

# 微小牛蜱铁蛋白编码基因的克隆和分析

白霞<sup>1,2</sup>, 周金林<sup>1\*</sup>, 程天印<sup>2</sup>, 周勇志<sup>1</sup>, 刘毅<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所, 上海 200232; 2. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128)

**摘要:** 从微小牛蜱克隆到 1 个新的铁蛋白编码基因, cDNA 全长 642bp, 编码区为 123-639bp, 编码 172 个氨基酸残基, 该蛋白预测的分子量为 19.9ku, 等电点为 4.24。经过分析, 其预测氨基酸序列与已报道的变异革蜱、非洲钝缘蜱和蓖子硬蜱铁蛋白同源性分别为 93.60%、88.37% 和 83.72%。且核苷酸序列在 mRNA 5' 未翻译区(5' UTR) 的茎环结构存在铁应答元件(IRE), 其氨基酸序列上带有典型的亚铁氧化酶中心结构的保守序列。RT-PCR 分析表明, 该基因在微小牛蜱卵、幼蜱、半饱血雌蜱、饱血雌蜱和雄蜱这几个阶段均有表达。

**关键词:** 微小牛蜱; 铁蛋白; cDNA 克隆; RT-PCR

中图分类号: S858.232.74<sup>6</sup>; Q785

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)01-0066-04

微小牛蜱(*Boophilus microplus*) 是兽医上常见的体外寄生虫, 是传播牛疾病最多的一种蜱, 可传播牛巴贝斯虫病、牛双芽巴贝斯虫病和牛边缘虫病等, 给热带和亚热带畜牧业造成了巨大的经济损失。由于蜱抗药性的出现、食品安全和环境污染等问题, 目前的药物控制已显现出它严重的局限性, 迫切需要寻找新的防制策略<sup>[1]</sup>。许多研究表明, 蜱之所以能够稳定持续吸血并且能传播众多病原体, 与蜱体内众多的生物活性分子密切相关<sup>[2]</sup>。因此蜱功能分子的研究, 对于寻找蜱及蜱传播疾病控制新技术具有重要价值。

铁蛋白(Ferritin) 是普遍存在于生物体内的一种保守性较高的多功能多亚基的生物蛋白, 其作用是贮存铁和对生物体内铁含量进行调控, 因此在生物体内铁含量过多时起到解毒的作用<sup>[3]</sup>。蜱以吸血为生, 宿主红细胞中含有大量的铁, 据研究, 蜱是利用铁蛋白及其相关蛋白功能来处理大量的铁以消除对自身的毒性<sup>[4]</sup>。因此铁蛋白是蜱体内 1 种十分重要的功能分子, 本研究对微小牛蜱 1 个铁蛋白编码基因进行克隆、测序和分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 蜱

微小牛蜱采自安徽凤阳黄牛, 经实验室鉴定后,

兔体人工饲养<sup>[5]</sup>。

### 1.2 质粒和菌种

*E. coli* DH-5 $\alpha$  菌株为本单位重点实验室提供。

### 1.3 试剂

TRIZOL 试剂、pGEM-T easy 载体是 Promega 公司产品; DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司; *Taq* DNA 聚合酶购自 BioStar 公司; 3'-RACE 试剂盒由 Invitrogen 公司生产; 质粒 DNA 提取试剂盒购于赛百盛公司。

### 1.4 微小牛蜱半饱血雌蜱总 RNA 的分离及 cDNA 的合成

取兔体人工饲养的半饱血雌蜱, 在液氮中充分研磨, 加 TRIZOL 试剂, 匀浆, 按 TRIZOL 试剂说明书分离总 RNA; 紫外分光光度计测浓度; 取 1  $\mu$ g RNA 按 3'-RACE 试剂盒反转录得 cDNA 第 1 链。

### 1.5 引物设计及 PCR 扩增目的基因

根据已报道的其它蜱种铁蛋白基因 5' 非翻译区保守的铁蛋白应答元件 IRE 核苷酸序列, 设计上游外引物和内引物; 根据铁蛋白 C 端保守氨基酸序列 FD-KETLSD, 结合微小牛蜱密码子使用偏好, 设计内引物下游<sup>[6]</sup>。由赛百盛公司合成。设计的内外 2 套 PCR 扩增特异性引物如下: 外引物, 上游: 5'-GTTTTGCTTCAACAGTGATTGAACGAG-3', 下游: 5'-AGGGTCTCCTTGTCAAAACAT-3'; 内引物, 上游: 5'-GATTGAACGAGCATCGCCAAACG-3', 下游: 5'-AGGGTCTCCTTGTCAAAACAT-3'。

以微小牛蜱半饱血雌蜱 cDNA 为模板, 用 *Taq* DNA 聚合酶、外引物等进行第 1 次 PCR 扩增。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

收稿日期: 2003-11-06

基金项目: 科技部基础研究重大项目前期研究专项(2001CCA00900)

作者简介: 白霞(1978-), 女, 湖南华容人, 硕士, 研究方向为寄生虫分子生物学

\* 通讯作者: 周金林, Tel: 021-54083188; Fax: 021-54081818; E-mail: zjlzc@online.sh.cn

然后以第 1 次 PCR 产物为模板,用内引物 Nested-PCR 方法扩增目的片段。反应条件为:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 40 s,53 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 7 min。

### 1.6 目的基因的克隆和测序

上述 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段;连接到 pGEM-T easy 载体上,转化 DH-5 $\alpha$ ;蓝白斑筛选阳性克隆,热裂解粗提质粒,基因特异性引物 PCR 鉴定;挑取阳性克隆送测序;所得序列进行 Blast 分析,并用 Gentyx-MAC 软件对该基因的开放阅读框、保守性氨基酸进行分析。

### 1.7 微小牛蜱铁蛋白基因不同发育阶段的表达分析

为了判断铁蛋白在微小牛蜱不同发育阶段的表达情况,从微小牛蜱卵、幼蜱、饱血雌蜱和雄蜱分别提取 RNA,以 1  $\mu$ g 总 RNA 反转录合成相应的第 1 链 cDNA。分别以微小牛蜱这几个阶段的等量 cDNA 为模板,用铁蛋白重组质粒作为阳性对照,用兔白细胞总 RNA 的反转录产物作为阴性对照,并设计铁蛋白基因特异性引物进行 RT-PCR 扩增,取 8  $\mu$ L PCR 产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果,分析铁蛋白基因在这几个阶段的表达情况。扩增引

物为:上游 5'-GAATTCATGGCCGCTACTCAGCCC-3',下游 5'-AAGCTTGTGCGATAGGGTCTCCTTGTCAAACAT-3'。反应条件为:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 7 min。

## 2 结 果

### 2.1 铁蛋白的克隆和测序

第 1 次 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,没有检测到目的条带。以第 1 次 PCR 产物为模板,经套式 PCR 扩增,可获得大小为 600 bp 左右的特异片段。回收后,成功连接到 pGEM-T easy 载体,并转化到 *E. coli* DH-5 $\alpha$ 。

经测序,表明克隆的基因序列全长 642 bp(见图 1),编码区为 123-639 bp,编码 172 个氨基酸残基,该蛋白预测的分子量为 19.9 ku,等电点为 4.24。将微小牛蜱铁蛋白新基因登录 GenBank,序列号为 AY307447。在其 mRNA 5' 未翻译区(5' UTR)的茎环结构存在铁应答元件(IRE):TTTTGCTTCAACAGTGATTGAACGAGC,位置在第 2-28 个碱基处,这在已报道其它蜱种的铁蛋白基因序列上同样存在。

```

1  gttttgcttc aacagtgatt gaacgaacat ccccaaacgt gctctctctc tcttccgac ctttctcgct aaattaatct
   .....
81  tgaagtacag tttagatgcc cgtccgcaa gcagccgaag aagatggccg caactcagcc ccgtcagaac taccatgtcg
   M R A T Q P R Q N Y H V D
161 attgcgaagc ccgcatcaac aagcagatca acttgyaact ctacgcgagc tacgtctaca catcaatggc ctactacttc
   C E A R I N K Q I N L E L Y A S Y V Y T S M A Y Y F
241 gatcgcgatg atgtggcact gccgggattc cacaagtctc tcaagaagag cagcgtgagc gagcgtgagc atgccagaa
   D R D D V A L P G F H K F F K K S S D E E R E H A Q K
321 gctgatgaag tatcaaaaca tgcgcggagc gccgctgtgt ctgcaggcga tacagaagcc atcgcgggac gaatggggcg
   L M K Y Q N M R G G R V V L Q A I Q K P S R D E W G A
401 caggcttgya cgccatgcag gctgcacttg agctggagaa gactgtcaac cagtcactgc tggacttgca caagctygca
   G L D A M Q A A L E L E K T V N Q S L L D L H K L A
481 aacgatcata ataacgctca gctgtgcgac ttcctggaaa gcgagtacct ggaagagcag gtgaaggcta tcaaggagct
   N D H N N A Q L C D F L E S E Y L E E Q V K A I K E L
561 gtctgactac gtgaccaacc tgaagcgtgt tggccctggc ctcggagagt acatgtttta caagagacc ctatcagact
   S D Y V T N L K R V G P G L G E Y M F D K E T L S D *
641 ga 642

```

图 1 铁蛋白基因 cDNA 和编码的氨基酸序列

Fig. 1 Ferritin gene from *Boophilus microplus*-cDNA and deduced amino-acid sequence.

虚线部分-铁应答元件(IRE),划线部分-设计 PCR 引物参照序列

The broken line indicates the putative iron responsive element(IRE) in 5' UTR. The underline indicates the nucleotides used for PCR amplification

### 2.2 铁蛋白序列的同源性分析

从 GenBank 选取 5 个不同物种的铁蛋白编码基因序列,进行同源性比较。如图 2 所示,微小牛蜱铁蛋白在其编码区有 64 个氨基酸保守性最高。从

这几个物种的铁蛋白序列可推测,微小牛蜱铁蛋白在推导氨基酸序列上同样存在典型的亚铁氧化酶中心结构的保守序列,分别在其第 25、30、59、60、62、105 和 139 个氨基酸处。微小牛蜱铁蛋白同相近物

种变异革蜱、非洲钝缘蜱和蓖子硬蜱同源性相对较高,分别达 93.60%、88.37% 和 83.72%。其它物种

中,和椎实螺蜗牛同源性最高,达到 77.46%,但同昆虫类如果蝇铁蛋白的同源性最低,仅为 41.18%。

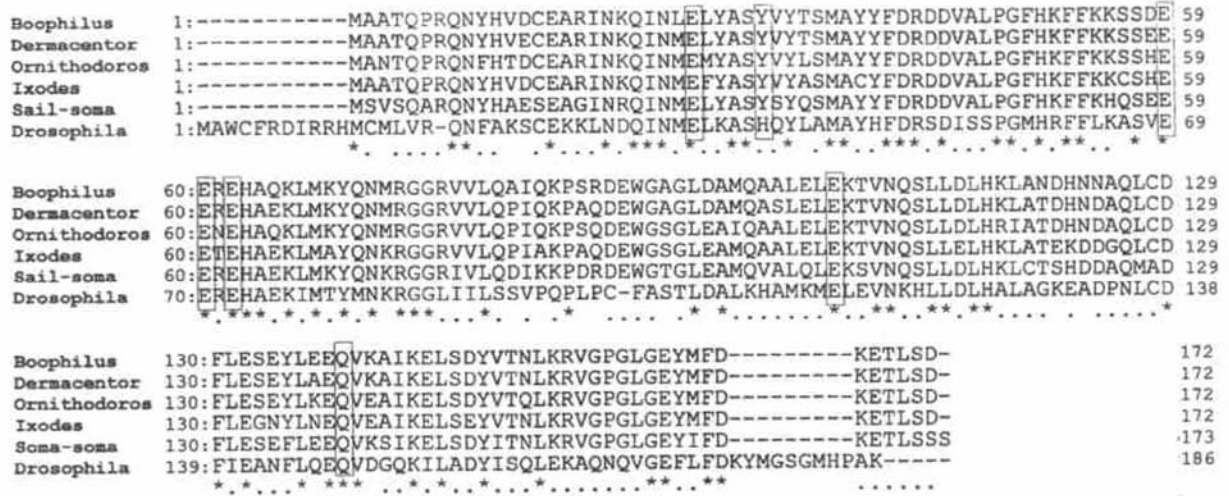


图 2 微小牛蜱铁蛋白同其它物种铁蛋白的同源性分析

Fig. 2 Multiple sequence alignment of *B. microplus* ferritin tick ferritins with ferritins from different species

Boophilus-微小牛蜱(本试验), Dermacentor-变异革蜱, Ornithodoros-蓖子硬蜱, Ixodes-非洲钝缘蜱, Sail-soma-椎实螺蜗牛, Drosophila-果蝇。加框部分-亚铁氧化酶中心结构的保守序列。“\*”-氨基酸高度保守的位置  
Boophilus-*Boophilus microplus* used in this work; Dermacentor-American dog tick *Dermacentor variabilis* (AF467696); Ornithodoros-soft tick *Ornithodoros moubata* (AF0682255); Ixodes-castor bean tick *Ixodes ricinus* (AF068224); Sail-soma-great pond snail soma ferritin *Lymnaea stagnalis* (von Darl et al, 2003); Drosophila-fruit fly *Drosophila melanogaster* (AE003491); The frames indicate conserved residues of ferroxidase center in vertebrate heavy chain ferritins. The asterisks indicate highly conserved residues of these ferritins. The points indicate the parts of different amino acids

2.3 铁蛋白基因在不同发育阶段的表达情况

以微小牛蜱卵、幼蜱、饱血雌蜱和雄蜱 cDNA 为模板,均能不同程度地扩增出大小为 500bp 左右的特异条带(如图 3 所示,分别在泳道 1、2、4、5),与阳性对照(重组阳性质粒为模板,泳道 3)大小一致,而兔白细胞 cDNA(泳道 6)在预期位置没有扩增条

带。说明铁蛋白基因在微小牛蜱这几个阶段均有表达,且反应出不同发育阶段的表达差异,推测铁蛋白在微小牛蜱不同发育阶段有不同的生物学功能。

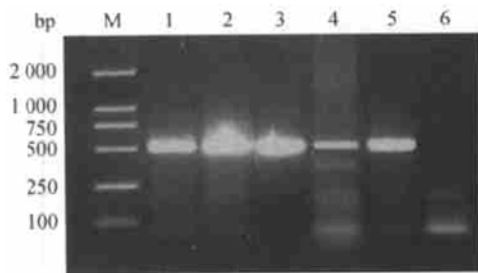


图 3 铁蛋白基因在微小牛蜱不同发育阶段的表达情况

Fig. 3 RT-PCR analysis of *B. microplus* ferritin cDNA

M. Marker DNA 标准分子质量;  
1、2、4、5、6. 微小牛蜱卵、幼蜱、饱血雌蜱、雄蜱、兔白细胞的 cDNA; 3. 重组质粒 DNA  
M. DNA markers; 1, 2, 4, 5, 6. cDNA of eggs, larvae, engorgement female adult, male adult ticks, rabbit leukocytes; 3. recombinant plasmid DNA

3 讨论

本次研究成功地从微小牛蜱体内分离到一个新的铁蛋白编码基因。该基因 cDNA 序列在 mRNA 5' 未翻译区(5' UTR)的茎环结构存在铁应答元件(IRE),其氨基酸序列带有典型的亚铁氧化酶中心结构的保守序列。经同源性分析,与已报道的其它蜱种的铁蛋白同源性最高,特别是变异革蜱铁蛋白同源性为 93.60%。根据以上序列分析,鉴定为微小牛蜱铁蛋白编码基因。通过 RT-PCR 得知,在蜱各时期均有铁蛋白基因表达,可推测铁蛋白在微小牛蜱这几个时期的生命活动中起了很重要的作用。而在宿主兔白细胞没有扩增到,排除了蜱铁蛋白基因受污染的可能性。

铁蛋白基因编码 2 种类型亚基,即 H-亚基(氧化酶活性位点)和 L-亚基(氧化酶非活性位点),它们在贮存铁和调节铁分布中起重要作用<sup>[7]</sup>。微小

牛蜱铁蛋白序列上有典型的亚铁氧化酶活性中心的保守序列,这些典型的保守序列在脊椎动物铁蛋白 H-亚基序列上同样存在,与无脊椎动物如椎实螺蜗牛铁蛋白 H-亚基也有较高同源性,因此我们所得最有可能是铁蛋白 H-亚基编码基因,而 L-亚基是否存在于蜱体内还未知晓。

蜱有一种独特的消化过程来处理血液中的铁,血红蛋白被消化后,它们体内缺乏分泌组织来处理这些铁。微小牛蜱是少数几种缺少生物合成亚铁血红素途径的真核动物之一,它们可能吸收消化细胞中的亚铁血红素,通过血液循环到达各组织<sup>[8,9]</sup>。本试验研究发现,蜱铁蛋白与在大多昆虫体内发现的铁蛋白不同,其氨基酸序列上没有分泌用的信号肽序列。蜱铁蛋白很可能存在于细胞溶质中,当外界大量的铁和血红蛋白被蜱消化吸收后,到达各组织器官的细胞中,铁蛋白对过多的铁进行贮存和调控,使其维持在生理水平,起到解毒作用。

可以推测,铁蛋白在蜱体内起着很重要的作用,它的研究必然有助于我们寻求新的防制蜱及蜱传疾病的策略。本试验克隆到微小牛蜱铁蛋白编码基因,这一结果将为运用 RNA 干扰技术等手段深入研究铁蛋白的生物学功能打下基础。同时,该基因的成功表达,也为下一步制备特异性抗体进行相关免疫学研究提供必要条件。

#### 参考文献:

[1] Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vac-

cine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens[J]. *Microbes Infect*, 2000, 2: 1353~ 1361.

[2] Gwakisa P, Yoshihara K, Long To T, et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells [J]. *Vet Parasitol*, 2001, 99: 53~ 61.

[3] Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(4): 457~ 463.

[4] Briegel H. Protein catabolism and nitrogen partitioning during oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *J Insect Physiol*, 1986, 32: 455~ 462.

[5] 周勇志,周金林,曹 杰,等. 4种硬蜱的实验室人工饲养和部分生物学特性的观察[J]. *中国兽医寄生虫病*, 2003, 11(2): 39~ 40.

[6] Kopacek P, Zdychova J, Yoshiga T, et al. Molecular cloning, expression and isolation of ferritins from two tick species—*Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(1): 103~ 113.

[7] Kato J, Niitsu Y. Recent advance in molecular iron metabolism: translational disorders of ferritin [J]. *Int J Hematol*, 2002, 76(3): 208~ 12.

[8] Pham D Q, Winzerling J J, Dodson M S, et al. Transcriptional control is relevant in the modulation of mosquito ferritin synthesis by iron [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 266: 236~ 240.

[9] Nichol H, Law J H, Winzerling J J. Iron metabolism in insects [J]. *Annu Rev Entomol*, 2002, 47: 535~ 559.

### Molecular Cloning and Analysis of Ferritin of *Boophilus Microplus*

BAI Xia<sup>1,2</sup>, ZHOU Jir-lin<sup>1\*</sup>, CHENG Tiar-yin<sup>2</sup>, ZHOU Yong-zhi<sup>1</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>

(1. Shanghai Institute of Animal Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232; 2. Department of Animal Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

**Abstract:** A gene encoding ferritin was isolated and cloned from *B. microplus*. The cDNA is composed of 642 nucleotides and encoding 172 amino acid residues, the encoding region is between 123bp to 639bp, the deduced mass is 19.9ku and isoelectric point is 4.24. The deduced amino acid sequence shows 93.60%, 88.37% and 83.72% similarities with the ferritin from tick *Dermacentor variabilis*, *Ixodes ricinus*, and *Ornithodoros moubata* respectively. The stem-loop structure of a putative iron responsive element is found in the 5'-untranslated region of ferritin mRNA. The protein contains the conserved motifs for ferroxidase center. RT-PCR analysis suggests the ferritins are expressed in the eggs, larvae, fed female adult, engorgement female adult and male adult ticks of *B. microplus*.

**Key words:** *Boophilus microplus*; ferritin; cDNA cloning; RT-PCR

\* Corresponding author