

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)铁蛋白的 分子鉴定、表达及功能研究*

陈梦丹 朱 凯 徐铸婕 李长红 苗 亮 陈 炯

(宁波大学海洋学院 生物化学与分子生物学实验室 宁波 315211)

摘要 铁蛋白(Ferritin, Fer)是一类广泛存在于生物体内、并与铁代谢密切相关的铁储存蛋白。本研究通过香鱼(*Plecoglossus altivelis*)单核/巨噬细胞转录组测序获得铁蛋白亚基因(PaFer) cDNA 全序列,结果显示, PaFer 由 943 个核苷酸组成,开放阅读框为 531bp,编码 176 个氨基酸,预测相对分子质量为 20.4kDa,等电点为 5.46。氨基酸序列多重比对结果显示, PaFer 具有保守的铁蛋白样双铁结构域,与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和大西洋鲑(*Salmo salar*) Fer M 亚基(Fer-M)同源性最高,均为 92%;系统进化树分析表明, PaFer 与胡瓜鱼、大西洋鲑和虹鳟的 Fer-M 聚为一个小簇,与虹鳟 Fer-M 进化相关性最高。实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)结果表明, PaFer mRNA 主要在香鱼脾脏中表达量最高,肾脏、鳃、脑和心脏中次之;鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后,香鱼肝脏、脾脏和肾脏等组织中 PaFer mRNA 表达显著上调。原核表达了 PaFer 重组蛋白(rPaFer), rPaFer 以包涵体形式表达,镍柱亲和层析纯化重组蛋白,尿素梯度透析法复性 rPaFer。铁螯合实验结果显示,当 rPaFer 浓度为 4 μ g/mL 时,螯合铁的能力最大,为 43.96%。抑菌实验结果表明, rPaFer 对鳃弧菌、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)的最小抑菌浓度分别为 1.5625、25.0 和 100.0 μ g/mL。综上, PaFer 与香鱼抗病原感染的免疫反应紧密相关,可能通过调控铁代谢参与鱼类抵抗微生物的宿主自身免疫过程。本研究为进一步研究鱼类 Fer 的功能及在病原菌感染免疫中的分子机制奠定基础。

关键词 铁蛋白; 香鱼; 表达; 铁结合能力; 抑菌作用

中图分类号 Q786; S917 **doi:** 10.11693/hyhz20161000232

铁蛋白(Ferritin, Fer)是广泛存在于生物体内的一种铁储存蛋白,在维持机体铁平衡中发挥着重要作用。Fer 的结构高度保守,由 24 个亚基围绕形成的巨大复合体,中间含有一个中空球体,内部可储存 4500 个铁原子(Harrison *et al*, 1996; Orino *et al*, 2008)。铁蛋白中的铁以三价铁离子氧化物的形式存在,不仅能储存机体内过剩的铁,为含铁元素蛋白质的合成提供铁原子,还能防止铁氧化过程中所产生的自由基带来的伤害(Harrison *et al*, 1996; Orino *et al*, 2008)。哺乳动物 Fer 通常由轻链(light chain, L)和重链(heavy

chain, H)两种铁蛋白亚基组成,其中 H 亚基通过将二价铁氧化为三价铁实现快速解毒(Clegg *et al*, 1981),L 亚基在铁的矿化、铁核晶体形成和长期储存中发挥重要作用(Levi *et al*, 1994)。在鱼类和两栖类动物等低等脊椎动物中,通常还具有中型链(middle chain, M)(Dickey *et al*, 1987; Andersen *et al*, 1995; Zhang *et al*, 2010; Elvitigala *et al*, 2013; Oh *et al*, 2016)。由于具有 FTH 亚基的铁氧化酶中心和 FTL 亚基铁成核位点, M 亚基兼具 H 和 L 亚基的功能(Torti *et al*, 2002)。除具有铁离子储存和抗氧化损伤功能, Fer 在机体免疫反

* 国家自然科学基金项目,31372555 号,31402333 号;浙江省自然科学基金项目,LZ13C190001 号,LY17C190003 号;宁波大学学科项目, XK115D238 号。陈梦丹, E-mail: mdchen1993@163.com

通讯作者: 李长红, 博士, 硕士生导师, E-mail: lichanghong0716@163.com

收稿日期: 2016-10-29, 收修改稿日期: 2016-11-12

应中也起着重要作用。

目前, Fer 基因已在包括斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) (Liu *et al*, 2010)、美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*) (Hu *et al*, 2010)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) (Zhang *et al*, 2010)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (Wang *et al*, 2011)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*) (Elvitigala *et al*, 2013)、眼斑雪冰鱼(*Chionodraco rastrispinosus*) (Scudiero *et al*, 2013)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Lee *et al*, 2014)和海马(*Hippocampus abdominalis*) (Oh *et al*, 2016)等在内数种鱼类中得到克隆。研究发现, 在各种病原刺激下, 鱼类 Fer 基因均会表达上调。例如, 欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)感染美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* spp. Piscicida)后, Fer 基因在肝和脑中的表达量显著增加(Neves *et al*, 2009); 斑点叉尾鲷腹腔注射右旋糖酐铁或同时注射右旋糖酐铁和叉尾鲷爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)后, 肝组织中 Fer-H 表达量显著上调(Liu *et al*, 2010); 在条石鲷中, 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)和条石鲷虹彩病毒(rock bream iridovirus, RBIV)处理均能诱导肝组织中 Fer-M 表达量显著上调(Elvitigala *et al*, 2013)。综上, Fer 与鱼类病原感染引起的免疫应答反应紧密相关, 但具体作用机制未知。

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)是日本、中国和朝鲜等东亚地区国家特有的一种小型名贵经济鱼类。近年来, 由于长期集约化养殖、种质退化和环境污染等诸多原因, 细菌性病害频繁发生, 对香鱼养殖业造成极大的经济损失(李长红等, 2009)。人工养殖香鱼要求无污染和绿色健康, 抗生素和农药的使用受到诸多限制。因此, 迫切需要深入研究香鱼的免疫机制, 为指导病害防治和抗病遗传育种奠定理论基础。鉴于 Ferritin 在动物抗菌免疫反应中的重要作用, 我们拟对香鱼 Fer(PaFer)进行研究, 测定其基因 cDNA 序列, 分析其结构特征、系统进化关系及其 mRNA 在组织中的表达特征, 并研究鳃弧菌感染后香鱼重要组织中 PaFer mRNA 的表达变化; 原核表达 PaFer 重组蛋白并纯化复性, 分析其铁结合和抑菌活性, 为进一步深入研究鱼类 Ferritin 在鱼类的铁代谢及免疫机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

本实验所用的健康香鱼(20—25g)购自宁波水产

大世界, 规格均一、健康无伤。创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)香鱼分离株 ayu-H080701、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 plys E 和 TG1 菌株、载体 pET-28a 等由本实验室保存。RNAiso 试剂、AMV 逆转录酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T Simple Vector、Ex Taq DNA 聚合酶、Ni-NTA Sefinose™ 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒均购于 TaKaRa 公司(日本); 菲洛嗪试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Gel Extraction Kit 购于 Omega 公司(美国); 引物合成及序列测定由英捷捷基贸易有限公司(上海)完成。

1.2 组织样品制备

香鱼暂养 7d 后, 随机选取 5 尾, 分别采集肝、心、肾、脑、脾、肠、鳃和肌肉等组织, 立即放入液氮中, 随后保存于实验室-70℃超低温冰箱, 用于分析 PaFer 基因 mRNA 的组织表达特征。剩余香鱼随机分成感染组和对照组, 各 30 尾。感染组以 1.0×10^4 CFU/尾的感染浓度腹腔注射鳃弧菌悬液(李长红等, 2009), 对照组注射等体积无菌生理盐水。感染组和对照组香鱼于注射后 4、8、12 和 24h 采集血液和组织样品, 每组每次取 4 尾香鱼。组织采集方法同上。

1.3 PaFer 基因 cDNA 序列获得及分析

采用 Illumina HisSeq 2000 测序平台对香鱼头肾来源的单核/巨噬细胞进行转录组测序, 从测序结果中获得 PaFer 基因 cDNA 序列, 并通过特异引物 PCR 扩增和和序列测定的方法进行验证。同源蛋白序列比对采用 BLASTP 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>); 多重序列比对采用 ClustalW 软件(<http://clustalw.dbj.nig.ac.jp/>); 系统进化树构建采用 MEGA 5.0 软件(Tamura *et al*, 2011); 蛋白分子量大小及等电点预测采用 Compute pI/Mw 程序 (http://web.expasy.org/compute_pi/); 信号肽序列预测采用 SignalP 4.1 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); N 糖基化位点预测采用 NetCGlyc 1.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCGlyc/>); 保守结构域预测采用 PROSITE 软件(<http://kr.expasy.org/prosite/>); 二级结构预测参考 Rost(1996)的方法。

氨基酸序列多重比对及进化树构建所用序列详见表 1。

1.4 不同组织中 PaFer mRNA 的表达

采用 qPCR 分析健康香鱼不同组织中 PaFer mRNA 的表达, 以及鳃弧菌感染后不同时间段 PaFer

表 1 多重比对及系统发育进化树构建采用序列
Tab.1 The sequences used for multiple alignment and phylogenetic tree construction

| 登录号 | 物种 | | |
|--------------|--------------------------------------|-------|--------------------------|
| | 拉丁名 | 中文名 | 英文名 |
| AF088851 | <i>Homo sapiens</i> -H | 人 | Human |
| M10119 | <i>Homo sapiens</i> -L | 人 | Human |
| X52561 | <i>Mus musculus</i> -H | 小鼠 | Mouse |
| NM_010240 | <i>Mus musculus</i> -L | 小鼠 | Mouse |
| M55010 | <i>Xenopus laevis</i> -H | 非洲爪蟾 | African clawed frog |
| AF538971 | <i>Xenopus laevis</i> -L | 非洲爪蟾 | African clawed frog |
| KR063285 | <i>Andrias davidianus</i> -H | 中国大鲵 | Chinese giant salamander |
| KR063286 | <i>Andrias davidianus</i> -M | 中国大鲵 | Chinese giant salamander |
| KR063287 | <i>Andrias davidianus</i> -L | 中国大鲵 | Chinese giant salamander |
| KP780174 | <i>Hippocampus abdominalis</i> -H | 海马 | Sea Hosre |
| KP780175 | <i>Hippocampus abdominalis</i> -M | 海马 | Sea Hosre |
| KP780176 | <i>Hippocampus abdominalis</i> -L | 海马 | Sea Hosre |
| XM_003445695 | <i>Oreochromis niloticus</i> -H | 罗非鱼 | Nile tilapia |
| XM_003446409 | <i>Oreochromis niloticus</i> -M | 罗非鱼 | Nile tilapia |
| XM_005448328 | <i>Oreochromis niloticus</i> -L | 罗非鱼 | Nile tilapia |
| HF559476 | <i>Chionodraco rastrospinosus</i> -M | 眼斑雪冰鱼 | Antarctic fish |
| AM419433 | <i>Chionodraco rastrospinosus</i> -H | 眼斑雪冰鱼 | Antarctic fish |
| XM_017033033 | <i>Cynoglossus semilaevis</i> -H | 半滑舌鲷 | Half-smooth tongue sole |
| HQ913639 | <i>Cynoglossus semilaevis</i> -M | 半滑舌鲷 | Half-smooth tongue sole |
| XM_017034102 | <i>Cynoglossus semilaevis</i> -L | 半滑舌鲷 | Half-smooth tongue sole |
| BT075487 | <i>Osmerus mordax</i> -H | 胡瓜鱼 | Rainbow smelt |
| BT075309 | <i>Osmerus mordax</i> -M | 胡瓜鱼 | Rainbow smelt |
| NM_001200338 | <i>Ictalurus punctatus</i> -H | 斑点叉尾鲷 | Channel catfish |
| NM_001200339 | <i>Ictalurus punctatus</i> -M | 斑点叉尾鲷 | Channel catfish |
| FJ788423 | <i>Larimichthys crocea</i> -H | 大黄鱼 | Large yellow croaker |
| NM_001303319 | <i>Larimichthys crocea</i> -M | 大黄鱼 | Large yellow croaker |
| XM_010745477 | <i>Larimichthys crocea</i> -L | 大黄鱼 | Large yellow croaker |
| GU187329 | <i>Sciaenops ocellatus</i> -M | 美国红鱼 | Red drum |
| FR714867 | <i>Plecoglossus altivelis</i> | 香鱼 | Ayu |
| AB618039 | <i>Oplegnathus fasciatus</i> -H | 条石鲷 | Rock bream |
| AB618038 | <i>Oplegnathus fasciatus</i> -M | 条石鲷 | Rock bream |
| GU182880 | <i>Scophthalmus maximus</i> -H | 大菱鲆 | Turbot |
| GU590873 | <i>Scophthalmus maximus</i> -M | 大菱鲆 | Turbot |
| NM_001124547 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> -H1 | 虹鳟 | Rainbow trout |
| BT073755 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> -M | 虹鳟 | Rainbow trout |
| NM_001123657 | <i>Salmo salar</i> -H | 大西洋鲑 | Atlantic salmon |
| BT049618 | <i>Salmo salar</i> -M | 大西洋鲑 | Atlantic salmon |

注: H、L 和 M 分别表示 Ferritin 的 3 个亚基

mRNA 在各组织中转录水平变化。参照 Li 等(2015)的方法进行总 RNA 的抽提、DNase I 处理、第一链 cDNA 合成及 qPCR 检测。

根据获得 PaFer cDNA 序列设计引物, 引物序列

如下:

PaFer(+): 5'-GCTGGAGAAGAACGTCACC-3';
PaFer(-): 5'-GCGTCCATCTTGGTGAGATT-3'。

预期扩增片段为 165bp。

以香鱼 β -actin 基因(登录号: AB020884)作为内参, 扩增引物序列如下:

pActin2(+): 5'-TCGTGCGTGACATCAAGGAG-3';
pActin2(-): 5'-CGCACTTCATGATGCTGTTG-3'.
预期扩增片段为 231bp (Li *et al*, 2014)。

qPCR 扩增体系(25 μ L): SYBR *Premix Ex Taq* (2 \times) 缓冲液 12.5 μ L、cDNA 模板 0.5 μ L、引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, 超纯水补足至 25 μ L。扩增反应在 ABI Step One 荧光定量 PCR 仪(美国)上进行, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3min (预变性, 1 个循环); 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s (扩增段, 40 个循环); 94 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 95 $^{\circ}$ C 30s (融解阶段, 1 个循环)。qPCR 监测时每个样品重复 3 次, 包括目的基因 (PaFer) 和内参基因 (β -actin)。根据相对标准曲线法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 PaFer mRNA 的相对表达量(Livak *et al*, 2001)。

1.5 原核表达和蛋白纯化

根据 PaFer 的 ORF 设计原核表达引物, 引物序列如下:

pET-28a-PaFer(+): 5'-GGAATTCATGGAGTCTCAGATCCGCC-3';
pET-28a-PaFer(-): 5'-CAAGCTTTTAGCTCTGGCTCCCCAAG-3'。

下划线碱基为限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 的识别序列, 斜体字母为保护碱基。PCR 扩增体系(25 μ L): 10 \times LA buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 3.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, LA *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L, ddH₂O 15.75 μ L。扩增反应在 Mastercycler pro 梯度 PCR 仪(德国 eppendorf 公司)上进行, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 共 30 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增产物经电泳分离、切胶纯化后, 用 *EcoR* 和 *Hind* 双酶切后, 与同样酶切的原核表达载体 pET-28a 相连接, 获得重组质粒 pET28a-PaFer。pET28a-PaFer 转化大肠杆菌 BL21 pLys E 菌株, IPTG 诱导表达, 细菌总蛋白经 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝 G-250 染色检测 PaFer 重组蛋白(rPaFer)表达情况。

转化菌经 IPTG 大量诱导后, 收集大肠杆菌, 于 4 $^{\circ}$ C 8000g 离心 10min, 弃上清, 加入 PBS 重悬浮细菌沉淀, 超声波破碎 3 次, 4 $^{\circ}$ C 8000g 离心 10min, 获得包涵体沉淀, PBS 洗涤 5 次后, 将用结合缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl, 8mol/L 尿素, 500mmol/L NaCl, 5mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗涤, 然后 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 30min, 收集上清用于活化复性。按照 Ni-NTA

SefinoseTM 试剂盒说明书, 取洗涤后蛋白溶液, 上样至预平衡的 Ni²⁺柱中, 依次用洗涤缓冲液 1 和洗涤缓冲液 2 洗脱去除杂蛋白, 最后洗涤缓冲液洗脱目的蛋白。收集每一步的洗脱液, 经 SDS-PAGE 检测样品的蛋白质纯度。

1.6 铁离子螯合能力测定

采用 Bradford 法(Bradford, 1976)测定纯化复性的 rPaFer 浓度, 以牛血清蛋白为标准样。冷冻干燥后保存, 用于后续结合铁和抑菌实验。rPaFer 螯合铁离子的能力测定参照 De Zoysa 等(2007)提出的方法并略作改进。具体步骤如下: 分别将 1mL 不同浓度 rPaFer 水溶液 (0, 2, 4, 6, 8 和 10 μ g/mL)加至 20 μ L FeCl₂ (2mmol/L)中, 然后加入 40 μ L 菲洛嗪试剂 (5mmol/L), 混匀, 室温振荡孵育 10min。采用分光光度计(Ultrospec 1100 Pro UV/Visible spectrophotometer)于波长 562nm 测定溶液的吸光值。每个样品平行测定 3 次。根据下面公式计算 rPaFer 的铁离子螯合能力:

$$\text{铁离子螯合能力(\%)} = [C - (S - B)] / C \times 100$$

其中, S 表示 rPaFer 样品水溶液反应后的吸光值, C 表示水替代反应体系中样品溶液后的吸光值, B 表示水代替反应中的 FeCl₂ 溶液后的吸光值。

1.7 抗菌活性分析

参照 Chang 等(2006)的方法, 采用二倍稀释法将 rPaFer 原液稀释至 100、50、25、12.5、6.25、3.125 和 1.5625 μ g/mL 共 7 个浓度。将创伤弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌和溶藻弧菌活化后, 30 $^{\circ}$ C 培养 18h 后用无菌生理盐水稀释至 1.0×10^5 CFU/mL 菌悬液备用。将稀释后的菌悬液接种至 96 孔 U 型微量滴定板内 (20 μ L/孔), 然后加入不同浓度的 PaFer 蛋白到各孔内 (80 μ L/孔), 混匀后置 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 24h。以不接菌的为空白对照组, 采用 Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(Thermo Fisher)测定 OD₆₀₀ 值。以细菌没有生长的最小药物浓度作为 rPaFer 抑制 4 种弧菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 重复 3 次。

1.8 统计分析

实验结果表示为平均值 \pm 标准误(mean \pm S.D.), 采用 SPSS 13.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 PaFer cDNA 序列分析

PaFer cDNA 序列包含 943bp 核苷酸(GenBank 登

录号: FR714867), 包含一个完整的、长度为 531bp 的 ORF, 预测编码一个由 176 个氨基酸组成、相对分子质量约为 20.4kDa 的多肽, 预测理论等电点为 5.46, N 末端不存在信号肽序列。

通过 PROSITE 工具对 PaFer 氨基酸序列的保守结构域预测, 结果表明, PaFer 在氨基酸 7—156 位存在保守的铁蛋白样双铁结构域(ferritin-like di-iron domain), 并且仅存在 1 个铁离子结合区域信号(iron-binding region signature, IBRS2) (123 -DPHLCD FLETHYLNEQVEAIK $^{-143}$) (图 1)。通过 NCBI 的 CDD 工具预测表明, 铁氧化酶双铁中心铁结合位点具有 7 个高度保守的氨基酸残基(24E, 31Y, 58E, 59E, 62H, 104E 和 138Q) (图 1), 这 7 个残基在 H 和 M 亚基中作为铁离子配体发挥作用(Lawson *et al.*, 1989; Arosio *et al.*, 2009)。哺乳动物 L 亚基成核位置中 3 个带负电荷氨基酸残基(E54, E57 和 E61) (Santambrogio *et al.*, 1996)也存在于 PaFer, 但 E57 被 D57 取代(图 1)。二级结构预测表明, PaFer 存在 4 个 α 螺旋, 分别为 4—38、45—72、93—120 和 124—154(图 1), 这个 4 螺旋束与哺乳动物 Fer 的相似(Harrison *et al.*, 1996)。

2.2 PaFer 的系统进化分析

氨基酸序列多重比对表明, PaFer 与中国大鲵(*Andrias davidianus*)及其他鱼类 Fer-M 同源性为 68.5%—92.0%, 其中与胡瓜鱼(*Osmerus mordax*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和大西洋鲑 Fer-M 的同源性分别为 91.9%、92.0%和 92.0%。系统进化树分析表明, 各物种 Fer-M、Fer-H 和 Fer-L 分别成簇, PaFer 与胡瓜鱼、大西洋鲑和虹鳟的 Fer-M 聚为一个小簇, 与虹鳟 Fer-M 进化相关性最高(图 2)。

2.3 PaFer mRNA 的组织表达特征

实时荧光定量 PCR 结果显示, PaFer 基因扩增产物 mRNA 在所检的香鱼各组织中均有表达, 其中在脾脏中表达量最高, 肾脏、鳃、脑和心脏中的表达量次之, 肝脏和肠中表达量相对较少, 而在肌肉组织中表达量微弱(图 3)。

2.4 鳃弧菌侵染过程中香鱼各组织 PaFer mRNA 表达变化

腹腔注射鳃弧菌后, 感染组香鱼表现典型的弧菌病症状, 并能从肝、脾和肾等组织中分离出病原菌(结果未显示), 对照组香鱼无明显症状。与对照组相比, 鳃弧菌感染 4h 后, 肝中 PaFer mRNA 的表达量显著增加, 24h 时达到峰值, 为对照组的 103.67 倍 ($P < 0.05$); 脾和肾中 PaFer mRNA 表达量在感染 8h 后

显著增加, 均在 24h 时达到峰值, 分别为对照组 5.75 和 70.88 倍 ($P < 0.05$)(图 4)。

2.5 PaFer 的原核表达及纯化

重组质粒 pET-28a-PaFer 经测序验证无误后, 转化至大肠杆菌 BL21 Plys E 中, 加入 IPTG 诱导表达, 菌体蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离及考马斯亮蓝 G-250 染色后, 出现一条高表达蛋白条带, 相对分子质量约为 23kDa, 与预期大小相符(图 5)。利用重组质粒携带的多组氨酸标签, 表达的重组蛋白经 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后经 SDS-PAGE 检测, 显示为单一条带(图 5), 实现了重组蛋白 rPaFer 的一步纯化。纯化的 rPaFer 经尿素梯度透析复性及透析去除尿素后, 用于检测其活性。

2.6 PaFer 结合铁能力分析

菲洛嗉是一种高灵敏性的低铁显色剂, 能与 Fe^{2+} 配位, 形成有色螯合物。实验结果表明, 随着 rPaFer 浓度的增加, 各样品的铁离子螯合能力也随之增加, 当浓度为 $4\mu\text{g/mL}$ 时达到峰值(43.96%), 之后进入平台期(图 6)。

2.7 PaFer 体外抑菌作用

利用酶标仪测定 rPaFer 蛋白对 4 种鱼类常见弧菌的体外抑菌活性, 结果表明, PaFer 对鳃弧菌、溶藻弧菌和创伤弧菌均有抑制作用, 其 MIC 值分别为: 1.5625、25、 $100\mu\text{g/mL}$, 对副溶血弧菌无明显抑制作用。

3 讨论

铁蛋白调节铁离子的储存和释放, 是鱼类先天免疫系统的重要组成部分。本研究在香鱼单核/巨噬细胞转录组测序的基础上得到了香鱼铁蛋白基因。序列分析揭示, PaFer 具有与其它物种铁蛋白相似的结构特征: 包括保守的铁蛋白样双铁结构域、铁氧化酶双铁中心铁结合位点的 7 个高度保守的氨基酸残基及 4 个 α 螺旋等, 且与大西洋鲑和虹鳟 Fer-M 同源性最高, 为 92.0%。系统进化树分析表明, 各物种 Fer-M、Fer-H 和 Fer-L 分别成簇, PaFer 与胡瓜鱼、大西洋鲑和虹鳟的 Fer-M 聚为一个小簇, 与虹鳟 Fer-M 进化相关性最高。

表达特征分析表明, PaFer mRNA 在健康香鱼被检组织中有不同程度的表达, 且在脾脏中表达量最高, 与已报道的大黄鱼(Zhang *et al.*, 2010)、半滑舌鲷(Wang *et al.*, 2011)、条石鲷(Elvitigala *et al.*, 2013)和牙鲆(Wang *et al.*, 2015)等鱼类 Fer-M 在肝脏中表达最高不同。脾脏是机体参与贮铁的主要器官之一, PaFer

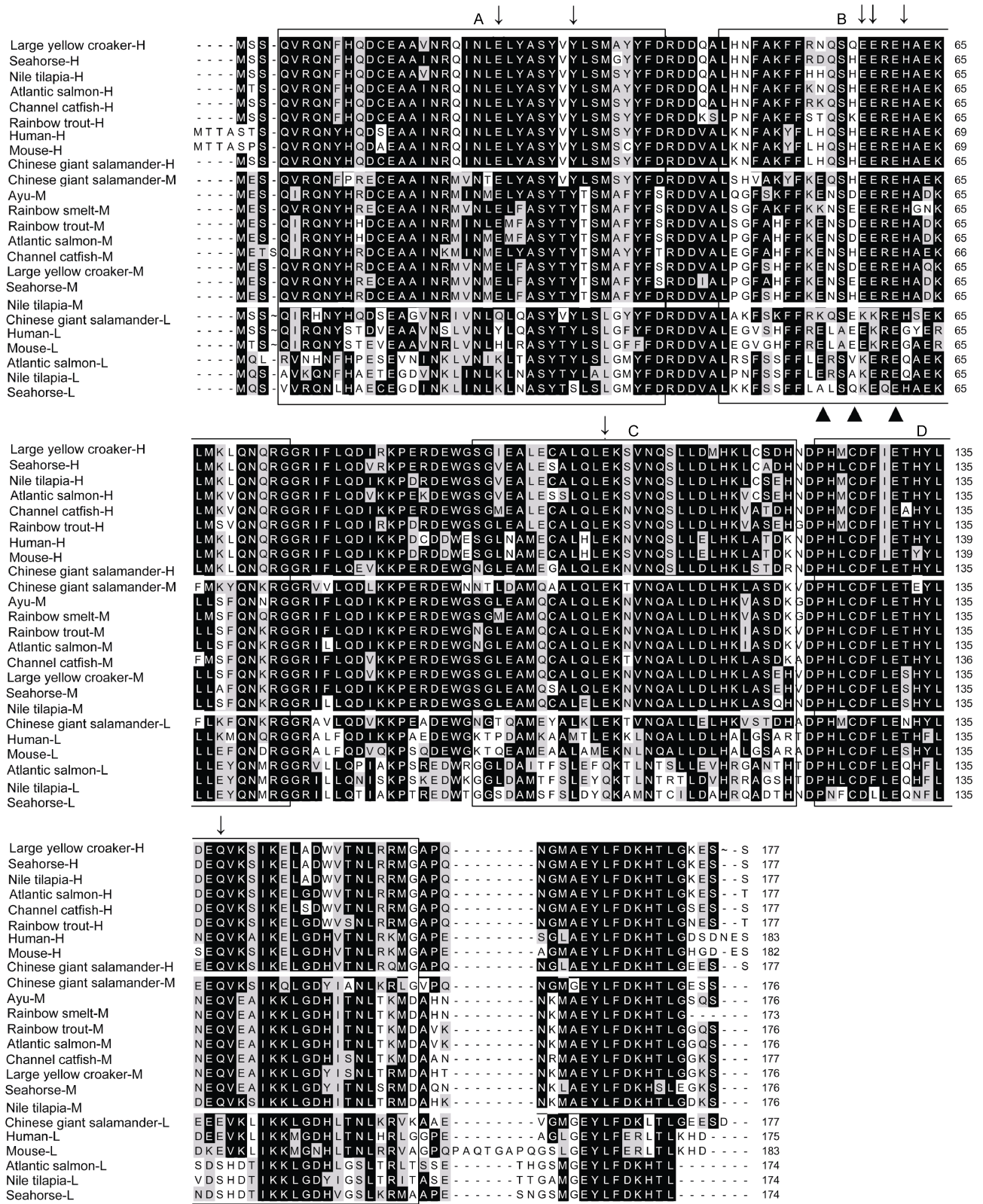


图 1 香鱼与其他物种 Fer 氨基酸序列的多重比对

Fig.1 Multiple alignment of fish Fer isoforms and those of other species

注: A—D 示 4 个预测的螺旋; ↓ 示 Fer-H 和 Fer-M 亚基铁氧化酶中心的 7 个保守氨基酸残基; ▲ 示 Fer-L 和 Fer-M 亚基参与铁成核的 3 个保守氨基酸残基; 灰色和黑色阴影: 分别表示氨基酸残基的相似性和同一性

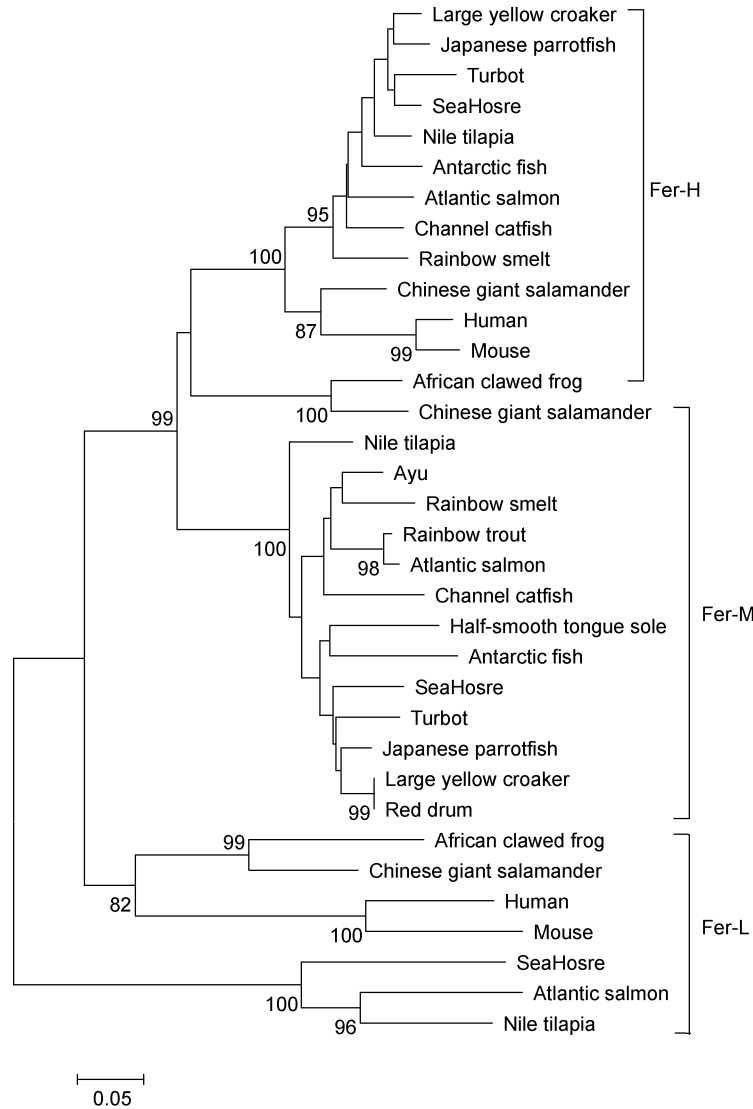


图 2 基于 NJ 法构建的香鱼和其他物种全长铁蛋白亚氨基酸序列的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic (Neighbor-joining) analysis of complete ferritin subunits from ayu and other species

注: 分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得的置信度, 只显示置信度>60%的数值

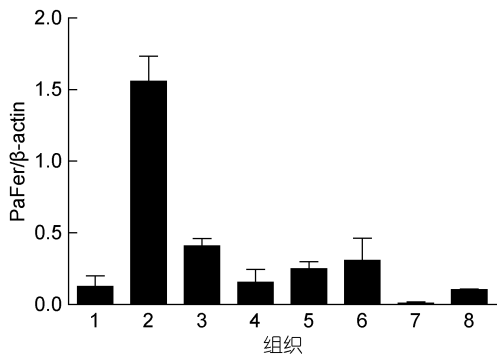


图 3 健康香鱼 PaFer mRNA 的组织表达特征

Fig.3 The mRNA expression patterns of PaFer in various tissues of healthy ayu

注: 1: 肝脏; 2: 脾; 3: 肾; 4: 脑; 5: 心; 6: 鳃; 7: 肌肉; 8: 肠。以 PaFer 与 β-actin mRNA 的比值作为 PaFer mRNA 的相对表达量(n=4)

在脾脏中大量表达, 揭示其可能在香鱼铁离子贮存中发挥重要的作用。目前, 已有较多文献揭示鱼类 Fer 的表达与病原体感染密切相关, 主要体现为病原体感染后鱼类 Fer 基因表达显著上调(Zhang *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011; Wang *et al*, 2015)。例如, 大黄鱼感染弱化的活鳃弧菌后, 肝中 Fer-M mRNA 的表达在 12h 达到峰值, 上调 4.4 倍, 脾 Fer-M mRNA 的表达在 12h 达到峰值, 上调 4.7 倍, 肾脏 Fer-M mRNA 的表达量在 5d 时达到峰值, 上调 4.4 倍(Zhang *et al*, 2010); 半滑舌鳎感染鳃弧菌后, 肾、脾和肝中 Fer-M mRNA 表达分别在 48h、4h 和 1h 时达到峰值, 分别约为对照组的 62、48 和 11 倍(Wang *et al*, 2011); 而半滑舌鳎感染海豚链球菌后, 肾、脾和肝中 Fer-M

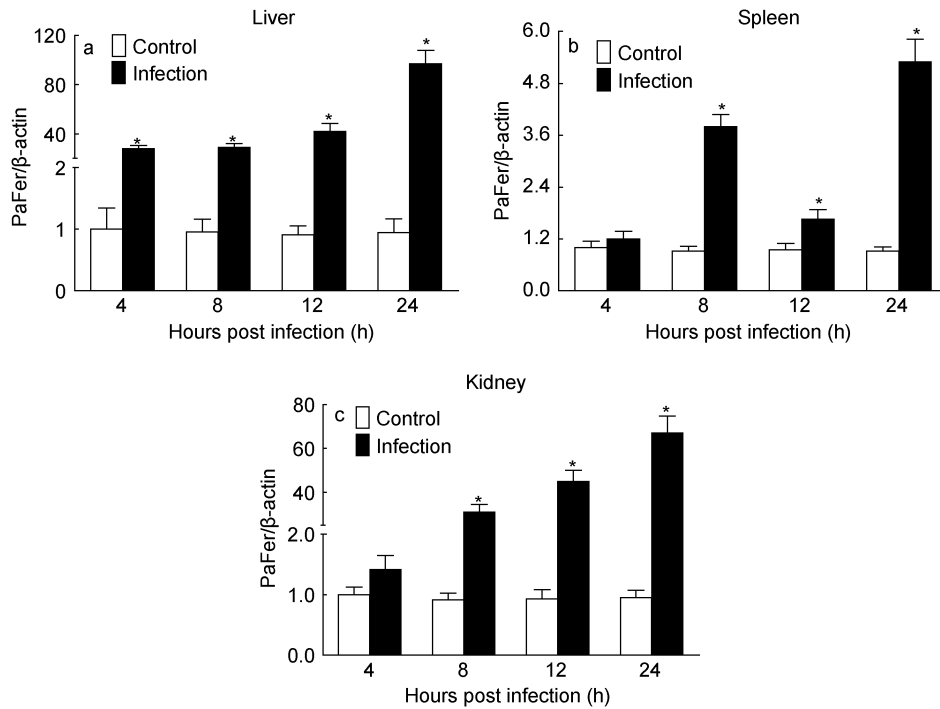


图 4 鳃弧菌感染后香鱼各组织中 PaFer mRNA 的表达变化

Fig.4 Analysis on PaFer mRNA expression changes in various tissues of *V. anguillarum* infected ayu

注: a: 肝; b: 脾; c: 肾。以 PaFer 与 β-actin mRNA 的比值作为 PaFer mRNA 的相对表达量, *: 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$) ($n=4$)

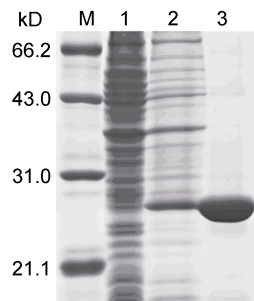


图 5 PaFer 的原核表达及纯化

Fig.5 Prokaryotic expression of PaFer in *Escherichia coli* and its purification

注: M: 蛋白 Marker; 1: pET-28a/BL21 经 IPTG 诱导; 2: pET-28a-PaFer/BL21 经 IPTG 诱导; 3: 纯化的重组蛋白

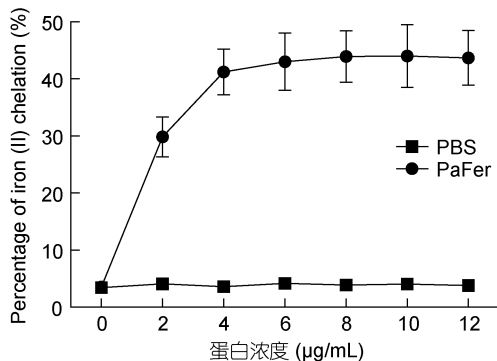


图 6 不同浓度 rPaFer 的铁螯合能力

Fig.6 Iron chelation activity of rPaFer in different concentrations

mRNA 表达达到峰值的时间分别为 24h、48h 和 24h, 上调倍数也明显低于鳃弧菌感染组(Wang *et al*, 2011); 牙鲆感染迟缓爱德华菌后, FerM 在头肾、脾和肝中的表达量显著上调, 达到峰值的时间分别为 12h、24h 和 12h, 分别约为对照组的 13、35 和 20 倍(Wang *et al*, 2015)。本研究中, 香鱼感染鳃弧菌后, 肝、脾和肾中 PaFer mRNA 表达变化趋势与上述研究结果相似, 但达到峰值的时间点和峰值不同, 肝、脾和肾中 PaFer mRNA 均在感染 24h 时达到最高, 分别为对照组的 103.67、5.75 和 70.88 倍, 揭示 PaFer 可能在香鱼抗细菌感染的免疫反应中发挥着重要作用。

研究表明, 半滑舌鳎、条石鲷和牙鲆 Fer-M 重组蛋白表现出显著的铁螯合活性, 分别在浓度为 8、6 和 8 μg/mL 时铁螯合能力最强(Wang *et al*, 2011; Elvitigala *et al*, 2013; Wang *et al*, 2015), 而且牙鲆 Fer-M 重组蛋白能完全抑制迟缓爱德华氏菌的生长, 半滑舌鳎 Fer-M 重组蛋白能完全抑制鳃弧菌的生长。在本实验中, rPaFer 具有明显的铁螯合能力, 并能体外抑制三种鱼类重要的弧菌病原鳃弧菌、溶藻弧菌和创伤弧菌的生长, 与上述研究结果基本一致。结合病原菌感染诱导鱼体各组织中 Fer 表达量大幅上调这一结果, 我们推测, 由于铁是大部分微生物生长和维生

其致病性的必需元素(Bullen, 1981), 当病原菌感染鱼体后, 短时间内铁蛋白大量合成, 一方面通过螯合环境中对细菌代谢所必需的铁离子来抑制细菌的繁殖(Ong *et al*, 2006), 另一方面, 由于鱼体血浆内铁离子含量大大降低(Lauffer, 1992), 大量合成的铁蛋白可维持体内铁含量的稳定, 从而参与调控铁代谢以及抵抗微生物的宿主自身免疫过程。

4 结论

本研究测定了香鱼 Ferritin 基因的 cDNA 序列, 序列分析揭示它与虹鳟和大西洋鲑 Ferritin M 亚基序列最为相似。健康香鱼中, PaFer mRNA 在脾中表达量最高, 鳃弧菌感染后, PaFer mRNA 在各组织中表达量显著上调; 铁结合能力和抑菌活性实验表明, PaFer 重组蛋白具有明显的铁结合能力, 且对鳃弧菌、溶藻弧菌和创伤弧菌生长均有明显抑制作用, 揭示 PaFer 与香鱼抗病原感染的免疫反应紧密相关, 可能通过调控铁代谢参与鱼类抵抗微生物的宿主自身免疫过程。研究结果为进一步研究鱼类铁蛋白的结构和功能机制奠定了基础。

参 考 文 献

- 李长红, 陈 炯, 史雨红等, 2009. 宁海地区香鱼弧菌病原菌鉴定. 微生物学报, 49(7): 931—937
- Andersen O, Dehli A, Standal H *et al*, 1995. Two ferritin subunits of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cloning of the liver cDNAs and antibody preparation. Mol Mar Biol Biotechnol, 4(2): 164—170
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P, 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 1790(7): 589—599
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72(1—2): 248—254
- Bullen J J, 1981. The significance of iron in infection. Clin Infect Dis, 3(6): 1127—1138
- Chang C I, Zhang Y A, Zou J *et al*, 2006. Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Antimicrob Agents Chemother, 50(1): 185—195
- Clegg G A, Fitton J E, Harrison P M *et al*, 1981. Ferritin: molecular structure and iron-storage mechanisms. Prog Biophys Mol Biol, 36: 53—86
- De Zoysa M, Lee J, 2007. Two ferritin subunits from disk abalone (*Haliotis discus discus*): cloning, characterization and expression analysis. Fish Shellfish Immunol, 23(3): 624—635
- Dickey L F, Sreedharan S, Theil E C *et al*, 1987. Differences in the regulation of messenger RNA for housekeeping and specialized-cell ferritin. A comparison of three distinct ferritin complementary DNAs, the corresponding subunits, and identification of the first processed in amphibia. J Biol Chem, 262(16): 7901—7907
- Elvitigala D A S, Premachandra H K A, Whang I *et al*, 2013. A teleostean counterpart of ferritin M subunit from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): an active constituent in iron chelation and DNA protection against oxidative damage, with a modulated expression upon pathogen stress. Fish Shellfish Immunol, 35(5): 1455—1465
- Harrison P M, Arosio P, 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 1275(3): 161—203
- Hu Y H, Zheng W J, Sun L, 2010. Identification and molecular analysis of a ferritin subunit from red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Shellfish Immunol, 28(4): 678—686
- Lauffer R B, 1992. Iron and Human Disease. Boca Raton: CRC Press
- Lawson D M, Treffry A, Artymiuk P J *et al*, 1989. Identification of the ferroxidase centre in ferritin. FEBS Lett, 254(1—2): 207—210
- Lee J H, Pooley N J, Mohd-Adnan A *et al*, 2014. Cloning and characterisation of multiple ferritin isoforms in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). PLoS One, 9(7): e103729
- Levi S, Santambrogio P, Cozzi A *et al*, 1994. The role of the L-chain in ferritin iron incorporation: studies of homo and heteropolymers. J Mol Biol, 238(5): 649—654
- Li C H, Lu X J, Li D F *et al*, 2014. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*). Fish Shellfish Immunol, 37(1): 108—114
- Li C H, Lu X J, Li M Y *et al*, 2015. Cathelicidin modulates the function of monocytes/macrophages via the P2X7 receptor in a teleost, *Plecoglossus altivelis*. Fish Shellfish Immunol, 47(2): 878—885
- Liu H, Takano T, Peatman E *et al*, 2010. Molecular characterization and gene expression of the channel catfish ferritin H subunit after bacterial infection and iron treatment. J Exp Zool Part A: Ecol Genet Physiol, 313A(6): 359—368
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402—408
- Neves J V, Wilson J M, Rodrigues P N S, 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. Dev Comp Immunol, 33(7): 848—857
- Oh M, Umasuthan N, Elvitigala D A S *et al*, 2016. First comparative characterization of three distinct ferritin subunits from a teleost: evidence for immune-responsive mRNA expression and iron depriving activity of seahorse (*Hippocampus abdominalis*) ferritins. Fish Shellfish Immunol, 49: 450—460
- Ong S T, Ho J Z S, Ho B *et al*, 2006. Iron-withholding strategy in innate immunity. Immunobiology, 211(4): 295—314
- Orino K, Watanabe K, 2008. Molecular, physiological and

- clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *Vet J*, 178(2): 191—201
- Rost B, 1996. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol*, 266: 525—539
- Santambrogio P, Levi S, Cozzi A *et al*, 1996. Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centres. *Biochem J*, 314(1): 139—144
- Scudiero R, Esposito M G, Trinchella F, 2013. Middle ferritin genes from the icefish *Chionodraco rastrispinosus*: comparative analysis and evolution of fish ferritins. *C R Biol*, 336(3): 134—141
- Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28(10): 2731—2739
- Torti F M, Torti S V, 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10): 3505—3516
- Wang J J, Sun L, 2015. Ferritin M of *Paralichthys olivaceus* possesses antimicrobial and antioxidative properties. *Fish Physiol Biochem*, 41(4): 951—959
- Wang W, Zhang M, Sun L, 2011. Ferritin M of *Cynoglossus semilaevis*: an iron-binding protein and a broad-spectrum antimicrobial that depends on the integrity of the ferroxidase center and nucleation center for biological activity. *Fish Shellfish Immunol*, 31(2): 269—274
- Zhang X, Wei W, Wu H Z *et al*, 2010. Gene cloning and characterization of ferritin H and M subunits from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish Shellfish Immunol*, 28(5—6): 735—742

MOLECULAR IDENTIFICATION, EXPRESSION AND FUNCTION ANALYSIS ON FERRITIN IN AYU *PLECOGLOSSUS ALTIVELIS*

CHEN Meng-Dan, ZHU Kai, XU Zhu-Jie, LI Chang-Hong, MIAO Liang, CHEN Jiong
(Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Ferritin (Fer), a type of iron storage protein, exists in organism in close relationship with iron metabolism. We obtained the cDNA sequence of ferritin gene from ayu (*Plecoglossus altivelis*), known as Fer gene (PaFer), with *de novo* transcriptome sequencing of ayu monocytes/macrophages. The full-length of cDNA sequence of this gene was 943 nucleotides, containing a large open reading frame encoding 176 amino acids in a predicted molecular mass of 20.4kDa and a theoretical isoelectric point of 5.46. The multiple sequence alignment of complete amino acid sequences indicated that PaFer featured a conserved ferritin-like diiron domain. PaFer shared the highest amino acid sequence identity (92.0%) with those of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) Fer-M. Phylogenetic tree analysis also confirmed that PaFer, Fer-M of Atlantic salmon and rainbow trout grouped into a small cluster, and PaFer was most closely related to that of rainbow trout. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis showed that PaFer mRNA had the highest expression level in spleen of healthy ayu. After *Vibrio anguillarum* infection, PaFer transcripts upregulated significantly in the liver, spleen, and kidney. The PaFer was overexpressed in the form of inclusion bodies and a Ni²⁺ nitrilotriacetic acid (NTA) Sefinose column was used to purify PaFer recombinant protein (rPaFer). Urea gradient dialysis method was used to obtain the refolding protein. Result of iron chelation experiment show that at rPaFer concentration of 4μg/mL, the iron chelation of rPaFer reached peak level (43.96%). In addition, result of antimicrobial activity experiment show that the minimum inhibitory concentration (MIC) of rPaFer against *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, and *V. vulnificus* was 1.5625, 25.0, and 100.0μg/mL, respectively. Therefore, we believe that the PaFer can play an important role in immune response against pathogen infection via regulation of iron metabolism. This understanding may provide a theoretical basis for studying the functions of fish Fer and its mechanisms of regulating fish immune response to pathogens.

Key words ferritin; *Plecoglossus altivelis*; expression; iron chelation capacity; antimicrobial activity