泛存在于动物、植物和微生物的保守的铁稳态蛋白, 具有很强的存储铁离子的能力(牛禾等, 2010)。研究表明, 来源于蜜蜂(Wang *et al*, 2009)、文昌鱼(Li *et al*, 2008b)、罗氏沼虾(Qiu *et al*, 2008)、小龙虾(Huang *et al*, 1996)、蜗牛(von Darl *et al*, 1994)、牡蛎(Zhang *et al*, 2003)、泥蚶(贺静静等, 2009)和可口革囊星虫(杜莉利等, 2008)等无脊椎动物铁蛋白与脊椎动物铁蛋白的 H 亚基相近。

仿刺参(*Stichopus japonicus* Selenka)属于棘皮动物门、海参纲的重要经济种类, 是一种高蛋白、低脂肪、低糖、无胆固醇的经济水产动物, 其巨大的经济价值和药用价值极大地推进了该物种的养殖范围由北方向南方拓展。仿刺参的良种问题是制约该品种养殖业发展的重要瓶颈。以铁蛋白为代表的抗性基因的发掘是良种培育的关键和基础。本研究借助 cDNA 文库和 RACE 技术, 从南移养殖的仿刺参中克隆了其全

长 cDNA 序列, 并利用定量 PCR 研究了该基因在南北养殖环境下基因表达水平的变化。最后成功制备了南移养殖刺参铁蛋白的特异的多克隆抗体, 为下一步该基因的功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

仿刺参北方养殖个体取自山东烟台养殖场, 南方养殖个体取自浙江象山。4 周龄 BALB/c 小鼠购于浙江省实验动物中心。RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂、pMD18-T 质粒、Taq DNA Polymerase、DNA Marker 均为 TaKaRa 产品, 荧光染料 SYBR Premix Ex TaqTM II、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于上海生工生物工程技术服务有限公司。表达宿主菌 *E. coli* BL21、表达质粒 pET-28a(+)由本实验室保存。兔抗鼠 IgG, 弗氏佐剂购自 Sigma 公司, 其余均为国产分析

* 国家农业科技成果转化资金项目, 2007GB2C220359 号; 浙江省重大科技专项(优先主题)重大农业项目, 2008C02009-1-2 号; 宁波市农业科技成果转化资金项目, 2007C30001 号; 宁波市自然科学基金项目, 2011A610013 号; 宁波大学海洋生物学学科项目, xk111087 号。李成华, 副研究员, E-mail: lichenghua@nbu.edu.cn

通讯作者: 李太武, 教授, 博士生导师, E-mail: litaiwu@nbu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-15, 收修改稿日期: 2010-12-19

纯试剂, 购于宁波奥博化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 仿刺参铁蛋白基因全长序列的克隆 基于 cDNA 文库测序比对结果, 筛选出仿刺参铁蛋白的核心序列, 利用载体上的通用引物 T3、T7 和核心序列特异性引物 P1(5'-CTGTTCCGTCAGGTAGTGGG-3') 和 P2(5'-CTGCTGGATGCTTTCAAGGT-3') 分别扩增其 5'端和 3'端。扩增条件为: 94℃ 5min、94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 30s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物经 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用胶回收试剂盒纯化目的产物。纯化产物连接 pMD18-T 载体后, 转化感受态大肠杆菌, 筛选阳性克隆, 进行测序分析。

1.2.2 仿刺参铁蛋白序列分析 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 和蛋白分析系统 (<http://www.expasy.org/>) 软件用于仿刺参铁蛋白的 cDNA 和氨基酸序列分析。SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白结构域。利用 SWISS-MODEL 推测软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 计算仿刺参铁蛋白和人铁蛋白重链的四级结构。

1.2.3 南北养殖仿刺参铁蛋白基因 mRNA 差异表达 用荧光定量 PCR 检测铁蛋白基因在南北养殖仿刺参呼吸树和肌肉带组织中的表达差异。利用 P3 (5'-CGAGTCGTGGGAGATTTTT-3') 和 P4 (5'-CACTTGGCTGCTTTGAAC-3') 扩增仿刺参 18S rRNA 片段做内参, 设计仿刺参铁蛋白基因特异性引物 P5 (5'-CTGCTGGATGCTTTCAAGGT-3') 和 P6 (5'-CTGTCCGTCAGGTAGTGGG-3'), 检测铁蛋白的表达。PCR 循环体系: 94℃ 变性 5min、94℃ 变性 15s、56℃ 退火 15s、72℃ 延伸 20s, 共 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 反应结束后, 首先进行溶解曲线分析, 确认反应的特异性。再用 Rotor-Gene 的软件进行 CT 值分析, 采用 $\Delta\Delta$ CT 方法计算铁蛋白基因相对表达量。

1.2.4 原核表达载体的构建及体外表达 根据拼接得到的铁蛋白基因的全长序列设计引物 P7 (5'-GGA TCCATGCAGCCAAGCCAAGTC-3') 和 P8 (5'-AAGC TTTTAATCCTCCTTC AGGTT-3') (下划线为引入的限制性内切酶 *Bam*H 和 *Hind* 的识别序列), 以构建的南移仿刺参 cDNA 文库为模板, 扩增仿刺参的铁蛋白基因的编码区序列。PCR 反应条件如下: 94℃ 5min, 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 1min, 35 个循环, 终

延伸 72℃ 10min。按照 1.2.1 的方法回收目的产物。纯化产物经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切后插入到同样双酶切的原核表达载体 pET-28a(+) 中, 获得重组质粒, 转化 *E. coli* BL21 菌株, 测序验证阳性重组子。将鉴定的阳性重组子接种到 LB 培养液 (含 50μg/ml 卡那霉素), 37℃ 振荡培养至菌液 OD_{600} 值为 0.5 时加入终浓度为 1mmol/L IPTG, 37℃ 诱导表达, 分别在 0、1、2、3、4h 收集菌液 1mL。12000r/min 离心 5min 收集沉淀, 加入 40μl pH 7.4 的 PBS 重悬后, 加入 10μl 的 5 × 样品缓冲液, 水浴煮沸 10min 后立即放冰上, 稍离心, SDS-PAGE 检测表达情况。

1.2.5 多克隆抗体的制备 用 3mol/L 的 KCl 洗涤 SDS-PAGE 凝胶, 切胶回收目的表达产物, 转移至 PBS 中捣碎, 腹腔注射 5 只雄性的四周龄的 BALB/c 小鼠。首次免疫抗原用量为 100μg/只, 二次免疫抗原用量为 75μg/只, 三次免疫抗原用量为 50μg/只, 加强免疫抗原用量为 75μg/只。首次免疫、二次免疫、三次免疫各间隔一周, 三次免疫与加强免疫之间间隔三天。小鼠加强免疫三天后摘眼球取血, 收集血液于 37℃ 静置 30min 后, 再在 4℃ 下静置过夜。室温 1600r/min 离心 10min, 吸取上层的多抗血清, 分装于 -80℃ 保存备用。

1.2.6 Western blot 检测 取仿刺参肌肉组织和诱导 4h 含有阳性重组子的 *E. coli* BL21 菌体, 进行总蛋白提取。将组织在液氮预冷的研钵中充分研磨, 按质量比 1 : 5 的比例用 PBS 重悬, 在冰上超声破碎后 12000 r/min 离心 15min, 取上清。加入 5 × 样品缓冲液, 沸水煮 10min, SDS-PAGE 电泳分析, 待溴酚兰跑到底部停止电泳。将 PAGE 蛋白在 20V, 4 过夜转移至同样大小的 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶 (溶于 TBST 中) 封闭 4h, 以 1 : 5000 的比例加入抗仿刺参铁蛋白的多克隆抗体。多克隆抗体先用 *E. coli* BL21 菌体吸附 4—8h, 与膜杂交反应 2h, 用 TBST 漂洗膜 3 次, 每次 10min, 最后再用 TBS 漂洗 10min; 再加二抗杂交 1h, 经 TBST 漂洗和 TBS 漂洗后, 用 NBT/BCIP 显色。

2 结果

2.1 仿刺参铁蛋白 cDNA 全长克隆

在 5'RACE 中, 以南移养殖的仿刺参 cDNA 文库为模板, P1 和 T3 为引物, 扩增获得长 604bp 的片段, 与预期片段大小相近。在 3'RACE 中, 以 P2 和 T7 为

引物, 获得长 804bp 的扩增片段。将上述两段与 EST 拼接后, 最终得到 1222bp 的代表仿刺参铁蛋白全长的 cDNA 序列。仿刺参铁蛋白核苷酸及其编码的氨基酸序列如图 1。

2.2 序列分析

仿刺参铁蛋白 cDNA 序列全长 1222bp, 包括 187bp 的 5'非编码区(5'UTR), 513bp 的 3'UTR, 以及 522bp 开放阅读框(ORF)。5'UTR 区域, 以 CAGTGA 为中心的铁调控元件在仿刺参中高度保守, 而且其上游 6 个核苷酸位置处的 C 残基也高度保守(Jin *et al.*, 2011)。3'UTR 区域包括一个 25bp 的腺苷酸的 Poly(A) 尾巴和一个规则的多聚腺苷酸化信号 AATAAA(图 1)。ORF 编码 173 个氨基酸的多肽, ExPASy Proteomics tools 预测的分子量和理论等电点分别为 20.0kDa 和 5.42; 推测的铁结合签名序列 EEREHA EKLMKYQN KRGGR 在仿刺参中除了两个氨基酸残基发生突变外, 其它位置都高度保守。由 7 个氨基酸残基(Glu-25, Tyr-32, Glu-59, Glu-60, His-63, Glu-105 和 Gln-139)组成的亚铁氧化酶活性中心在仿刺参推

测的氨基酸序列中也高度保守, 该中心包括 4 个氨基酸残基(His-55, Glu-57, Glu-58 和 Glu-61)组成的亲水基团中心, 以及由 3 个氨基酸残基(His-116, Tyr-129 和 Glu-131)组成的铁离子通道。与已报道的其它物种铁蛋白类似, 仿刺参铁蛋白也具有潜在的磷酸化位点 NQSL(图 1)。四级结构预测证实海参铁蛋白与人类铁蛋白的 H 链亚基结构类似, 均包括四个长的螺旋结构和一个短的螺旋结构, 且每个螺旋的位置也非常相近(图 2)。

2.3 同源性分析

将获得的仿刺参铁蛋白推测的编码氨基酸序列经 BLAST 序列比对发现, 仿刺参铁蛋白与棕色岩石海参 *Holothuria glaberrima* (ABS29643)、福氏海盘车 *Asterias forbesii* (AAB60883)、皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai* (ABY87353)、太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* (CAD91440)、海湾扇贝 *Argopecten irradians* (ADR 71732)、斑马鱼 *Danio rerio* (NP 571660)的铁蛋白基因的氨基酸序列有较高的同源性。其中与北方仿刺参的同源性最高, 编码的蛋白序列完全一致, 但 3'UTR

长度差异很大(杨爱馥等, 2010), 这可能与南移养殖环境因子的改变密切相关。仿刺参铁蛋白与隶属于脊椎动物的斑马鱼的铁蛋白重链同源性也有 79%。由此可见, 铁蛋白在生物进化过程中是十分保守的, 这可能与该蛋白在细胞内的广谱性的功能角色息息相关。

2.4 进化分析

应用 MEGA 4.1 程序, 以人铁蛋白重链为外群, 采用邻接法

```

1  ATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCCTCTAGAAGTCTAGTGGATCCC
74  CCGGGCTGCAGGTTTTCGCTTTCGCAGTGACGAAACCAGACAAAAGTTCGCCCAAAATTCATCAAAATATTCTAC
149  TTTTCGTGTGATATTTTCGCCCAAAAAAGAACATCAAGATGCAGCCAAGCAAGTCCGCCAGAAGTTCATGAG
1  M Q P S Q V R Q N F H E
224  TTGTGTGAGGCCGAGTGAACAAGCAAACTCAACTTGGAGTTGATGCTTCTACACTATCATTCATCGCCTTC
13  L C E A G V N K Q I N L E L Y A S Y T Y H S I A F
299  TACTTTGACCGGATGATGTCGCCCTTCTCGAGCCACAAGTACTTCAAGAAGCAGTCAGAGGAAGAACGTGAA
38  Y F D R D D V A L P G A H K Y F K K Q S E E E R E
374  CATGCCGAGAACTGATGAAGTTTCAGAACCCAGCGAGGTGGTGGCGTGAAGCTCAAGGACATCAGCGCTCCAGAA
63  H A E K L M K F Q N Q R G R V K L K D I T A P E
449  AAGGAAGAATGGGCGAGCTGCTGATGCTTTCAGGTCGCCCTTGAAGTCAAGGAAAGAGTGAACCCAGAGTCTG
88  K E E W G S L L D A F K V A L E L E K K V N Q S L
524  TTGGACCTTCACGGTCTGCGAGACTCCAAGAAGGACGCGCAGATGTCGACTTTCATCGAGACCCACTACTCTGAC
113  L D L H G L A D S K K D A Q M C D F I E T H Y L T
599  GAACAGGTGGAGCCATCAAGGAGATCGGTGACCACATCCAATCTGAAGCGCGTCCGACCCGCGCTGGGCGAA
138  E Q V E A I K E I G D H I T N L K R V G T G L G E
674  TTCATCTACGATAAAGGAGAACCTGAAGGAGGATTAAGACCCGAGCTCCCTCGGATGCCGTGGAACGGTCCGACT
163  F I Y D K E N L K E D *
749  ACTTCCTTAGGAAAGAATAAAAAGAACATTTTAAAAATTTTCGAAAACAAAATCTAGGCACCGATGAAAAAAA
824  GAAAAAAGAATATTGTTCAGTACAAATGCCAGAGACCAACTGGGAATATTACTAAATCTTTGGGATTAAG
899  ATATTGTCTGCACAAATCTGTCAATCCAATGCTGTGCAAAATACAAAATCAATGTACCCTATTCCAAGTTAAT
974  TGACATTTGAACTGTGTAACAATTTGTAAGTAAGCCAAGTTATGAAGAGTCCGACCCACACGAAGCACATTTAACA
1049  TGTGAAGTAATTAATTTTAAAGAAATAAAAAAATAAAAAGGAAAGATTAATAAATTGAGACCCACAGGATTTG
1124  GACTTTTAAATATGATTTTTTTTTGTATGCATGAATTTTTTTTTTAAAGGAAATGTGTGGTATCAATAAAAAATA
1199  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 仿刺参铁蛋白全长 cDNA 及其推测氨基酸序列

Fig.1 Full-length ferritin cDNA of *S. japonicus* (SjFER) and its deduced amino acid sequence

注: 阴影加框表示铁结合区域特征序列; 虚线表示 N-糖基化位点; 实线表示规则的多聚腺苷酸加尾信号; *为终止密码子

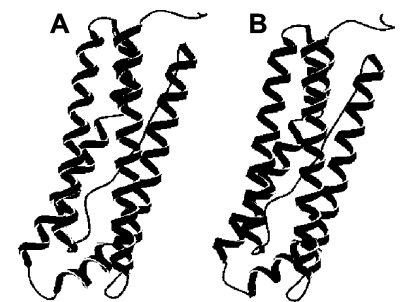


图 2 仿刺参铁蛋白和人类铁蛋白 H 亚基四级结构预测结果

Fig.2 Structural prediction of ferritin from *S. japonicus* and human using Swiss-Model

A. 仿刺参铁蛋白; B. 人铁蛋白 H 亚基

(neighbour-joining method)构建铁蛋白的系统进化树,结果如图 3。结果表明:仿刺参的铁蛋白首先与棕色岩石海参、福氏海盘车的铁蛋白聚为一支,然后与软体动物的铁蛋白形成一个姊妹群;该姊妹群最后与高等生物的铁蛋白形成的另一姊妹群聚为一大类群,该大类群与甲壳纲的来源的铁蛋白进化地位相近。该结果揭示甲壳动物与其它无脊椎动物的铁蛋白进化模式不同。

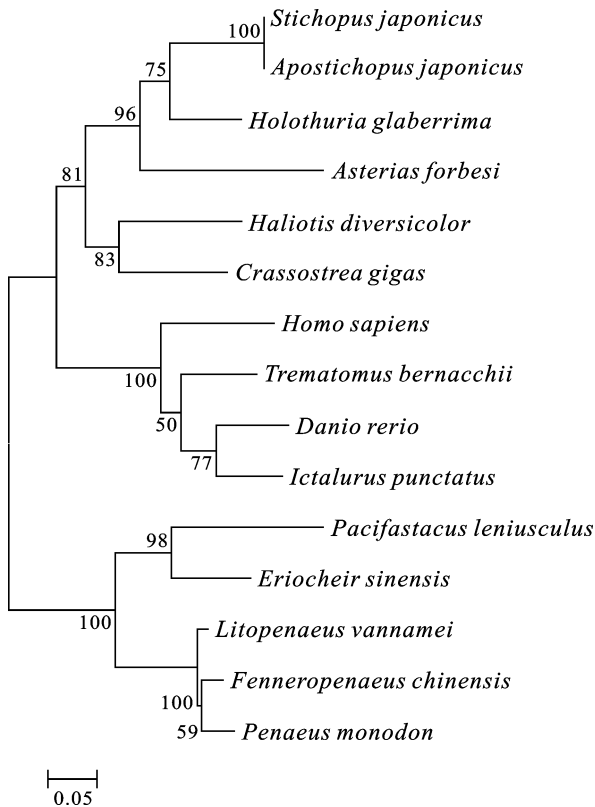


图 3 基于 NJ 算法的铁蛋白氨基酸序列的系统进化树
Fig.3 Unrooted phylogenetic tree of ferritins based on NJ method

2.5 南北养殖仿刺参铁蛋白基因差异表达

为了检测在仿刺参南移养殖对于铁蛋白表达水平的影响,采用 18S rRNA 基因作为内参分别对北方山东烟台和南方浙江象山仿刺参体内的呼吸树和肌肉带铁蛋白基因表达水平进行了评估(图 4)。结果表明,南北方养殖刺参肌肉带和呼吸树中铁蛋白表达量均有差异,其中肌肉带中的铁蛋白的量差异极显著($P < 0.01$),南方肌肉带铁蛋白的表达量近乎北方肌肉带表达量的 2 倍。

2.6 铁蛋白体外重组表达

阳性转化株和阴性对照菌株经 SDS-PAGE 电泳分析重组铁蛋白的表达,如图 5A 所示。IPTG 诱导后,

在 24kDa 处可见明显的表达产物,该位置与预测的仿刺参铁蛋白分子量一致,而未经诱导菌株与空载体阴性对照菌在此位置确缺少该条带,表明目的蛋白在细菌中得到了表达。同时发现,随着诱导时间的递增,目的条带的亮度也逐渐增加,表达量明显提升。

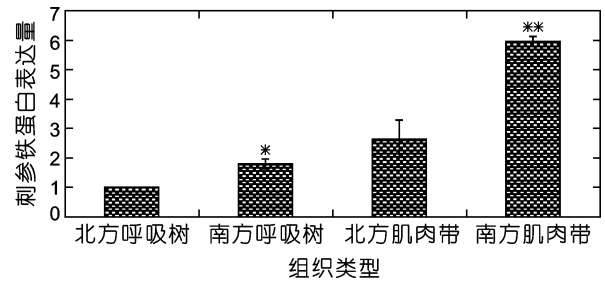


图 4 南北养殖仿刺参铁蛋白 mRNA 组织表达差异分析
Fig.4 Tissues expression profiles analysis of ferritin from North and South cultured *S. japonicus*

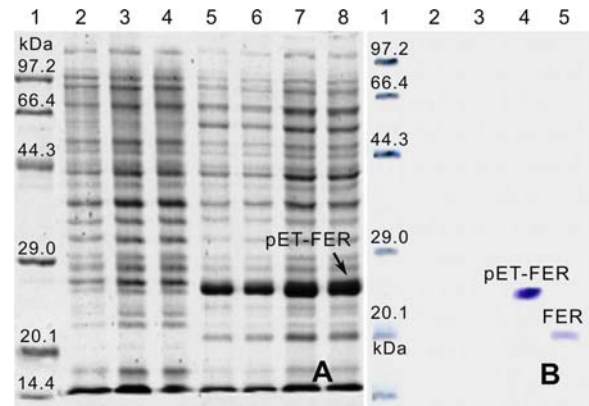


图 5 SDS-PAGE 检测仿刺参铁蛋白的体外重组表达产物 (A)和 Western blot 检测多抗的特异性(B)

Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant product of *S. japonicus* ferritin (A) and specificity of ferritin polyclonal antibody determined by western blot (B)

A: 1. 蛋白质分子量标准; 2—4. 阴性对照; 5—8. 诱导 1h、2h、3h、4h 的仿刺参铁蛋白重组产物。B: 1. 蛋白质分子量标准; 2. 重组铁蛋白阴性对照; 3. 抗血清的阴性对照; 4. 重组铁蛋白; 5. 仿刺参总蛋白提取物

2.7 Western blot 分析

利用 2.6 的表达产物,制备多克隆抗体,进行 Western blot 分析,结果见图 5B。制备的多克隆抗体可以在 24kDa 位置处特异性识别仿刺参铁蛋白的体外重组产物。*E. coli* BL21 菌体自身蛋白与多抗没有特异性结合,不发生抗原抗体反应,且免疫前血清与 PBS 对照组分别呈阴性反应,证实本实验获得的多抗是成功的。利用此抗体,在仿刺参总蛋白提取物中特异性识别了一条略小于重组蛋白的条带,能与多抗

特异性结合, 且与仿刺参铁蛋白的分子量相符。

3 讨论

本研究中, 作者克隆和定性了南移养殖仿刺参的全长铁蛋白基因, 并且从中找到了诸如铁调控元件、铁结合标签序列以及亚铁氧化酶活性中心等一些铁蛋白保守的特征序列和结构。BLAST 分析表明, 仿刺参的铁蛋白属于脊椎动物的 H 型亚单位的成员, 且与多种无脊椎动物的铁蛋白同源性很高。基于 NJ 算法的系统树构建也揭示仿刺参的铁蛋白与棘皮动物的铁蛋白首先聚为一支。上述分析证实本实验获得的仿刺参铁蛋白是 H 型铁蛋白家族的新的一员。

铁蛋白的主要生理功能是储存机体中过量的铁, 避免产生铁中毒或释放铁给机体需铁的细胞, 用于体内生物合成含铁的蛋白质或酶, 从而使铁元素在机体中维持一种动态平衡。铁蛋白不仅仅是一种铁调节蛋白, 在体内免疫中也起着一定的作用, 可以富集金属离子, 使机体免受侵害, 在对外界应激及病害感染时还可起到细胞防御作用(Masuda *et al*, 2007)。目前, 已有研究发现铁蛋白还具有调控细胞增值和机体生长发育的功能, Clemens 等(1989)对曼氏血吸虫童虫进行培养, 观察铁蛋白对其生长发育的影响。结果显示在无血清的培养基中的虫体经培养 12 天后, 其大小仍停止在未发育的状态; 而在培养基中加入铁蛋白后, 童虫迅速生长发育, 其刺激童虫生长发育的作用甚至超过血清的作用。Chen 等(2003)利用 Northern blot 揭示了卤虫(*Artemia franciscana*)发育过程中, 初期铁蛋白的表达量轻微上升, 随后下降, 到 16h 后完全消失。仿刺参的铁蛋白是否也具有相近的功能需要进一步分析。作者目前研究结果则证实仿刺参铁蛋白与环境适应密切相关。南北养殖刺参铁蛋白虽然编码序列完全一致, 但 3'UTR 长度差异极大(北方养殖刺参长度仅为 137bp, 而南移养殖刺参则为 513bp), 3'UTR 的长度已被证明与物种对环境的适应和环境条件的改变有关(Li *et al*, 2008a)。

荧光定量 PCR 广泛应用于不同样本或不同处理样本的 mRNA 表达水平的比较研究。为校正不同样品的起始细胞数目、RNA 提取效率和基因的扩增效率等因素的差异, 通常需要同时对不同样品中的内参基因也进行定量 PCR 分析(马莉等, 2007; Neuvians *et al*, 2005)。一般是在各组织细胞中能稳定表达的持家基因才能被选作为内参的基因, β -actin、28S rRNA、18S rRNA、GAPDH、TBP 和 beta-2-microglobulin 是

常用的内参基因(Bustin, 2000)。其中, 18S rRNA 的功能是同整个基因谱有关的(负责装配), 表达相对稳定; 更重要的是, 它占总 RNA 的比例高达 80%, 影响 mRNA 表达的条件一般不导致其表达发生变化, 所以相对而言更准确(Blanquicett *et al*, 2002)。这也是本研究选择 18S rRNA 基因作为内参基因的原因所在。通过 Real-time PCR 的测定发现, 不同地区的仿刺参铁蛋白在肌肉带和呼吸树中均有分布, 北方和南方生长的仿刺参肌肉带中铁蛋白的表达都远远高于呼吸树中的表达。两个地区的不同组织间的表达量差异也是极显著的, 南方肌肉带中铁蛋白的表达量近乎北方的 2 倍, 而南方呼吸树中铁蛋白的表达量就略微低于北方呼吸树中的表达。从取样时间上看, 南北方当时温度大约都在 25℃左右, 南北方温度相差不大, 可以消除温度对铁蛋白表达调控的影响。造成上述表达差异的原因, 作者推测可能与东海和渤海湾本身水质的差异有关。两海域在诸如水质透明度、饵料和盐度等方面差异很大, 可能是导致表达量差异的主要原因。至于为什么在肌肉带中表达量有如此差异, 还需要进一步分析和确认。

Western blot 技术是分析生物体基因表达的常用研究方法。为了进一步确认仿刺参组织中是否存在本实验克隆的铁蛋白基因的编码蛋白, 作者利用体外重组技术获得了其重组蛋白, 制备了相应的多克隆抗体, 进行了 Western blot 检测。发现该抗体不仅特异性识别重组蛋白, 而且还特异性识别肌肉中的天然蛋白, 该抗体可为以后仿刺参铁蛋白功能的研究提供帮助。

参 考 文 献

- 马莉, 谢秀兰, 岳华, 2007. 鸡 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立. 中国畜牧兽医, 34(2): 73—75
- 牛禾, 陈炯, 史雨红等, 2010. 梅氏新贝尼登虫(*Neobenedenia melleni*)卵黄铁蛋白的 cDNA 克隆、原核表达及抗血清制备. 海洋与湖沼, 41(1): 121—125
- 杜莉莉, 李太武, 苏秀榕等, 2008. 可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)铁结合蛋白基因的研究. 海洋与湖沼, 39(3): 252—256
- 杨爱馥, 周遵春, 孙大鹏等, 2010. 仿刺参铁蛋白基因的序列分析及表达. 水产学报, 34(6): 890—897
- 贺静静, 李晔, 李太武等, 2009. 泥蚶(*Tegillarca granosa*) cDNA 文库的构建及铁结合蛋白基因(Ferritin)序列分析. 海洋与湖沼, 40(3): 289—295
- Blanquicett C, Johnson M R, Heslin M *et al*, 2002. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expres-

- sion studies. *Anal Biochem*, 303(2): 209—214
- Bustin S A, 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25: 169—193
- Chen T, Amons R, Clegg J S *et al*, 2003. Molecular characterization of artemin and ferritin from *Artemia franciscana*. *Eur J Biochem*, 270(1): 137—145
- Clemens L E, Basch P F, 1989. *Schistosoma mansoni*: effect of transferrin and growth factors on development of schistosomula *in vitro*. *J Parasitol*, 75(3): 417—421
- Huang T, Law J H, Söderhäll K, 1996. Purification and cDNA cloning of ferritin from the hepatopancreas of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur Biochem*, 236: 450—456
- Jin C, Li C, Su X *et al*, 2011. Identification and characterization of a *Tegillarca granosa* ferritin regulated by iron ion exposure and thermal stress. *Dev Comp Immunol*, 35: 745—751
- Li C, Ni D, Song L *et al*, 2008a. Molecular cloning and characterization of a catalase from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol*, 24 (1): 27—34
- Li M, Saren G W, Zheng S, 2008b. Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: Evidence for its dual role in immune response and iron metabolism. *Com Biochem Physiol B*, 150: 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 Expr Purif*, 56: 237—246
- Neuvians T P, Gashaw I, Sauer C G *et al*, 2005. Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis. *J Biotechnol*, 117(2): 163—171
- Qiu G, Zheng L, Liu P, 2008. Transcriptional regulation of ferritin mRNA levels by iron in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Com Biochem Physiol B*, 150: 320—325
- von Darl M, Harrison P M, Bottke W, 1994. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Biochem*, 222: 353—366
- Wang D, Kim B Y, Lee K S, 2009. Molecular characterization of iron binding proteins, transferrin and ferritin heavy chain subunit, from the bumblebee *Bombus ignites*. *Com Biochem Physiol B*, 152: 20—27
- Zhang Y, Meng Q, Jiang T *et al*, 2003. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Com Biochem Physiol B*, 135: 43—54

CLONING AND CHARACTERIZATION OF FERRITIN GENE FROM SOUTH CULTURED *STICHOPUS JAPONICUS*

LI Cheng-Hua¹, CUI Jing¹, LI Ye¹, ZHOU Jun¹, SU Xiu-Rong¹, LI Tai-Wu^{1,2}

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211;

2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract With the approaches of cDNA library, RACE, fluorescent real-time quantitative PCR and western blot, the full-length ferritin cDNA was identified and characterized in South cultured *Stichopus japonicus* (denoted as SjFER) in the present study. All these results indicated: 1) The cDNA of SjFER was of 1222bp, consisting of a 5'UTR of 513bp with a putative iron regulatory element (IRE), a 3'UTR of 187bp, and a complete open reading frame of 522bp encoding a polypeptide with 173 amino acid residues. The conserved motifs for ferritin including iron binding signature, H-specific ferroxidase center and phosphorylation site were totally found in the deduced amino acid of SjFER. 2) SjFER was an important molecule in the species environmental adaption. The expression level of SjFER in South sea cucumber was two times higher than that from North in the tissue of muscle, while no difference occurred in tissue of respiratory tree. 3) The polyclonal antibodies generated from the recombinant product of SjFER could be specifically identified not only the recombinant product, but also the native protein from muscles, and should be used for next functional validation.

Key words *Stichopus japonicus*, Ferritin, Fluorescent real-time quantitative PCR, Western blot