

大竹蛭(*Solen grandis*)铁蛋白基因的克隆及其在转录水平上对微生物多糖的应答*

杨顶珑^{1,2} 韦秀梅² 杨建敏² 杨嘉龙³ 徐洁^{1,2}
王圣^{1,2} 刘相全² 张艳敏⁴

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋水产研究所 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006; 3. 中国科学院烟台海岸带研究所 烟台 264003; 4. 山东商务职业学院 烟台 264670)

提要 本研究克隆获得了一个大竹蛭(*Solen grandis*)铁蛋白(SgFer)基因的cDNA全长,其序列全长为848bp,5'和3'端的非编码区分别为111bp和212bp,开放阅读框525bp,推测编码174个氨基酸,预测分子量为20.2kDa,理论等电点为5.20。通过荧光定量PCR法研究了SgFer在健康大竹蛭组织中以及大竹蛭受到微生物多糖刺激后的表达规律,结果表明,SgFer在血细胞、鳃、外套膜、肌肉、性腺和肝胰腺等组织器官中均有表达,在肝胰腺中的表达量最高。SgFer在大竹蛭受到肽聚糖(PGN)和葡聚糖(glucan)刺激后,其mRNA的表达量显著上调,分别在刺激后6h和12h达到最高;而脂多糖(LPS)刺激不能诱导其mRNA表达量上调。SgFer可能参与大竹蛭对微生物多糖的清除反应。

关键词 大竹蛭;铁蛋白;基因克隆;荧光定量PCR

中图分类号 S968.3

铁蛋白(Ferritin)是动植物体内广泛存在的铁储存蛋白,大部分由蛋白壳和铁核组成,蛋白壳一般包含24个亚基,每个亚基约含163个氨基酸残基,可以储存4500个铁原子(Recalcati *et al*, 2008)。近几年,在微生物、植物、无脊椎动物和脊椎动物中均发现了铁蛋白,根据是否含信号肽,已发现的铁蛋白可以分为两大类:一类胞内型铁蛋白,含铁反应元件(IRE),不含信号肽;一类分泌型铁蛋白,不含IRE,含信号肽(Orino *et al*, 2001; Petit *et al*, 2001; Jyoti *et al*, 2007)。铁蛋白是细胞生长和增殖、铁离子运输和代谢必不可少的重要因子,具有调节铁代谢平衡、抗氧化胁迫、消除部分重金属和有毒分子毒害的功能。铁蛋白因其具有多种重要的生物学功能,受到越来越多研究者的关注。目前,铁蛋白的研究在高等动物如人中已经取得了诸多进展(刘宝娟等, 2009),相比而言,其在

无脊椎动物中的研究才刚刚起步。

无脊椎动物缺乏真正的抗体和特异性的免疫细胞,机体防御反应依靠非特异的先天性免疫。在对节肢动物中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和印度明对虾(*Fenneropenaeus indicus*)的研究中发现,感染对虾白斑综合症病毒(WSSV)后,中国对虾和印度明对虾铁蛋白的表达量都有所增加(Mohankumar *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2006)。凡纳滨对虾(*Penaeus Vannamei*)的铁蛋白重组产物具有抗菌活性(吴文林等, 2011),中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的铁蛋白也具有一定的抗菌力(Kong *et al*, 2010)。以上结果暗示铁蛋白在无脊椎动物先天性免疫中发挥作用。在铁蛋白的诸多生物学功能中,消除有毒分子的毒害功能因其与免疫学密切相关,成为无脊椎动物铁蛋白研究的热点问题。对于软体动物铁蛋白的研究表明,双壳

* 山东省农业良种工程课题“优质高产抗逆贝类良种选育”, 2009—2013; 国家自然科学基金项目, 31202025号; 水生动物营养与饲料“泰山学者”岗位经费资助。杨顶珑, 硕士研究生, E-mail: yangdinglong12@163.com

通讯作者: 刘相全, E-mail: lxq6808@163.com

收稿日期: 2012-04-07, 收修改稿日期: 2012-06-29

贝类牡蛎(*Crassostrea gigas*)铁蛋白在受到微生物多糖刺激后会出现显著上调(Gueguen *et al*, 2003), 棘皮动物福氏海盘车(*Asterias forbesi*)变形细胞中铁蛋白的 mRNA 表达量在其受到脂多糖(LPS)刺激后增加(Beck *et al*, 2002), 结果暗示铁蛋白参与机体对于微生物多糖的清除。

本研究以大竹蛏(*Solen grandis*)为研究对象, 从前期构建的大竹蛏 cDNA 文库中克隆铁蛋白的 cDNA 全长, 运用生物信息学方法对其序列结构和系统进化进行分析, 以荧光定量 PCR 法检测其在大竹蛏各组织的表达分布, 以脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)和葡聚糖(glucan)等微生物多糖注射大竹蛏, 并以荧光定量 PCR 法检测其在微生物多糖刺激后各个时间的表达量变化, 旨在明确软体动物铁蛋白的消除有毒分子功能, 进一步研究大竹蛏先天性免疫, 为丰富和发展海洋无脊椎动物免疫学内容提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

海捕大竹蛏(*Solen grandis*)购自山东省烟台市, 个体平均大小 85mm, 于 20—22℃海水中暂养一周后进行实验。

1.2 SgFer cDNA 全长的克隆

本研究前期工作构建的大竹蛏 cDNA 文库, 其中包括 2038 条 EST 序列, 对 EST 序列进行 BLAST 分析, 获得铁蛋白的 EST 序列, 将该序列对应的质粒转化至 *Trans 5α*感受态细胞(全式金)中, 挑取单菌落, 使用 pBluescript II SK*载体的通用引物 M13F 和 M13R 对其进行重新测序, 拼接获得 SgFer 序列全长。

1.3 SgFer 序列分析

对 SgFer 序列分析如下: 用 BLAST 软件进行序列同源性比对和相似性搜索; 使用 SignalP 查找信号肽; 采用 Clustal W 程序(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)进行多序列比对; 使用 MEGA 4.1 软件, 以邻接法(Neighbor-joining)构建系统进化树, 设置 1000 次 bootstraps 进行评估。

1.4 荧光定量 PCR 检测 SgFer 在健康大竹蛏各组织中的转录

取暂养一周后的大竹蛏 5 只, 将其解剖, 取肌肉、外套膜、性腺、肝胰腺、血细胞和鳃, 用 Trizol (Invitrogen)试剂盒按照说明书提取各组织的 RNA, 样品经 DNA 酶(Promega)降解 DNA 后, 用 M-MLV 反转录酶(Promega)反转获得 cDNA 模板, 存入-80℃超

低温冰箱待用。

使用 Mastercycler ep realplex (Eppendorf)荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。反应体系 25μL, 含 cDNA 模板 100 倍稀释液 2.5μL, 12.5μL 2×SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 正反引物各 1μL 和 8μL 水。SgFer 的正反向引物分别为 SgFer-F: 5'-TTCA-GCCCATTCAGAAGCCA-3', SgFer-R: 5'-AGGTTGG-TGATGCGGTCGTT-3', 内参基因β-actin 的正反向引物为: β-actin AF: 5'-TGTACGCCAACACTGTCCTGTC-3', β-actin AR: 5'-CATCGTATTCCTGCTTGCTG-ATC-3'。反应程序为 95℃ 5min; 95℃ 5s, 60℃ 31s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析(Livak *et al*, 2001), 用 *t* 检验对结果进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

1.5 SgFer 在微生物多糖刺激后的实时转录

以 PBS 分别溶解脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)和葡聚糖(glucan), 使其浓度分别为 0.5、0.8 和 1.0mg/ml。取 200 只健康的大竹蛏随机分为五组, 每组 40 只, 在每只大竹蛏肌肉处注射 50μL, 第 1—3 组分别注射 LPS、PGN 和 glucan, 第 4 组注射 PBS 作为阴性对照, 第 5 组未作任何处理为空白对照(Yang *et al*, 2011)。分别于注射后 0、3、6、12、24、48h 从实验组和对照组中各随机取 5 只大竹蛏, 抽取血淋巴, 4℃ 800g 离心 5min, 收集血细胞, 以 1ml TRIzol 重悬, 提取总 RNA, 合成 cDNA, 用于荧光定量 PCR 分析(Yang *et al*, 2011)。实验数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析, 采用 *t* 检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 SgFer 的 cDNA 全长及氨基酸序列特征

SgFer 的 cDNA 全长为 848bp (GenBank 登录号: JX462607), 5'和 3'非编码区(UTR)分别为 111bp 和 212bp, 开放阅读框(ORF)525bp, 编码 174 个氨基酸。利用 SignalP 软件预测, 没有发现信号肽序列。5'UTR 核苷酸序列的 17—47 位置存在一个以 CAGTGA 为中心, 负责基因表达调控的铁反应元件(IRE)。3'UTR 区域包括一个腺苷酸 Poly(A)尾巴和一个规则的多腺苷酸化信号 AATAAA。ExPASy 预测的理论等电点 pI 为 5.20, 分子量大小为 20.2kDa; 其中在 N112 存在一个 N-糖基化位点“N-Q-S-L”, 在 E28、Y33、E62、E63、H66、E108 和 Q142 分别存在铁氧化酶活性位点(图 1)。

```

1  AATAGGAAATATTTTGTCTTCTGCTGCGTCAGTGAACGTACGGGCAAAATTTCCACCGCTTT
1  M S K
61  TTTCCACATTTTCAAGGAATTATTGTTGTAAGATCTAACAAAATAAATAATGAGCAAG
4  M T A T R P R Q N F H G E S E A A I N K
121  ATGACAGCCACAAGACCTCGCCAGAACTTCCATGGAGAGAGTGAAGCTGCAATCAACAAG
24  Q I N M E L Y A S M V Y Q S M A F F F D
181  CAGATAAACATGGAGCTGTAGCCAGCTACGCTACCAATCGATGGCGTCTCTTCGAC
44  R D D I A L K G F A K F F K E S S D E E
241  CGCGATGATATCGCCTTGAAAGGATTTGCCAAATCTTCAAGGAGTCGTCAGACGAGGAG
64  R E E A E K F M K Y Q N K R G G R I V L
301  CGAGAACACGCTGAAAGTTTCATGAAGTACCAGAACAAGAGAGGTGGACGAATCGTTCTT
84  Q P I Q K P E R D E W G T G M E A M Q A
361  CAGCCCTTCAAGCCAGAGCGCGATGAGTGGGGAACCGGTATGGAGGCCATGCAGGCT
104  A L A L E K S V N Q S L L D M H K V A S
421  GCCCTAGCCCTGGAGAAGAGTGTCAACCCAGTCTCTCTGACATGCACAAGGTTGCCCTCC
124  K H D D A Q M C D F L E S E Y L E E E V
481  AAACATGACGATGCACAGATGTGTGACTTCTTGAATCTGAGTACCTGGAAGAACAAGTG
144  E A I K D L N D R I T N L E R V G P G L
541  GAGGCCATCAAGACCTCAACGACCCGATCACCACCTGGAGCGGTGCGGACCTGGTCTT
164  G E W H Y D Q K L Q S *
601  GGAGAGTGGCACTACGACCAGAAGCTCCAGAGCTAGGCTGTTATTGACAGCTTACCACAG
661  CAGACCCAGTGTATATTGCACTGTGTAGACTTTCAGTTAGTAATACATCTAAAAAAC
721  TCTGTGAAATCCATCAGTTTTTAATTTTATTTTGTAGTATAATAGAATCTTATGTGA
781  TATGGCTTGGCACATGAAAAACCTAGAAAAAATAAAAAAAGAGCAAAAAA
841  AAAAAA

```

图 1 SgFer 的核苷酸及其编码氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of SgFer
 注: 波浪线表示铁结合区域特征序列; 虚线表示 N-糖基化位点; 实线表示规则的聚腺苷酸加尾信号; 双下划线表示 IRE 序列; 黑体加粗表示起始密码子与终止密码子。阴影表示铁蛋白结构域; 黑框表示 7 个与铁结合位点相关的氨基酸残基

2.2 SgFer 的多序列比对

同源性分析显示 SgFer 与双壳贝类中的菲律宾蛤仔、海湾扇贝和牡蛎的铁蛋白同源性最高, 相似度分别为 80%、73% 和 73%。多序列比对显示, 9 种铁蛋白中都有 5 个螺旋序列, 7 个与铁结合相关的氨基酸残基和一个亚铁氧化酶中心氨基酸残基在各个物种中高度保守(图 2)。

2.3 SgFer 的系统进化分析

以海湾扇贝、菲律宾蛤仔、牡蛎、刺参、果蝇、凡纳滨对虾、大菱鲆、罗非鱼、鼠、人的铁蛋白和 SgFer 等 14 种铁蛋白氨基酸序列, 用 MEGA 4.1 软件邻接法构建系统进化树, 结果表明: 14 种铁蛋白主要分成脊椎动物、无脊椎动物和其它无脊椎动物 3 个分

支; SgFer 先与文蛤、海湾扇贝等双壳贝类的铁蛋白聚群, 然后与棘皮动物海参的铁蛋白聚群后, 与节肢动物的铁蛋白一起聚群入无脊椎动物(图 3)。

2.4 SgFer 在健康大竹蛎组织中的转录

荧光定量 PCR 法检测了 SgFer 在健康大竹蛎组织中的表达规律, 结果表明: SgFer 在所有检测组织中都有表达, 在胰腺的表达量最高, 为肌肉中表达量的 1102.1 倍; 其次为鳃、性腺、外套膜、血细胞, 分别为肌肉中表达量的 31.3、12.2、9.8、9.2 倍; 在肌肉中的表达量最低(图 4)。

2.5 SgFer 在微生物多糖刺激后的转录

荧光定量 PCR 法检测 LPS、PGN 和 glucan 刺激后 SgFer 的表达规律, 结果表明: 在 PGN 刺激后, SgFer 的表达量在 6h 达到最高, 为空白对照的 2.80 倍($P < 0.01$); 在 12h 略降低后, 24h 升高为空白对照的 1.57 倍; 随后在 48h 下降为空白对照的 0.40 倍($P < 0.05$)。SgFer 的表达量在 glucan 刺激后 12h 达到最高($P < 0.01$), 为空白对照的 4.80 倍, 随后降低, 并在 48h 达到空白对照的 0.63 倍。在 LPS 刺激后, SgFer 的表达量没有显著升高(图 5)。

3 讨论

脊椎动物铁蛋白的蛋白壳通常含有 Heavy(H)链和 Light(L)链两种亚基。H 亚基是控制铁氧化酶中心, 主要负责铁的氧化。L 亚基没有铁氧化酶活力, 在储存铁和调节铁分布中发挥作用。L 亚基仅在脊椎动物中发现, 而 H 亚基在脊椎、无脊椎动物、植物和细菌中都有发现(Theil, 2003; Kim *et al.*, 2004), 不同物种的 H 亚基都具有保守的 7 个氨基酸残基。本研究获得的 SgFer 和其它海洋贝类的铁蛋白类似, 都具有与金属结合位点相关的 7 个保守的氨基酸残基(Zhang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011), 它们是亚铁氧化酶中心的铁离子结合位点, 可将二价亚铁离子转化为三价铁离子。SgFer 中存在的 7 个保守氨基酸序列: Glu28、Tyr33、Glu62、Glu63、His66、Glu108 和 Gln142, 其中 Glu63 和 His66 参与了多晶核 Fe 复合物的形成, Tyr35 与另外两个酪氨酸 Tyr30、Tyr33 形成了亚铁氧化酶中心, 该亚铁氧化酶中心可能是发挥存储功能的关键结构(Beck *et al.*, 2002)。铁蛋白的 3'端和 5'端均可体外结合铁离子, 但 5'端与铁离子的结合更稳定(Zak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007)。SgFer 的 cDNA 序列在 5'端含有一个特殊的铁反应元件(IRE), 与铁调节蛋白(IRP)有很高的亲和力。当细胞内铁离子浓

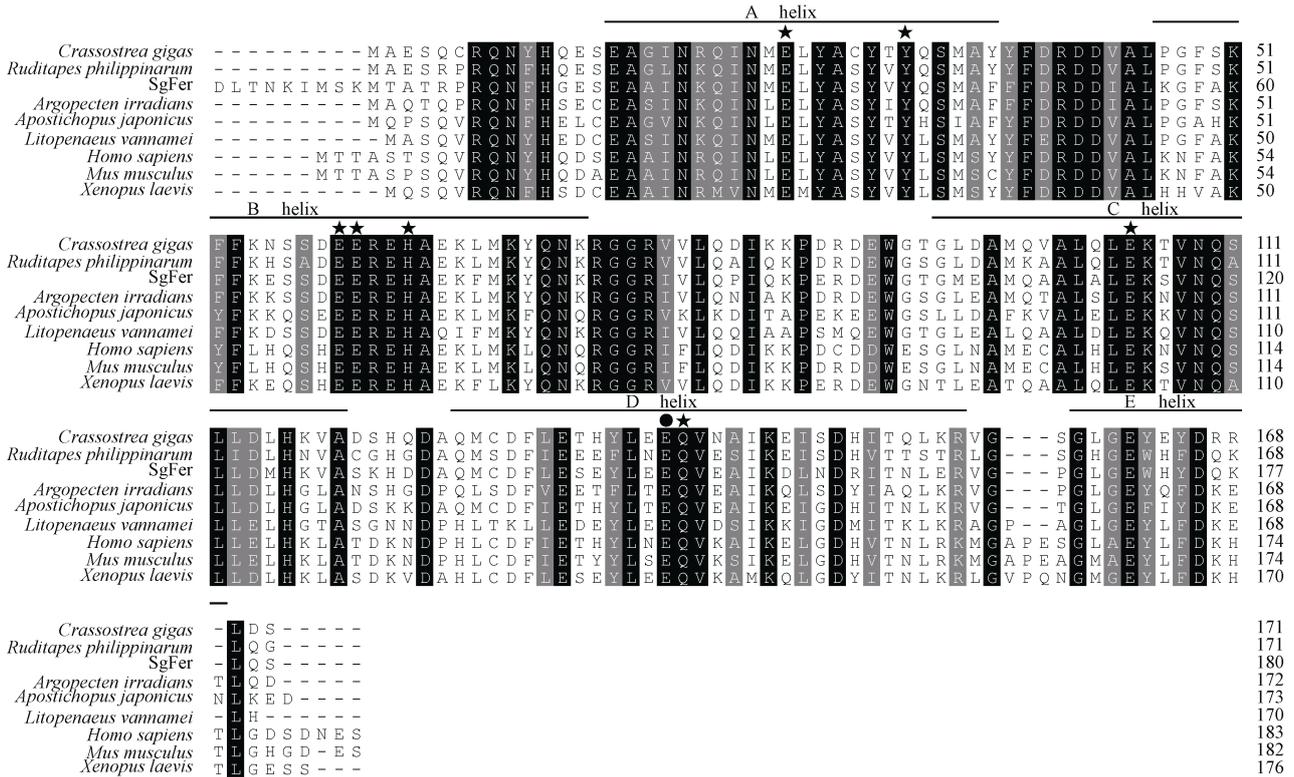


图2 SgFer 与其它物种铁蛋白氨基酸序列的多序列比对结果

Fig.2 Alignment of the amino acids sequence of SgFer with ferritins from other species

注: SgFer 与其它动物的铁蛋白多序列比对结果, 其它物种包括: 长牡蛎(CAD91440), 海湾扇贝(AEN83774), 凡纳滨对虾(AAX55641), 菲律宾蛤仔(ADX31290), 仿刺参(AFG26289), 非洲爪蛙(AAB20316), 鼠(NP_034369), 人(AAA35832)。A—E: 5个 α 螺旋序列; 星号: 7个与铁结合位点相关的氨基酸残基; 圆点: 亚铁氧化酶中心氨基酸残基

度较低时, IRP/IRE 阻止核糖体组装, 从而抑制了铁蛋白的翻译; 当铁离子浓度升高时, IRP/IRE 减少, 从而增加铁蛋白的翻译来储存过量的铁(Proudhon *et al*, 1996)。

大部分铁蛋白由蛋白壳和铁核组成, 由于蛋白质壳具有亲水性, 故铁蛋白可溶于水并可溶于胞浆或血浆中, 在细胞内、外液中均较稳定。这种存在于细胞质中的铁蛋白为胞内型铁蛋白, 在脊椎动物的线粒体和细胞核中均有发现; 研究发现还存在一种分泌型铁蛋白, 主要存在于昆虫和蜗牛等动物中(Linder *et al*, 1992; Huang *et al*, 1996)。本研究克隆得到的 SgFer 氨

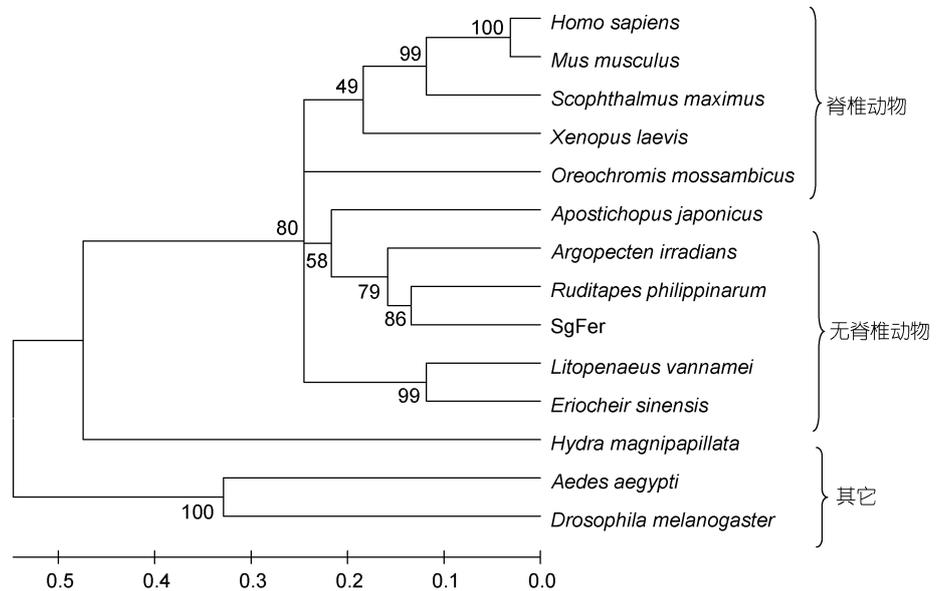


图3 SgFer 与其它物种铁蛋白的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on sequences of SgFer with ferritins from other species
 注: 使用 MEGA 4.1 软件的邻接法构建系统进化树, 所用铁蛋白基因的 GenBank 登录号如下: 人(AAA35832), 鼠(NP_034369), 大菱鲆(ADI24353), 非洲爪蛙(AAB20316), 非鲫(AAX61132), 仿刺参(AFG26289), 海湾扇贝(AEN83774), 文蛤(AAZ20754), 凡纳滨对虾(AAX55641), 中华绒螯蟹(ADD17345), 大乳头水媳(XP002155909), 埃及伊蚊(EAT40926), 果蝇(AFH06683)

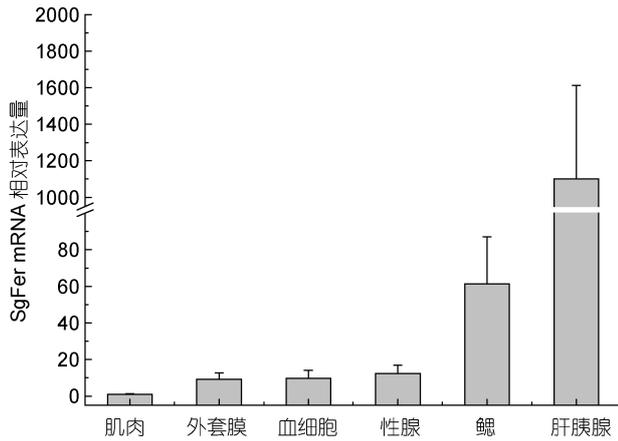


图4 SgFer mRNA 在不同组织中的表达水平

Fig.4 SgFer mRNA expression level in different tissues

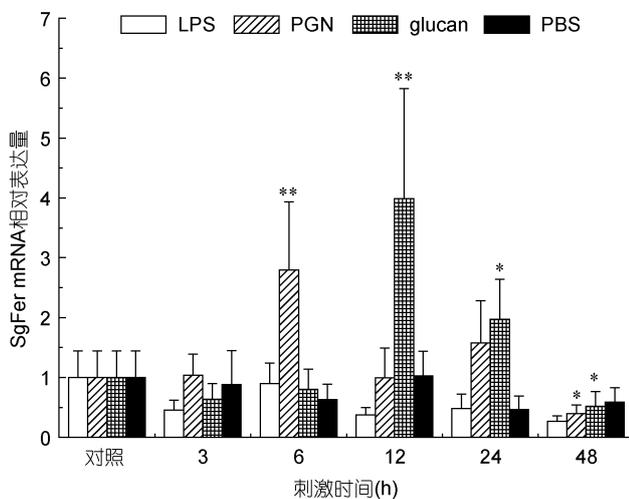


图5 SgFer mRNA 在微生物多糖刺激后的表达水平

Fig.5 SgFer mRNA expression level after microorganism glycan stimulation

氨基酸序列没有信号肽,为胞内型铁蛋白。SgFer 在肝胰腺、肌肉、鳃、性腺、外套膜以及血细胞中均有表达,这一点与凡纳滨对虾、珠母贝、淡水小龙虾、草鱼和中华绒螯蟹等物种中报道相一致(王娜等, 2010; 郭慧芝等, 2010; Huang *et al*, 1996; Zhang *et al*, 2003; Hsieh *et al*, 2006)。铁蛋白在组织中的广泛分布,与其在机体的铁离子储备、运输和代谢过程,消除部分重金属的毒害,抗氧化胁迫等多种生命活动密切相关(Zhang *et al*, 2003)。SgFer 在肝胰腺中的含量最高,这与肝胰腺是大多物种的具有解毒功能的重要组织器官有关,暗示铁蛋白可能与解毒功能密切相关(刘宝娟等, 2009; 郭慧芝等, 2010)。

脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)和葡聚糖(glucan)等微生物多糖是病原微生物表面某些共有的高度保守

的分子结构。这些多糖是病原微生物所特有的,而宿主细胞不能产生,是病原微生物生存或致病性所必需的。SgFer 在大竹蛭受到 PGN 和 glucan 刺激后,分别于 6h、12h 出现显著上调,这与牡蛎铁蛋白受到微生物多糖刺激后会出现显著上调的结果相一致(Gueguen *et al*, 2003)。SgFer 可能在大竹蛭清除 PGN 和 glucan 的过程中发挥作用。另一方面,微生物多糖 PGN 和 glucan 对于大竹蛭而言是有毒小分子,机体在清除过程中产生氧化作用, SgFer 表达量的上调也可能用来抵御氧化作用对机体的损伤。SgFer 在大竹蛭受到 PGN 和 glucan 刺激后达到最高表达量的时间点不同,暗示其对于不同微生物多糖的响应时间不同,其清除作用机制也可能不一样。但是, LPS 刺激并没有增加 SgFer 的表达,与棘皮动物铁蛋白受到 LPS 刺激后增加的结果不一致,其原因可能是物种不同造成的。但 SgFer 在对不同微生物多糖响应过程中发挥功能及其具体的作用机制有待于进一步研究,本研究为下一步体外重组大竹蛭铁蛋白,利用重组蛋白分析其对于有毒小分子和抗氧化胁迫作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- 王 娜, 陈 琼, 胡成钰, 2010. 草鱼转铁蛋白基因的克隆及其组织表达. 水生生物学报, 34(1): 51—56
- 刘宝娟, 张文兵, 2009. 铁蛋白的结构、功能及表达调控. 饲料工业, 30(4): 42—47
- 吴文林, 傅玲玲, 陈宇等, 2011. 凡纳滨对虾铁蛋白基因的克隆与表达. 泉州师范学院学报, 29(6): 7—10
- 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): 905—912
- Beck G, Ellis T W, Habicht G S *et al*, 2002. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Developmental and Comparative Immunology*, 26(1): 11—26
- Gueguen Y, Cadoret J P, Flament D *et al*, 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303: 139—145
- Huang T S, Law J H, Soderhall K, 1996. Purification and cDNA cloning of ferritin from the hepatopancreas of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *European Journal of Biochemistry*, 236(2): 450—456
- Jyoti V, Margaret C, Anthony R *et al*, 2007. The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica*. Typhi-murium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Molecular Microbiology*, 63(5): 1495—1507

- Kim S R, Lee K S, Yoon H J *et al*, 2004. Molecular cloning, expression and characterization of cDNAs encoding the ferritin subunits from the beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 138: 423—433
- Kong P F, Wang L L, Zhang H *et al*, 2010. Two novel secreted ferritins involved in immune defense of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2: 1—9
- Linder M C, Madani N, Middleton R *et al*, 1992. Ferritin synthesis on polyribosomes attached to the endoplasmic reticulum. *Inorg Biochem*, 47(3—4): 229—240
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25: 402—408
- Mohankumar K, Ramasamy P, 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Research*, 15(1): 69—75
- Orino K, Lehman L, Tsuji Y *et al*, 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochemical Engineering Journal*, 35(1): 241—247
- Petit J M, Briat J F, Lobréaux S, 2001. Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochemical Engineering Journal*, 35(3): 575—582
- Proudhon D, Wei J, Briat J F *et al*, 1996. Ferritin gene organization: different between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints. *Journal of Molecular Evolution*, 42(3): 325—336
- Recalcati S, Invernizzi P, Arosio P *et al*, 2008. New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 30: 84—89
- Theil E C, 2003. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *Journal of Nutrition*, 133: 1549S—1553S
- Yang J, Wang L, Zhang H *et al*, 2011. C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization. *PLoS One*, 6:e17089
- Zak O, Aisen P, 2003. Iron release from transferrin, its C-Lobe, and their complexes with transferrin receptor: presence of N-Lobe accelerates release from C-Lobe at endosomal pH. *Biochemistry*, 42(42): 12330—12334
- Zhang J Q, Li F H, Wang Z Z *et al*, 2006. Cloning, expression and identification of ferritin from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Biotechnology*, 125: 173—184
- Zhang X J, Qu G, Zhu W L *et al*, 2007. Construction of intestinal cDNA library and analysis of some expressed sequence tags sequencing of *Ctenopharyngodon idellus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 31(2): 251—258
- Zhang Y, Meng Q X, Jiang T M *et al*, 2003. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(3): 43—54

CLONING OF A FERRITIN GENE FROM *SOLENI GRANDIS* AND ITS RESPONSE TO MICROORGANISM GLYCAN ON TRANSCRIPTION LEVEL

YANG Ding-Long^{1,2}, WEI Xiu-Mei², YANG Jian-Min², YANG Jia-Long³,
XU Jie^{1,2}, WANG Sheng^{1,2}, LIU Xiang-Quan², ZHANG Yan-Min⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Fishers Research Institute, Yantai, 264006; 3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, 264003; 4. Shandong Business Institute, Yantai, 264670)

Abstract In this study, the full length cDNA of a ferritin gene from *Solen grandis* (designed as SgFer) was cloned, and it was 848bp and consisted of a 5' untranslated region (UTR) of 111bp, a 3' UTR of 212bp and an open reading frame (ORF) of 525bp encoding a polypeptide of 174 amino acids with an estimated molecular mass of 20.2kDa and isoelectric point of 5.20. The tissue and temporal expression of SgFer after microorganism glycan challenge was recorded by real-time PCR. SgFer transcript could be detected in all examined tissues with the highest expression level in hepatopancreas. The mRNA expression of SgFer was up-regulated after PGN or glucan stimulation, and reached peak at 6h and 12h post-challenge, respectively. No significant changes were observed after LPS stimulation. SgFer might be involved in elimination of microorganism glycan.

Key words *Solen grandis*; Ferritin; Gene cloning; Real-time PCR