

仿刺参铁蛋白 *ferritin* 基因的序列分析及表达

杨爱馥, 周遵春*, 孙大鹏, 董颖, 姜北, 汪笑宇,
陈仲, 关晓燕, 王摆

(辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 通过构建仿刺参 cDNA 文库, 获得铁蛋白全长 cDNA 序列。该基因序列全长 792 bp, 5'-非翻译区长 133 bp, 开放阅读框长 522 bp, 编码 173 个氨基酸, 3'-UTR 长 137 bp; 预测蛋白质分子量为 20 ku。5'-UTR 具有一个高度保守的铁离子应答元件。仿刺参 *ferritin* 氨基酸序列具备脊椎动物 *ferritin* 的亚铁氧化酶活性中心所特有的保守结构。该序列与海参的同源性最高, 达 84%, 与其它无脊椎动物如: 海星、鲍、牡蛎、海葵、线虫、小龙虾和果蝇的同源性为 74% ~ 34%; 与脊椎动物 *ferritin* 重链亚基同源性高于轻链亚基。系统进化分析表明, 仿刺参的 *ferritin* 与大部分无脊椎动物聚为一支。利用半定量 RT-PCR 检测, *ferritin* mRNA 在仿刺参未受精卵、受精卵、多细胞期、囊胚期、原肠期、小耳状幼体、中耳状幼体、大耳状幼体、樽型幼体、五触手幼体、稚参 11 个发育阶段和幼参的体壁、体腔细胞、肠道和呼吸树中均表达。Quantitative real-time PCR 结果显示, *ferritin* mRNA 在未受精卵至原肠期表达量低, 从小耳状幼体至稚参表达量显著增高; 在幼参的不同组织中, *ferritin* mRNA 在呼吸树中的表达量显著低于其他 3 种组织; 幼参注射 LPS 后, 4 种组织中 *ferritin* mRNA 表达量与注射前无显著差异。

关键词: 仿刺参; 铁蛋白 *ferritin* 基因; 序列分析; 基因表达; LPS 刺激

中图分类号: Q 786; S 917

文献标识码: A

在生物有机体中, 铁是细胞代谢所必需的微量元素之一, 氧的运输、DNA 复制、氮的固定、电子传递、光合作用和细胞增殖等代谢过程都与铁的功能密切相关^[1]。然而, 细胞中铁含量过高会导致蛋白、脂肪和 DNA 的氧化损害, 从而造成细胞损伤和死亡^[2]。因此, 生物体内铁平衡对维持细胞正常生长和代谢起着重要的作用。铁蛋白 (*ferritin*) 是广泛存在于动物、植物和微生物体内的一种铁储存和生物矿化蛋白, 它的表达调控在维持机体铁平衡中发挥着重要作用^[3-4]。铁蛋白可以储存机体中的过剩铁, 避免产生铁中毒, 并为含有铁元素蛋白质的合成提供铁原子。另一方面, 它可以防止铁氧化过程中所产生的自由基带来的伤害^[5-6]。此外, 铁蛋白也是细胞用来抵抗应激和炎症的一种蛋白, 在机体免疫中也起着一定的作用^[6-8]。

铁蛋白在进化中是相当保守的, 动物、植物和微生物中的 *ferritin* 样蛋白是从相同的祖基因 (*progenitor*) 进化而来^[9]。但其在表达调控机制上有显著的不同, 在哺乳动物中, 调节铁蛋白表达的典型体系是在转录后基于靶 mRNA 上铁调控蛋白 (*iron-regulatory proteins, IRP*) 和铁反应元件 (*iron-responsive element, IRE*) 相互作用的铁依赖性调节体制^[7]。当细胞内铁离子浓度较低时, *IRP/IRE* 结合, 阻止铁蛋白的翻译; 当铁离子浓度升高时, *IRP/IRE* 结合减少, 从而铁蛋白翻译增加来储存过量的铁。在植物和昆虫体内, *ferritin* 基因表达的调控主要发生在转录水平^[10-11]。

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 隶属于棘皮动物门 (*Echinodermata*), 海参纲 (*Holothuroidea*)。

收稿日期: 2010-01-04 修回日期: 2010-03-18

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30972272); 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A411); 国家海洋公益性行业科研专项 (200705007); 辽宁省科技计划 (2008203002)

通讯作者: 周遵春, Tel: 13009435316, E-mail: zunchunz@hotmail.com

棘皮动物属原始后口动物,无脊椎动物的最高等类群,处于由无脊椎动物向脊椎动物开始分支进化的阶段。因此,棘皮动物是研究基因家族进化的宝贵材料。仿刺参也是我国现有海参中最主要的经济种类,不仅营养价值高,而且药用价值广泛,已经发展成为我国北方地区重要的海水增殖品种。本文分析了仿刺参 *ferritin* 基因的全长 cDNA 序列,并与多种真核生物中的 *ferritin* 基因进行同源性比较,为研究该基因的进化和功能提供参考。研究 *ferritin* 基因在仿刺参胚胎发生、个体发育的不同阶段和幼参不同组织中的表达及其对细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 免疫刺激的应答,为进一步研究该基因在仿刺参体内的代谢生理机制及免疫机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用健康仿刺参种参和幼参捕获于大连广鹿岛海域,于辽宁省海洋水产科学研究院人工育苗池常规条件下暂养。育苗池水容量为 5 m³,暂养期间保持充气,所用海水为砂滤海水,水温 16~18 °C,盐度 32, pH 7.8。

1.2 方法

仿刺参 *ferritin* 基因序列分析 通过构建仿刺参 cDNA 文库^[12] 获得 *ferritin* 基因全长 cDNA 序列,将其翻译成氨基酸序列,利用 signalP 3.0 软件预测信号肽和可能的剪切位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、RNA structure 5.0 软件预测 mRNA 二级结构。用 NCBI 的 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对序列进行同源检索,取不同分类地位物种的 *ferritin* 氨基酸序列,用 ClustalX 1.83 软件与仿刺参 *ferritin* 氨基酸序列进行同源性比对分析,用 MEGA 3.1 构建种系发生树。

仿刺参产卵、授精和幼体培养 采用温差法刺激种参产卵,有产卵、排精迹象的种参(平均体重 336.0 g)分别置于不同产卵箱内,按比例将精子、卵子混合进行人工授精。将受精卵移入培育池进行孵化,幼体按常规条件培养(水温 20~21 °C、盐度 32、pH 7.8)。仿刺参胚胎发生和个体发育的不同阶段,包括未受精卵、受精卵、多细胞期、囊胚期(旋转囊胚,未脱膜)、原肠期、小耳状幼体、中耳状幼体、大耳状幼体、樽型幼体、五触手幼体和稚参

(体长 1 mm 左右),分别用 300 目筛绢收集于 1.5 mL 离心管内,短暂离心去除多余海水,投入液氮中迅速冷冻,于 -80 °C 冰箱保存备用。

LPS 刺激 健康仿刺参幼参(平均体重 10.2 g)饲养于水族箱内,2 d 之内不投放任何饵料,排空消化道内食物,注射浓度为 1 μg/μL 的 LPS (Sigma) 500 μL,16 h 后第二次注射,对照组注射 500 μL 过滤(0.22 μm 滤膜)海水,第二次注射 4 h 后用饱和 MgSO₄ 麻醉,过滤海水冲洗后取体壁、体腔细胞、肠道和呼吸树,各种组织分别取 3 个个体的混合样,直接用于 RNA 提取。

总 RNA 提取 用 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒 (Sangon) 提取仿刺参不同发育阶段和不同组织的总 RNA,电泳检测 RNA 的完整性。用 Implen NanoPhotometer 核酸蛋白分析仪(德国)检测 RNA 的纯度和浓度。

反转录 PCR (RT-PCR) 取每个样品的总 RNA 900 ng 用 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa) 进行反转录,反应体积及反应条件按照说明书进行。反转录后的产物稀释 30 倍后于 -80 °C 冰箱保存备用。

采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, Fer-F: 5'-CGATGATGTGCGCCCTTCC-3', Fer-R: 5'-AGCCGTGATGTCCTTGAGC-3', 扩增片段长度 133 bp,引物由大连 TaKaRa 生物公司合成。反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 终止反应。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色,用凝胶成像分析系统 (UVP BioImaging Systems) 检测。

实时荧光定量 PCR Quantitative real-time PCR 采用 SYBR Green I 染料法 (SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit II, TaKaRa), 在 Mx3000p™ 荧光定量 PCR 仪 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 上进行。反应终体积 20 μL, 包括 10 μL 2 × SYBR Green Master mix 缓冲液, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 1 μL cDNA 样品, 引物各 0.4 μmol/L, 引物序列同上。内参采用 *Cyt b* 基因, 引物序列分别为 CytF: 5'-TGAGCCGCAACAGTAATC-3', CytR: 5'-AAGG-GAAAAGGAAGTGAAAG-3'。反应条件: 95 °C, 30 s; 95 °C 25 s, 55 °C 25 s, 72 °C 25 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 *ferritin* mRNA 相对表达量。

数据分析 根据每个样品的 3 组平行实验

数据计算相对表达量均值和标准差。对实验结果进行显著性检验(t 检验),置信区间95%, $P < 0.05$ 认为是具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 仿刺参 *ferritin* 基因 cDNA 序列分析

从我们已经建立的仿刺参 cDNA 文库中得到的 *ferritin* cDNA 全长 792 bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF)长 522 bp, 编码 173 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 20 ku。5'-非翻译区(5'-untranslated region, UTR)长 133 bp, 3'-UTR 长

137 bp, 并在 PolyA 尾上游存在加尾信号“**AATAAA**”(图 1)。序列中存在着一个潜在的 N -糖基化位点“**N-Q-S**”(图 1)。利用 SignalP 3.0 软件分析, 在其 N 末端没有发现信号肽序列。

仿刺参 *ferritin* cDNA 的 5'-UTR 具有一个高度保守的 IRE, 负责基因的表达调控(图 2)。众多物种的 IRE 二级结构都有“**CAGUGN**”环和一个未配对的“**C**”, 成颈环状^[13], 本文利用 RNA structure 5.0 软件预测的仿刺参 *ferritin* mRNA 二级结构也具有上述特点(图 3)。

```

1  ggggactactacatacag gac aag acattt gtttggg ctttcgcagt gacgaaaccagac
61  aaacttgc cgc caaaatt ccaatcaaatattc tactctt cgtgtg atat tttcgc ccaaaa
121 aagaaacatcaag atgc agccaag ccaagt cgc ccagaact tccatg agttgt gtaggc
1  M Q P S Q V R Q N F H E L C E A
181 cggagtgaacaag caaat caactcggagttg tatgct tctacacct atcat tccat cgc
17  G V N K Q I N S E L Y A S Y T Y H S I A
241 ctttactttg accgcgat gatgt cgc cctt cct ggagcccaca agt actt caagaagca
37  F Y F D R D D V A L P G A H K Y F K K Q
301 gcttgagg aag aacgt gaacatgc cgagaaactg atg aagt ttcaga accagc gagg tgg
57  S E E E R E H A E K L M K F Q N Q R G G
361 tcg cgtga agc tcaaggacat cacggct ccagaa aag gaagaat ggg gcagc cctgct gga
77  R V K L K D I T A P E K E E W G S L L D
421 tgctttcaagg tgc cctt ggaact ggaaaag aag gtg aaccag agtc tgtt ggacct cca
97  A F K V A L E L E K K V N Q S L L D L H
481 cggcttggc ag actccaagaaggacgcgcag atg tgcgact tcatcg agacc cactac ct
117 G L A D S K K D A Q M C D F I E T H Y L
541 gacgg aac aggtgg agccat caaggag atc ggtgac cacat cccaat ctgaag cg cgt
137 T E Q V E A I K E I G D H I T N L K R V
601 cggcaccg gcc tgggcga att cat ctacgat aag gag aacct gaagg aggat taag accc
157 G T G L G E F I Y D K E N L K E D *
661 agacctcc ctccgatg ccgtg gaa cggc ggt act act tcc ttag gaa ag ataaaa aagaa
721 acatttt aaaa catttt c gaa aac aaaat ct agg cac c gat gaa aaa aaaaaaaa aaa
781 aaaaaaaaaaaa

```

图 1 仿刺参 *ferritin* cDNA 序列及推导出的氨基酸序列

下划线部分:5'-UTR 中的 IRE 序列; 阴影部分:潜在的 N -糖基化位点; 边框部分:加尾信号。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *ferritin* cDNA of *A. japonicus*

Underlined: IRE sequence; Shaded: potential N -glycosylation site; Framed: the polyadenylation signal.

```

仿刺参 (Apostichopus japonicus): TTGGGCTTTCGCAGTGACGAAACCAGACAAA
海参 (Holothuria glaberrima): TTGCGCTTTCGCAGTGACGAAACCAGACAAA
海星 (Asterias forbesi): TTGTGCGTTCGCAGTGTCGGAACCAAGCAAG
牡蛎 (Crassostrea gigas) GF1: TCTTGCTGCGTCAGTGAACGTACGGACAAA
文昌鱼 (Branchiostoma belcheri tsingtaunese): TACTGCTTCTTCAGTGTAAAGAACGTGACAGT
斑马鱼 (Danio rerio): ACCTGCTTCAACAGTGTGTTGAACGGCAACCG
人 FHC: TCCTGCTTCAACAGTGTGTTGAACGGAAACCG
家鼠 (Mus musculus) FHC: TCCTGCTTCAACAGTGTGTTGAACGGAAACCG
非洲爪蟾 (Xenopus tropicalis) FHC: -----CTTCAACAGTGTGTTGAACGGAAACCT

```

图 2 几个物种 IRE 序列的比对

Fig. 2 IREs alignment of several different species

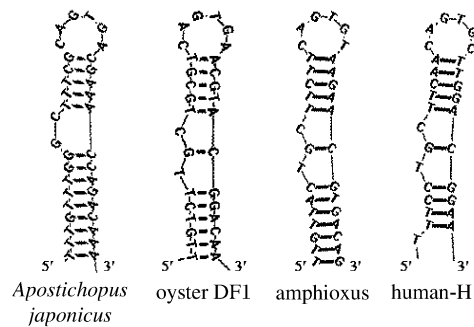


图3 几个物种 IRE 的二级结构预测

Fig. 3 Predicted IRE secondary structure of several different species

2.2 仿刺参 *ferritin* 氨基酸序列的同源性分析

采用 BLASTp 方法,将 *ferritin* 氨基酸序列在 GenBank 中进行同源性检索,发现该序列与海参 (*Holothuria glaberrima*) 的相似度最高,达 84%,与其它无脊椎动物如:海星 (*Asterias forbesi*)、鲍 (*Haliotis diversicolor*)、牡蛎 (*Crassostrea gigas*) GF1、牡蛎 GF2、海葵 (*Nematostella vectensis*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、小龙虾 (*Pacifastacus leniusculus*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的相似度分别为 74%、71%、71%、70%、69%、59%、57%、34%;较之脊椎动物,与 *ferritin* 重链 (*ferritin heavy chain*, FHC) 的同源性较高,如人 (*Homo sapiens*) 62%、鼠 (*Mus musculus*) 61%、斑马鱼 (*Danio rerio*) 64%、非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 60%,而与 *ferritin* 轻链 (*ferritin light chain*, FLC) 的

同源性较低,如人 53%、牛蛙 (*Rana catesbeian*) 53%、鼠 47%、非洲爪蟾 52%、马 (*Equus caballus*) 52%、猫 (*Felis catus*) 51%。系统进化分析表明:各种动物的 *ferritin* 主要分化成 3 个分支,首先是脊椎动物为一支,其中 FLC 聚集又成一小支;其次,仿刺参与大部分无脊椎动物为一支;最后,节肢动物和线虫为一支 (图 4)。

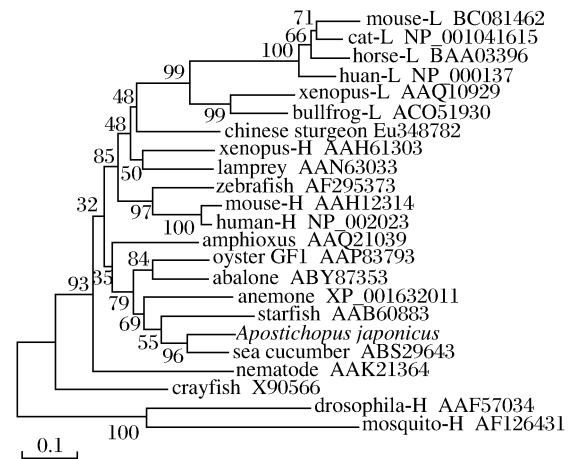


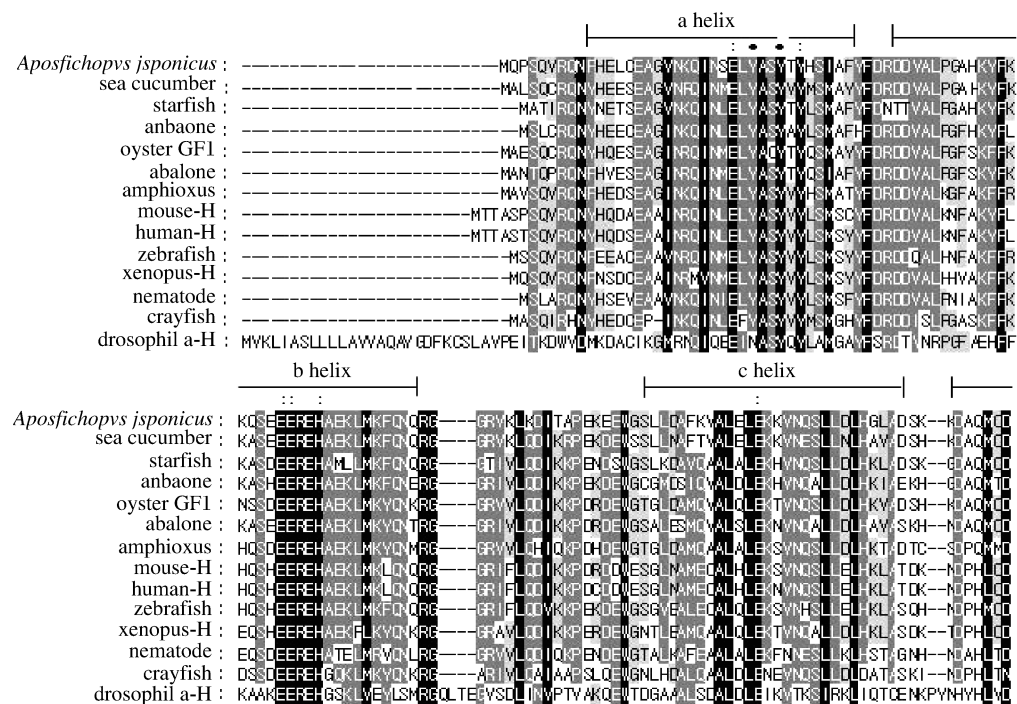
图4 Ferritin 系统进化树

L: *ferritin* 轻链 (FLC); H: *ferritin* 重链 (FHC)。

Fig. 4 Ferritin phylogenetic tree

L: *ferritin* light chain (FLC); H: *ferritin* heavy chain (FHC)。

将仿刺参 *ferritin* cDNA 编码的氨基酸序列与其它无脊椎动物和脊椎动物进行多序列比对 (图 5)。目前,已知在脊椎动物 FHC 发挥铁离子



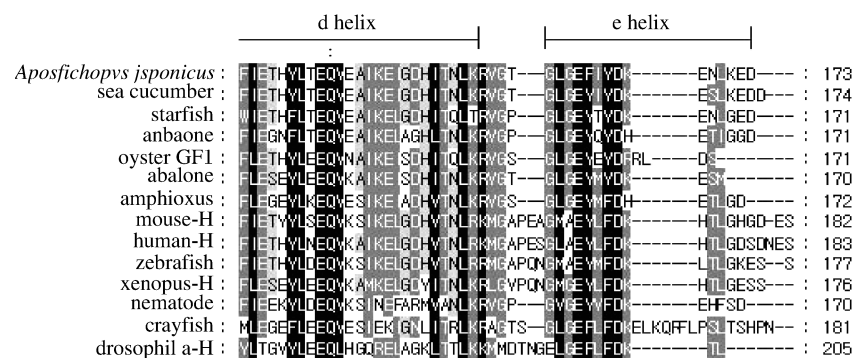


图5 仿刺参 ferritin 氨基酸序列与其它物种 ferritin 氨基酸序列的同源性比较

A~E:5个 α 螺旋序列;星号:7个与Fe结合位点相关的氨基酸残基;圆点:形成亚铁氧化酶中心氨基酸残基。

Fig.5 Alignment of the amino acids sequence of the *A. japonicus* ferritin with other ferritin sequences from animals

A-E:Five α helices; Asterisks;Seven residues associated with the iron binding site; Dots;The residues making up ferroxidase center.

存储功能主要靠亚铁氧化酶中心(ferroxidase center),它的二级结构为5个 α 螺旋^[14-15],由图5可见,仿刺参 ferritin 同样存在这样的保守结构。大多数脊椎动物 FHC 都具有7个保守的氨基酸残基,这些氨基酸残基是亚铁氧化酶中心的铁离子结合位点,研究表明,其中E63和H66(以人的FHC氨基酸序列为准)参与了多晶核Fe复合物的形成,Y35与另外两个酪氨酸Y30、Y33(以人的FHC氨基酸序列为准)形成了亚铁氧化酶中心^[16-17]。在仿刺参中,上述这些氨基酸残基均是完全一致的(图5)。

2.3 仿刺参 ferritin 基因表达情况检测

ferritin mRNA 在仿刺参未受精卵到稚参11个发育阶段和幼参的肠道、体腔细胞、呼吸树和体

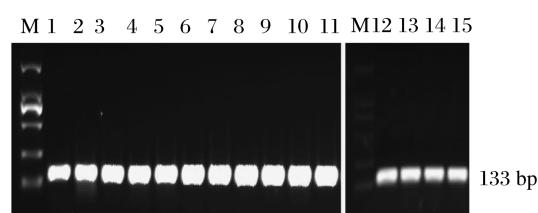


图6 仿刺参不同发育时期和不同组织中 ferritin 表达情况

M:DL2000 Marker(TaKaRa); 1:未受精卵; 2:受精卵; 3:多细胞期; 4:囊胚期; 5:原肠期; 6:小耳状幼体; 7:中耳状幼体; 8:大耳状幼体; 9:樽型幼体; 10:五触手幼体; 11:稚参; 12:肠道; 13:体腔细胞; 14:呼吸树; 15:体壁。

Fig.6 RT-PCR analysis of ferritin expression in different development stages and different tissues

M:DL2000 Marker(TaKaRa); 1:Unfertilized egg; 2:Fertilized egg; 3:Cellulose stages; 4:Blastula; 5:Gastrula; 6:Early auricularia; 7:Auricularia; 8:Late auricularia; 9:Doliolaria; 10:Pentactula; 11:Juvenile; 12:Intestine; 13:Coelomocyte; 14:Respiratory tree; 15:Body wall.

壁4种组织中的表达情况如图6所示。以各发育时期和不同组织的cDNA为模板,以FerF/FerR为引物,均扩增出133bp特异条带,说明ferritin基因在仿刺参胚胎发生和幼体发育各个阶段和幼参不同组织中均有表达。

选择Cyt b基因作参照,利用Quantitative real-time PCR方法检测ferritin基因在仿刺参不同发育阶段和不同组织中的相对表达量。如图7所示,ferritin mRNA在未受精卵至原肠期表达量低,从小耳状幼体至稚参表达量显著增高($P < 0.05$)。在幼参的不同组织中,ferritin mRNA在呼吸树中的表达量显著低于其他3种组织($P < 0.05$);幼参注射LPS后,4种组织中ferritin mRNA表达量与注射前无显著差异(图8)。

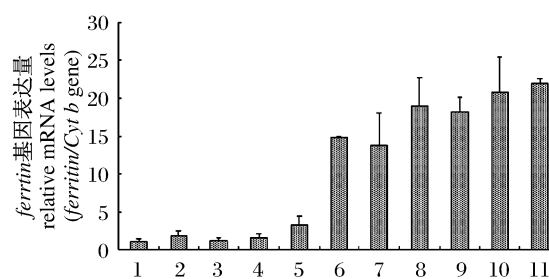


图7 仿刺参不同发育时期 ferritin mRNA 表达量

1:未受精卵; 2:受精卵; 3:多细胞期; 4:囊胚期; 5:原肠期; 6:小耳状幼体; 7:中耳状幼体; 8:大耳状幼体; 9:樽型幼体; 10:五触手幼体; 11:稚参。

Fig.7 Relative mRNA levels of ferritin at different development stages

1:Unfertilized egg; 2:Fertilized egg; 3:Cellulose stages; 4:Blastula; 5:Gastrula; 6:Early auricularia; 7:Auricularia; 8:Late auricularia; 9:Doliolaria; 10:Pentactula; 11:Juvenile.

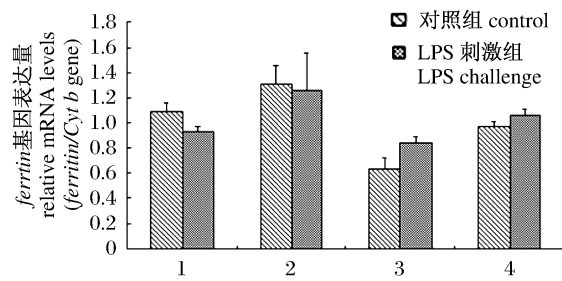


图8 *Ferritin* mRNA 在幼参不同发育时期和 LPS 刺激后表达情况

1: 肠道; 2: 体腔细胞; 3: 呼吸树; 4: 体壁。

Fig. 8 Relative mRNA levels of *ferritin* in different tissues and after LPS challenge

1: Intestine; 2: Coelomocyte; 3: Respiratory tree; 4: Body wall.

3 讨论

本研究从构建的仿刺参 cDNA 文库中获得 *ferritin* 基因全长 cDNA 序列。同源性分析表明仿刺参 *ferritin* 与脊椎动物 *ferritin* 重链亚基 (FHC) 更为相似,因为它具有亚铁氧化酶中心以及用于结合铁离子的 7 保守氨基酸残基等,而 *ferritin* 轻链亚基 (FLC) 并不具备这些特点,此外仿刺参 *ferritin* 与牡蛎、文昌鱼、人等的 FHC 还具有较高的同源性。在仿刺参 *ferritin* 的氨基酸序列中,我们没有发现信号肽,因此推测仿刺参 *ferritin* 属于胞质型铁蛋白,这一点与昆虫不同^[18-19]。

与众多物种一样,在仿刺参 *ferritin* cDNA 5'-UTR 中出现了高度保守的 IRE。IRE 中的颈环结构是铁离子调节蛋白 (IRP) 的结合位点,因此,这预示着仿刺参 *ferritin* 的表达可能是通过铁离子在翻译水平上受到调控的。

β -肌动蛋白 (β -actin) 是最广泛使用的内参基因之一。我们采用半定量 RT-PCR 方法分析发现 β -actin 基因在从受精卵到稚参的一些发育阶段中的表达水平有显著差异。相关研究也表明 β -actin 基因在棘皮动物海胆的未受精卵到长腕幼体 17 个发育阶段中的表达水平也有显著差异^[20]。近年来,细胞色素 b (cytochrome b, Cyt b) 基因也被用作海参基因表达研究中的内参基因。Ramírez-Gómez 等^[21]报道 Cyt b 基因在 LPS 刺激前后的海参 (*Holothuria glaberrima*) 体腔细胞中稳定表达,作为内参研究免疫基因的表达情况。Rojas-Cartagena 等^[22]报道 Cyt b 基因在海参肠再生过程中稳定表达,并作为内参研究海参肠再生

相关基因的表达情况。我们采用半定量 RT-PCR 方法分析了仿刺参 Cyt b 基因的表达情况,结果表明 Cyt b 基因在仿刺参不同发育时期和不同组织中及 LPS 刺激前后表达稳定^[23], Quantitative real-time PCR 分析结果也表明 Cyt b 基因能够稳定表达。因此,本研究采用 Cyt b 基因作为内参基因研究 *ferritin* mRNA 的表达情况。

ferritin mRNA 在仿刺参的胚胎发生和个体发育的各个阶段及幼体不同组织中均有表达。在其它水生动物中, *ferritin* mRNA 也具有广泛的组织表达分布。如罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的血淋巴、肌肉、中肠腺、心脏、精巢和卵巢中都检测到 *ferritin* mRNA 的表达,并在中肠腺中表达量最高^[10]。在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的研究中也发现, *ferritin* mRNA 在血淋巴、中肠腺、脑神经节、鳃、腹神经节、眼柄、肌肉、胸神经节、心脏均有表达,在血淋巴中表达量最高^[24]。在双壳类动物——合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 的外套膜、消化道、鳃、肌肉中 *ferritin* mRNA 都有表达,其中,在外套膜、消化腺和肌肉中的 *ferritin* mRNA 含量比较高^[25]。本研究发现, *ferritin* mRNA 在仿刺参胚胎发生、个体发育的各个阶段和幼参的肠道、体腔细胞、呼吸树和体壁中均有表达。在呼吸树中的表达量低,可能是由于呼吸树在仿刺参机体内主要功能是进行气体交换,完成呼吸作用,不是存储铁的主要器官。在仿刺参未受精卵、受精卵、多细胞期、囊胚期和原肠期, *ferritin* mRNA 表达量低,从小耳状幼体开始表达量显著增高,可能是由于从小耳状幼体开始,消化道从原肠期简单的直管状开始出现明显的器官分化,并已开始正常摄食,从这个阶段开始铁蛋白大量表达来维持机体的正常生长和代谢。

近年来,人们已不再局限于 *ferritin* 对铁调节的研究,转而更侧重于免疫防御功能上的研究。在无脊椎动物鲎^[26]、牡蛎^[27]和海星^[16]的研究中发现, LPS 刺激后 *ferritin* mRNA 表达量增高。Levy 等^[28]报道细菌感染和 LPS 注射后,果蝇体内 *ferritin* 的表达上调。但在海参的研究中发现,体腔细胞中 *ferritin* mRNA 的表达量不受 LPS 刺激的影响^[21]。本研究 Quantitative real-time PCR 结果显示,在幼参的肠道、体腔细胞、呼吸树和体壁中 *ferritin* mRNA 在 LPS 刺激前后的表达量无显著差异,可能在海参体内 *ferritin* 基因表达的调

控发生在转录后水平。

参考文献:

- [1] Thomas A M, Rogers J T, Leedman P J. Iron regulatory, iron-responsive and *ferritin* mRNA translation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31 (10):1139-1152.
- [2] Reif D W. Ferritin as a source of iron for oxidative damage [J]. *Free Radic Biol Med*, 1992, 12 (5): 417-427.
- [3] Wang D, Kim B Y, Lee K S, *et al.* Molecular characterization of iron binding proteins, transferrin and ferritin heavy chain subunit, from the bumblebee *Bombus ignitus* [J]. *Comp Biochem Physiol. Part B, Biochem Mol Biol*, 2009, 152(1):20-27.
- [4] Chasteen N D, Harrison P M. Mineralization in ferritin; an efficient means of iron storage [J]. *J Struct Biol*, 1999, 126(3):182-194.
- [5] Aust S D. Ferritin as a source of iron and protection from iron induced toxicities [J]. *Toxicol Lett*, 1995, 82-83:941-944.
- [6] Li M, Saren G, Zhang S C. Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*; Evidence for its dual role in immune response and iron metabolism [J]. *Comp Biochem Physiol. Part B, Biochem Mol Biol*, 2008, 150(3):263-270.
- [7] Torti F M, Torti S V. Regulation of ferritin genes and protein [J]. *Blood*, 2002, 99(10):3505-3516.
- [8] Li M, Saren G, Zhang S C. Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*; Evidence for its dual role in immune response and iron metabolism [J]. *Comp Biochem Physiol. Part B, Biochem Mol Biol*, 2008, 150(3):263-270.
- [9] Pagland M, Briat J F, Gagnon J, *et al.* Evidence for conservation of ferritin sequence among plants and animals and for a transit peptide in soybean [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(30):18339-18344.
- [10] 郑亮. 外源 Fe^{3+} 诱导罗氏沼虾铁蛋白 mRNA 的表达 [J]. *海洋渔业*, 2007, 29(4):307-303.
- [11] Proudhon D, Wei J, Briat J F, *et al.* Ferritin gene organization; different between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints [J]. *J Mol Evol*, 1996, 42(3):325-336.
- [12] Yang A F, Zhou Z C, He C B, *et al.* Analysis of expressed sequence tags from body wall, intestine and respiratory tree of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 296 (3-4): 193-199.
- [13] Henderson B R, Menotti E, Bonnard C, *et al.* Optimal sequence and structure of iron-responsive elements. Selection of RNA stem-loops with high affinity for iron regulatory factor [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (26):17481-17489.
- [14] Theil E. Ferritin; structure gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganisms [J]. *Ann Rev Biochem*, 1987, 56:289-315.
- [15] Andrews S C, Arosio P, Bottke W, *et al.* Structure function and evolution of ferritins [J]. *J Inorg Biochem*, 1992, 47(3-4):161-174.
- [16] Beck G, Ellis T W, Habicht G S, *et al.* Evolution of the acute phase response; iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26(1):11-26.
- [17] Hempstead P D, Yewdall S J, Fernie A R, *et al.* Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution [J]. *J Mol Biol*, 1997, 268(2):424-448.
- [18] Levi S, Corsi B, Bosisio M, *et al.* A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene [J]. *J Biol Chem*, 2001, 270(27):24437-24440.
- [19] Nichol H, Law J H, Winzerling J J. Iron metabolism in insects [J]. *Annu Rev Entomol*, 2002, 47: 535-559.
- [20] Shah M, Brown K M, Smith L C. The gene encoding the sea urchin complement protein, SpC3, is expressed in embryos and can be upregulated by bacteria [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(6-7):529-538.
- [21] Ramírez-Gómez F, Ortíz-Pineda P A, Rojas-Cartagena C, *et al.* Immune-related genes associated with intestinal tissue in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* [J]. *Immunogenetics*, 2008, 60(1):57-71.
- [22] Rojas-Cartagena C, Ortíz-Pineda P, Ramírez-Gómez F, *et al.* Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 31(2):203-215.
- [23] 杨爱馥, 周遵春, 董颖, 等. 仿刺参 *Cyt b* 和 β -actin 基因表达稳定性比较 [J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12 (1):79-84.
- [24] Hsieh S L, Chiu Y C, Kuo C M. Molecular cloning and tissue distribution of ferritin in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 21(3):279-283.

- [25] Zhang Y, Meng Q, Jiang T, *et al.* A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *Comp Biochem Physiol, Part B, Biochem Mol Biol*, 2003, 135(1):43–54.
- [26] Ong D S T, Wang L, Zhu Y, *et al.* The response of ferritin to LPS and acute phase of *Pseudomonas* infection [J]. *J Endotoxin Res*, 2005, 11(5):267–280.
- [27] Gueguen Y, Cadoret J P, Flament D, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Gene*, 2003, 303:139–145.
- [28] Levy F, Rabel D, Charlet M, *et al.* Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila* [J]. *Molecular Cellular Proteomics*, 2004, 3(2):156–166.

Sequence analysis and expression pattern of *ferritin* gene in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

YANG Ai-fu, ZHOU Zun-chun*, SUN Da-peng, DONG Ying, JIANG Bei, WANG Xiao-yu,
CHEN Zhong, GUAN Xiao-yan, WANG Bai

(*Liaoning Key Lab of Marine Fishery Molecular Biology, Liaoning Ocean and Fisheries
Science Research Institute, Dalian 116023, China*)

Abstract: Ferritin is widely distributed throughout the plant and animal kingdoms in a highly conserved conformation, which plays a key role in cellular iron metabolism including iron storage and detoxification. Vertebrate ferritin has been indirectly linked to innate immune response since their synthesis is regulated by proinflammatory cytokines. In invertebrate, ferritin has also been shown to be relevant to innate immune defense via iron-withholding strategy because it can be elevated by LPS challenge. To be better understand the sequences information and do further research on the function of ferritin, the cDNA sequence is characterized and the gene expression pattern is profiled. In this study, a full-length ferritin cDNA sequence was obtained by constructing cDNA libraries of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), which was 792 bp long, and includes a 133 bp long 5'-untranslated region (UTR), ORF encoding 173 amino acids, and a 137 bp long 3'-UTR; the molecular weight predicted was 20 ku. The 5'-UTR contains a highly conserved iron responsive element (IRE) sequence. The amino acids have a conserved motif for ferroxidase center typical of heavy chains of vertebrate ferritins. Sequence comparison showed that it reached the highest similarities of 84% with sea cucumber *Holothuria glaberrima* and shared more identity to H-chains of vertebrate ferritins than to the L-chains. It also shared 74%–34% identity with invertebrate ferritins compared with sea star, abalone, oyster, sea anemone, nematode, crayfish and drosophila. Phylogenetic analysis revealed the *A. japonicus* ferritin was grouped together with the invertebrate ferritin cluster. The *ferritin* mRNA were identified by using RT-PCR at development stages of sea cucumber including unfertilized egg, fertilized egg, cellulous stages, blastula, gastrula, early auricularia, auricularia, late auricularia, doliolaria, pentactula, juvenile and in different tissues of young sea cucumbers including intestines, coelomocytes, respiratory trees and body walls. Quantitative real-time PCR results showed that *ferritin* messages were low in unfertilized eggs through gastrula, however, a pronounced increase in transcript levels was observed from early auricularia to juvenile; The lowest expression level was found in the respiratory trees of young sea cucumbers; Moreover, *ferritin* mRNA showed no significant changes in expression after a LPS challenge in the four tissues of young sea cucumbers. This result suggests that *ferritin* expression might be regulated posttranscriptionally in sea cucumber.

Key words: sea cucumber (*Apostichopus japonicus*); *ferritin*; sequence analysis; gene expression; LPS challenge

Corresponding author: ZHOU Zun-chun. E-mail: zunchunz@hotmail.com