文章编号: 1000- 0615(2004)03- 0250- 05

鲫血清转铁蛋白 cDNA 克隆及系统发育进化序列分析

龙 华
(中国水产科学研究院长江水产研究所农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室, 湖北 荆州 434000)

摘要: 鱼类血清转铁蛋白是鱼类血清中一种非血红素结合铁的β- 球蛋白。从 GenBank 数据库查询发表的鱼类转铁蛋白 cDNA 或基因序列, 根据铁离子结合及转运功能位点, 设计并合成了两对引物 P1、P4 以及 P2、P3, 克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 中的核心片段, 长度为 866bp。再根据克隆出的核心片段分别设计上游及下游两对引物 P5、P6 以及 P7、P8, 随后用 RACE 方法分别克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 的 5' 端(787bp) 和 3' 端(1081bp) 以及全长 cDNA, 最后在计算机上排列出鲫血清转铁蛋白全长 cDNA, 长度为 2444bp。比较了 14 种鱼血清转铁蛋白 cDNA 序列的同源性, 其同源性在 30% ~ 80% 之间, 结果显示鲤科鱼类(鲫、银鲫、鲤及斑马鱼等) 具有很近的亲缘关系; 同时进行了系统发育进化分析, 证实了鱼类血清转铁蛋白进化的保守性和氨基酸序列的高度同源性。

关键词: 鲫; 转铁蛋白 cDNA; 克隆; 系统发育
中图分类号: Q523 文献标识码: A

Cloning and sequence analysis of phylogenetic evolution of serum transferrin cDNA in *Carassius auratus*

LONG Hua
(Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology Certificated by the Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Transferrin of fish sera is a kind of non-heme β-globulin banding irons in fish sera. Transferrin has not only the property of lower oxygen tolerance but also the property of anti-diseases. Transferrin is coded by only one gene exceeding 10kb in size and its gene has much repetition structure. The two pairs of primers P1, P4 and P2, P3 were designed and synthesized according to the banding and functional sites of irons while referring to published cDNA or gene sequences of fish transferrins in the Database of GenBank. The reaction conditions of PCR are: fore-denaturation, 96℃, 4min; denaturation, 96℃, 1min; annealing, 60℃, 1min; extension, 72℃, 2min; cycle number, 35; last extension, 72℃, 10min. The pGEM-T vector system was used in cloning process. An 866bp length key segment sequence of crucian carp serum transferrin cDNA was cloned. Another two pairs of primers P5, P6 and P7, P8 were designed and synthesized according to the key segment sequence respectively. 5' end (787 bp), 3' end (1081bp) and the full-length cDNA of crucian carp serum transferrin cDNA were cloned by RACE respectively. The full-length cDNA (2444 bp) of crucian carp serum transferrin cDNA was arranged in computer. The deduced protein sequence length is probably 807bp. The homology of cDNA sequences of 14 fish serum transferrins was compared. Their homology is between 30% and 80%. The result shows that Cyprinidae fish (such

收稿日期: 2003-02-19
资助项目: 农业部"948"国际引进项目(983094)
作者简介: 龙 华(1964-), 男, 湖北荆州人, 副研究员, 主要从事鱼类分子生物学研究。Tel: 0716- 8212277- 3002, E-mail: longhua0000@yahoo.com.cn

as *Carassius auratus*, *C. gibelio*, *Cyprinus carpio*, and *Danio rerio*) has very close relative relationship. Their homology is more than 50%. At the same time, phylogenetic evolution was also analyzed. The evolutional conservatism and amino acid sequence homology of fish serum transferrins were confirmed. DNA Club, DNAman v4.0, DNA Tool v5.1 and BLAST v2.0 were adopted in the process of nucleotide sequence analysis. The nucleotide sequence analysis offers even more direct evidence for the hypothesis that recent transferrin is from original transferrin banding single iron site, deriving from common ancestor of 5×10^9 year ago and forming many branches of homology transferrins and homology analogs in different animals and different cells or tissues during a long evolutional process. Furthermore, the analogy of transferrin structure and function from different resources are based on the analogy of transferrin genes.

Key words: *Carassius auratus*; transferrin cDNA; cloning; phylogeny

鱼类血清转铁蛋白(transferrin, Tf, 又称为铁传递蛋白、运铁蛋白) 是鱼类血清中一种非血红素结合铁的β-球蛋白, 分子量为 70~80kDa[1], 是鱼体内铁的运输者。已经证实, 鱼类血清 Tf 的血清铁浓度、铁饱和度与鱼类的耐低氧性能(鱼类耗氧量及窒息点临界含氧量) 和栖息水层有明显的关系[2-4]。20 世纪 80 年代后期, 人们开始对各类 Tf 基因的结构、序列以及表达等进行较为深入的研究[3,4]。银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*) 血清 Tf 的 cDNA 氨基酸序列与人(*Homo sapiens*)、滑爪蟾(*Xenopus laevis*)、青鳉(*Oryzias latipes*) 和大西洋鲑(*Salmo salar*) 血清 Tf 推导的氨基酸序列分别有 48%、46%、67% 和 85% 的同源性[5-12]。进一步的研究表明: Tf 由 1 个大小超过 10kb 的基因编码(如人血清转铁蛋白基因), 而且存在大量的重复结构[5-9]。本项研究克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA, 应用 NCBI 数据库和计算机分析软件对 GenBank 序列数据库中的鱼类转铁蛋白 cDNA 以及序列的同源性进行了比较, 并通过系统发育进化分析, 再次证实了鱼类血清转铁蛋白进化的保守性和氨基酸序列的同源性。

1　材料与方法

1.1　材料

采样前, 用含 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC) 的水处理与样品接触的所有玻璃及金属器皿和器材并高温烘烤。从本所试验场获得个体 300g 左右鲜活鲫(*Carassius auratus*) 若干, 经鉴定后, 选取 1 尾鲫 50~100mg 新鲜肝组织, 用含 0.1% DEPC 的水清洗样品。

1.2　总 RNA 提取

用 GIBCO 公司产 Trizol 试剂盒一步法提取样品, 1mL 总 RNA 提取液加入到新鲜鲫肝组织中, 可获得总 RNA 约 600μg。用日本岛津 UV-1601 分光光度计测定 RNA 浓度, 于-20℃保存。

1.3　引物

从 GenBank 查询发表的鱼类转铁蛋白 cDNA 或基因序列, 设计并合成引物:

P1: 5'-GCTGGTGAAGCAGATGCCATCACT-3';
P2: 5'-TGCAGGCTGGAACATTCCCAT-3';
P3: 5'-CCTCCATCCACTGCCATTGCATC-3';
P4: 5'-ACTGCTCCACCATGGCTGGAACC-3';
P5: 5'-GCTGATAGTCCTGCCTCTCGCT-3';
P6: 5'-TGTCTGAGCAGCTGCAGTCACCCT-3';
P7: 5'-ACCGCCTTTCCTGGACTACAAG-3';
P8: 5'-CGCGTTTCTTCGTCTACGTTACCG-3'。

采用 DNA Club 生物学软件, 计算出引物的相关数据。

1.4　PCR 扩增

经逆转录合成 cDNA 第 1 链后作为扩增模板, 采用日本 NIPPON FERROFLUIDICS 公司产 PCR 仪进行扩增。引物 P1 和 P4 的 PCR 扩增条件为: 预变性 96℃4min; 变性 96℃1min; 退火 60℃1min; 聚合 72℃2min; 循环数 35 个; 最后于 72℃延伸 10min, 4℃保存。回收后的 DNA 片段再扩增, 用引物 P2 和 P3, PCR 条件同上。

1.5　DNA 片段的纯化回收

1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳, 分子量标准用 DNA Ladder Ⅲ(北京鼎国生物技术发展中心产), 1×TAE, 稳流 40mA, 1h。用 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒(北京鼎国生物技术发展中心产) 回收 DNA 片段, 测定浓度, -20℃保存。

1.6　cDNA 亚克隆

用 Promega 公司产试剂盒, 含 pGEM-T 载体

及T4DNA 连接酶,4℃连接过夜。将亚克隆质粒转化到 JM109 感受态受体菌,在含有 100μg·mL^{-1}的氨苄青霉素以及 IPTG 和 X- Gal 的 LB 平板上筛选阳性克隆。通过质粒 DNA 提取鉴定重组子,并测序。

1.7 RACE 法克隆5' 端和 3' 端

"5' / 3' RACE 试剂盒"由德国 Roche 诊断公司生产。先分别用两步 PCR 法克隆出 cDNA 的5' 端(引物为 P5 和 P6)及 3' 端(引物为 P7 和 P8),再用 PCR 克隆出全长 cDNA(引物为5' / 3' RACE 引物)。操作方法见"5' / 3' RACE 试剂盒"说明书,cDNA 亚克隆方法同1.6。

1.8 同源性比较

将克隆的 cDNA 序列提交 GenBank 序列数据库中,以 BLAST 程序进行核苷酸序列同源性比较。采用的计算机程序包括 DNA Club、DNAman v4.0、DNA Tool v5.1、BLAST v2.0等。

2 结果与分析

2.1 鲫血清转铁蛋白 cDNA 克隆

根据文献[1,10,11],确定了转铁蛋白分子结构中铁离子结合与转运功能位点位于其 cDNA 对应阅读框上游的 600bp 左右以及下游的 1200bp 左右,转铁蛋白 cDNA 的核心序列可以确定在 600bp 至 1200bp 之间。首先克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 的核心片段,长度为 866bp。随后用 RACE 方法分别克隆出鲫血清转铁蛋白 cDNA 的5' 端(787bp)和 3' 端(1081bp)以及全长 cDNA,最后用计算机程序排列出鲫血清转铁蛋白全长 cDNA。鲫血清转铁蛋白 cDNA 序列总长度为 2444 bp,双链 DNA 分子量为 1506.6 kDa。其中 A、C、G、T 数分别为 731、519、579、615,所占比例分别为 30%、21%、24%、25%。推导出的蛋白质可能序列长度为 807(图1)。

2.2 12 种鱼类转铁蛋白基因序列的同源性分析

转铁蛋白由1个大小超过 10kb 的基因编码(如人血清转铁蛋白基因),而且基因序列存在大量的重复结构,通常其转录序列的片段大小为 2.5kb 左右,其编码的氨基酸序列也存在大量的重复结构[5-9]。在同源性比较中,我们搜寻到大量的同源序列,但以转铁蛋白 cDNA 或基因的同源序列为主。14 种鱼类血清转铁蛋白基因序列同源性比较见表1。由表1可见,鲫血清转铁蛋白 cDNA 与其它鱼类的转铁蛋白 cDNA 的同源性在 30%~80% 之间。

表1 14 种鱼血清转铁蛋白 cDNA 序列同源性比较

Tab.1 Comparison of homology of cDNA sequences of 14 fish serum transferrins

	1	2	3	4	5	6	7	8	* 9	* 10	* 11	12	13	14
1														
2	80													
3	76	90												
4	60	73	73											
5	46	51	51	50										
6	44	55	53	51	65									
7	33	36	34	34	31	35								
8	36	37	35	34	33	34	38							
* 9	41	56	56	54	68	65	32	35						
* 10	47	51	50	51	67	62	34	36	79					
* 11	43	34	54	52	36	36	35	34	34	35				
12	47	53	37	36	65	67	35	36	60	63	35			
13	38	38	34	36	39	50	33	35	35	43	38	33		
14	46	56	56	57	77	70	33	33	74	72	69	38	35	

注:(1):1. 鲫;2. 银鲫;3. 鲤;4. 斑马鱼;5. 青 ;6. 银大麻哈鱼;7. 大鳞大麻哈鱼;8. 川鲽;9. 牙鲆;10. 太平洋鲆;11. 日本鲆;12. 黑线鳕;13. 褐鳟;14. 沙鳗;(2)除本实验室克隆的鲫 cDNA 序列外,其余 cDNA 序列均来源于 GenBank 数据库;(3)* 所标出的牙鲆、太平洋鲆与日本鲆虽拉丁名称相同,但属不同亚种或品种,文献中未提及具体名称

Notes: (1): 1. *Carassius auratus;* 2. *Carassius gibelio;* 3. *Cyprinus carpio;* 4. *Danio rerio;* 5. *Oryzias latipes;* 6. *Oncorhynchus kisutch;* 7. *Oncorhynchus tshawytscha;* 8. *Platichthys flesus;* 9. *Paralichthys olivaceus;* 10. *Paralichthys olivaceus;* 11. *Paralichthys olivaceus;* 12. *Melanogrammus aeglefinus;* 13. *Salmo trutta;* 14. *Ammodytes marinus;* (2) Sequences of other transferrin cDNAs are from the Database of GenBank except for cDNA sequence of crucian carp cloned in the laboratory; (3) The three fishes, Japanese flounder, Bastard halibut and left eye flounder, marked by * are the different subspecies or varieties though they share the same Latin names. The detailed names were not mentioned in references

```
1       AGCCTCTCCTCCTCTTGGCACTGCTCTAATATGACCATCATGTCTTGCCGCTGCGTCTCG
1         S  L  S  S  S  W  H  C  S  N  M  T  I  M  S  C  R  C  V  S
61      TGTTTGTCCTGCCTCTCTGTGGCACTGCCCTCAGCCAGTGCTCAAAAAGTCAAATGGTGT
21        C  L  S  C  L  S  V  A  L  P  S  A  S  A  Q  K  V  K  W  C
121     GTGAAGTCTCAGCAGCTGCATAAACCTGCCAACACCTTGCCACCAAATCACCAGAGCTTC
41        V  K  S  Q  Q  L  H  K  P  A  N  T  L  P  P  N  H  Q  S  F
181     TCATCTTATACAGACCTGAAAGACTGCGGCATCTCCCTGAGTGCATGTCAAGCATCAAGA
61        S  S  Y  T  D  L  K  D  C  G  I  S  L  S  A  C  Q  A  S  R
241     AATGGTGATACAGATGCTATCACTGTAGGTGCAGACCATGTTTATCAGGCTGGACTCATA
81        N  G  D  T  D  A  I  T  V  G  A  D  H  V  Y  Q  A  G  L  I
301     AATTATGGCCTCCGTCCTATCATTGCCGAGAATAATAAAGCTGTATGTTCTTATGCTGTG
101       N  Y  G  L  R  P  I  I  A  E  N  N  K  A  V  C  S  Y  A  V
361     GCTTTGGTCAAGAGAGACACAGACTTCAGCATCAACGATCTCAAAGGAAAGACTTCATGC
121       A  L  V  K  R  D  T  D  F  S  I  N  D  L  K  G  K  T  S  C
421     CACAGTTGTTATCAAAGCCCTCAGGCTGGTGAAGCAGATGCCGAAGACTGGTTGCACAAA
141       H  S  C  Y  Q  S  P  Q  A  G  E  A  D  A  E  D  W  L  H  K
481     ACAAGATTCCCTGGGAGGGTATTGATGAGAAAGCAGTGTACCCAAACCTGTGTCAAGCTT
161       T  R  F  P  G  R  V  L  M  R  K  Q  C  T  Q  T  C  V  K  L
541     GCCAGGGTGACTGCAGCTGCTCAGACAGTGAAAATCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCG
181       A  R  V  T  A  A  A  Q  T  V  K  I  A  C  S  R  P  P  W  P
601     CGGGATTTGCAGGCTGGAACATTCCCATTGGAAGACTGGTTGCACAAAATAAGATTCTCT
201       R  D  L  Q  A  G  T  F  P  L  E  D  W  L  H  K  I  R  F  S
661     GGGATGGTCCTGATGACATGCCTCTTGAAAAGGCTGTGTCACAATTCTTTTCAAGCAGTT
221       G  M  V  L  M  T  C  L  L  K  R  L  C  H  N  S  F  Q  A  V
721     GCATTCCTGGAATATCGAAAGCACTGTACCCAAACCTGTGTCAAGCTTGCCAGGGTGACT
241       A  F  L  E  Y  R  K  H  C  T  Q  T  C  V  K  L  A  R  V  T
781     GCAGCTGCTCAGACAGGGAAAAGTACTCTGGTGATGGAGGAGCCTTCCAGTGCTTGTAAA
261       A  A  A  Q  T  G  K  S  T  L  V  M  E  E  P  S  S  A  C  K
841     GTGGTCATGGACAAGTTGCCTTTATGTGTTATGATGAAATCCCACCGAGCGAGAGGCAGG
281       V  V  M  D  K  L  P  L  C  V  M  M  K  S  H  R  A  R  G  R
901     ACTATCAGCTGTTGTGCATATATGGCAGCAGGAAAAGCATTGAGGAGTACAAGGACTGCT
301       T  I  S  C  C  A  Y  M  A  A  G  K  A  L  R  S  T  R  T  A
961     ACCTCCTCAAAGAGCTTCACCATGCTGTGTTCAGTCGCAAGGATGCTGATTCAGAGCAGA
321       T  S  S  K  S  F  T  M  L  C  S  V  A  R  M  L  I  Q  S  R
1021    TTTATAAAGTCCTTAAACAGATTCCGGATTCAGATCTTTTCTCTTCTGCTGCTTTTGGCG
341       F  I  K  S  L  N  R  F  R  I  Q  I  F  S  L  L  L  L  L  A
1081    GAAAGGACCTGTTGTTCTCAGACTCTATATCTGATCTGTTGGAGCTTCCCAAGATCATGG
361       E  R  T  C  C  S  Q  T  L  Y  L  I  C  W  S  F  P  R  S  W
1141    ACTCCTTCCTCTACCAGAGAGAAGATTATTATGAAGCCATGCGTGCCCTTAGAGCTGGGA
381       T  P  S  S  T  R  E  K  I  I  M  K  P  C  V  P  L  E  L  G
1201    ACCCACCAGCTCCACCTCAAGACGGTAAAATTGAATGGTGTACCATTGGCCATGCAGAGC
401       T  H  Q  L  H  L  K  T  V  K  L  N  G  V  P  L  A  M  Q  S
1261    AACAGAAGTGTGACAGTTTACAGATTCCTCATATGGAGTGCCGAAGGGCATCATCTGTGG
421       N  R  S  V  T  V  Y  R  F  L  I  W  S  A  E  G  H  H  L  W
1321    AAGAGTGCATCCAGAAAATCATGCGCAAAGAAGCAGATGCAATGGCAGTGGATGGAGGAA
441       K  S  A  S  R  K  S  C  A  K  K  Q  M  Q  W  Q  W  M  E  E
1381    TCACTAGTGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCA
461       S  L  V  R  P  P  A  G  R  P  Y  G  R  A  P  N  A  L  D  A
1441    CAAACATGTGTGAACTGTGTAAAGGCAGTGAGAAGGCAGTGGGAGATGACAGCAAGTGCA
481       Q  T  C  V  N  C  V  K  A  V  R  R  Q  W  E  M  T  A  S  A
1501    AAGCCTCTTCTGAAGAAAGATATTATGGCTATGATGGGGCTTTCAGGTGTCTTGCAGAAA
501       K  P  L  L  K  K  D  I  M  A  M  M  G  L  S  G  V  L  Q  K
1561    AAACTGGTGAAGTTGCTTTCATCAAGCACAATATTGTTGGGGATTACACTGATGGTAAAG
521       K  L  V  K  L  L  S  S  S  T  I  L  L  G  I  T  L  M  V  K
1621    GACCAGCGTGGGCTAAGGATCTGTAGTCAGAAGATTTTGAACTGTTCTGTCCAGAATTAC
541       D  Q  R  G  L  R  I  C  S  Q  K  I  L  N  C  S  V  Q  N  Y
1681    CAGAGACAACAGCATGCCTCTTGTGAAGGCTGTGTCACAATTCTTTTCAAGCAGTTGCAT
561       Q  R  Q  Q  H  A  S  C  E  G  C  V  T  I  L  F  K  Q  L  H
1741    TCCGGAATATCTAAACACACTGATTTAAATGGTAGATGTAATCTTGCCAAAGTGCCAGCT
581       S  G  I  S  K  H  T  D  L  N  G  R  C  N  L  A  K  V  P  A
1801    CATGCTGTGATCACCCGAGAAGATGCACGGAAAGACGTGGTGAAGGTTCTGAAGGAGGCT
601       H  A  V  I  T  R  E  D  A  R  K  D  V  V  K  V  L  K  E  A
1861    CAAGCCAATACAGATTTTCAAGACAAGCTGTTCAAGTCAGAGGGTGAAAGAAACAGGGGA
621       Q  A  N  T  D  F  Q  D  K  L  F  K  S  E  G  E  R  N  R  G
1921    AATTCTCTGATTCCACTAAACGTGGACAATGCTTCAGGAGATTACTCAACGTTTAAGGAA
641       N  S  L  I  P  L  N  V  D  N  A  S  G  D  Y  S  T  F  K  E
1981    TTCCTGACACAAAAGTACATTGACATGATTGAAAAGACCTACATGACTGGCAAGGGGTCA
661       F  L  T  Q  K  Y  I  D  M  I  E  K  T  Y  M  T  G  K  G  S
2041    TTAAACCAGATCTGGTCAAGGCATGCACAATGTAAATTTGTATTTGTTAGTCGAGTTCCC
681       L  N  Q  I  W  S  R  H  A  Q  C  K  F  V  F  V  S  R  V  P
2101    GTGCAATCTCGACGCGCAAAGAAGCAGATGCCAATAAAATTTTGTGCCATTGAGCTTTAT
701       V  Q  S  R  R  A  K  K  Q  M  P  I  K  F  C  A  I  E  L  Y
2161    CTTGCATGTTTCGGACAAATAAGAATCTACATTTCTGAATCACTCTACTTAATCAAATTA
721       L  A  C  F  G  Q  I  R  I  Y  I  S  E  S  L  Y  L  I  K  L
2221    AGGACCAGACAGGCGGCAACTCCTGGGAAAGTTACCAGCATGAGGAAAACACAATGTTCA
741       R  T  R  Q  A  A  T  P  G  K  V  T  S  M  R  K  T  Q  C  S
2281    TGTTATGCAGCAGTTTTCATATCTTATTATCAAATTCAAATCTATGATGATCAAACTGTT
761       C  Y  A  A  V  F  I  S  Y  Y  Q  I  Q  I  Y  D  D  Q  T  V
2341    CACACGCATGAAGTTACAATGTGTTCGAGTTTCTGTTTATTATACCACAAGGGTTGTGAT
781       H  T  H  E  V  T  M  C  S  S  F  C  L  L  Y  H  K  G  C  D
2401    CAACCTGTGTATATAAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
801       Q  P  V  Y  I  K  L
```

图 1　鲫血清转铁蛋白 cDNA 序列及推导的蛋白质序列

Fig. 1　Sequence of serum transferrin cDNA of crucian carp and deduced protein sequence

图中从上至下有下划线的部分分别为引物 P5、P6、P1、P2、P3、P4、P8 和 P7)

The parts with underlines from the top to the bottom of

the sequence are primer P5, P6, P1, P2, P3, P4, P8 and P7, respectively

根据目前的研究,转铁蛋白起源于大约 5×10^9 年前奥陶纪时期的共同祖先[3,4],在长期的进化过程中,形成了若干具有同源性的转铁蛋白及其类似物的分支,分布在不同动物的种属和动物体不同的细胞、组织中。转铁蛋白的分子量、结构和结构域的研究,证明了转铁蛋白是由含单铁结合部位的原始转铁蛋白分子进化而来的假说,转铁蛋白基因结构的分析为这一进化过程提供了更直接的证据。

不同来源转铁蛋白结构与功能的相似性也是基于其基因的相似性。本研究结果再次证实了转铁蛋白的同源性和保守性。由表 1 中 14 种鱼血清转铁蛋白 cDNA 序列可以绘制出它们的系统发育进化树(图 2)。鲤科鱼类(鲫、银鲫、鲤以及斑马鱼等)亲缘关系很近。

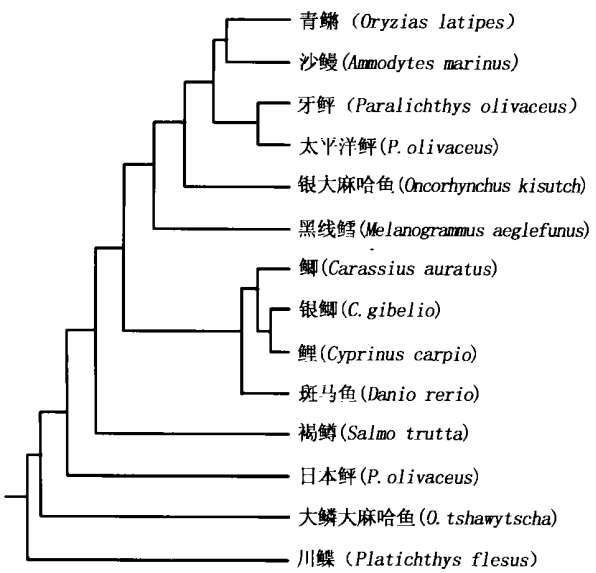

图 2 14 种鱼系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on cDNA sequences of 14 fish serum transferrins

参考文献:

[1] Spik G. The biochemistry and physiology of iron, section I: structure and function of transferrins [M]. New York: Elsevier Science Publishing Co, Inc, 1982. 49- 56.

[2] Long H, Tang F S, Zeng Y, *et al*. Studies on genetic polymorphisms of freshwater fish serum transferrins[J]. J Fish China, 1996, 20(2): 168- 174. [龙 华,汤伏生,曾 勇,等. 淡水鱼类血清转铁蛋白遗传多态性研究[J]. 水产学报, 1996, 20(2): 168- 174.]

[3] Long H, Zeng Y, Li G. Present status of studies on fish serum transferrin and perspective of its application[J]. J Fish China, 2001, 25(2): 181- 186. [龙 华,曾 勇,李 谷. 鱼类血清转铁蛋白的研究现状与应用前景[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 181- 186.]

[4] Long H, Li G, Zheng Y. Study and development on transferrins [J]. Journal of Bioengineering Development, 2001, 21(2): 32- 39. [龙 华,李 谷,郑 英. 转铁蛋白的研究与发展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(2): 32- 39.]

[5] Lyndon J P, O' Malley B R, Saucede O, *et al*. Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1132: 97- 99.

[6] Petropoulos I, Corinne A G, Zakin M M. Characterization of the active part of the human transferrin gene enhancer and purification of two liver nuclear factors interacting with the TGTTTGC motif present in this region[J]. J Biol Chem, 1991, 266(35): 24220- 24225.

[7] Zakin M M. Regulation of transferrin gene expression[J]. FASEB J, 1992, 6: 3252- 3258.

[8] Rejean L I, Helmut H, Clement A F, *et al*. Rat transferrin gene expression: tissue specific regulation by iron deficiency[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 3723- 3727.

[9] Boissier F, Corinne A G, Schaeffer E, *et al*. The enhancer of the human transferrin gene is organized in two structural and functional domains[J]. J Biol Chem, 1991, 266(15): 9822- 9818.

[10] Lee J Y, Tange N, Yamashita H, *et al*. Cloning and characterization of transferrin cDNA from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Fish Pathology, 1995, 30(4): 271 - 277.

[11] Hirono I, Uchiyama T, Aoki T. Cloning, nucleotide sequence analysis, and characterization of cDNA for medaka (*Oryzias latipes*) transferrin[J]. J Mar Biotechnol, 1995, 2: 193- 198.

[12] Kvingedal A M, RΦrvik K A, AlestrΦm P. Cloning and characterization of atlantic salmon (*Salmo salar*) serum transferrin cDNA[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1993, 2(4): 233- 238.