doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.008

黑鲷转铁蛋白基因的分子特征研究 *

陈艳萍[1] 王立红[2] 高春萍[3] 晋 慧[3] 周 进[3△]

（1 深圳国家高技术产业创新中心 广东 深圳 518057；2 鼎正动物药业(天津)有限公司 天津 300382；
3 深圳市微生物资源与利用公共服务平台，清华大学深圳研究生院 广东 深圳 518055）

摘要 目的：克隆黑鲷转铁蛋白全基因并分析其分子特征。**方法：**采用同源克隆的方法，对黑鲷转铁蛋白全基因编码序列进行克隆，在 cDNA 获得了部分转铁蛋白基因的同源片段。经 RACE PCR 方法，分别对该基因的 3'和 5'末端进行扩增，获得的扩增片段经拼接后得到全基因片段。**结果：**黑鲷转铁蛋白全长 2431bp，可编码 691 个氨基酸，分子量(MW)约为 74.3kDa，等电点(PI)为 5.63。它与鱼类转铁蛋白的同源性最高，约为 65%-89%>；与其它动物(哺乳类、两栖类等)也有一定的相识性。进化分析表明黑鲷转铁蛋白与其它鱼类和哺乳类的转铁蛋白是由早期转铁蛋白共同的祖先进化来的。**结论：**黑鲷转铁蛋白主要在肝脏中成组成型表达，在大脑等器官中也有少量表达。该基因的表达受病原刺激的影响，表现为经病原刺激后转铁蛋白基因的组织分布显著增多。

关键词：黑鲷；转铁蛋白；全基因克隆；分子特征

中图分类号：Q78；Q75 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2014)27-5225-05

Molecular Cloning and Function Characterization of Transferrin from Acanthopagrus Schlegeli*

CHEN Yan-ping[1], WANG Li-hong[2], GAO Chun-ping[3], JIN Hui[3], ZHOU Jin[3Δ]

(1 Shenzhen Industrial Innovation Centre of National High-Technology, Guangdong, Shenzhen, 518057, China; 2 Dingzheng Animal Pharmaceutical (Tianjin)Limited .Co. Tianjin, 300382, China; 3 Shenzhen Public Platform of Microbial Resource and Application, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China)

ABSTRACT Objective: To clone and to analyze the molecular characterization of transferrin from Black seabream (Acanthopagrus schlegeli). **Methods:** The full length transferrin (TF) gene from Black Seabream was cloned by homology strategy using a pair of degenerated primers designed according to the conserved regions of other animals' TF genes. A part of homologous fragment was obtained by PCR amplification, the fragment was elongated by RACE PCR with the adaptor primer and several gene specific primers to get the full length sequence. **Results:** The sequence contained 2431 bp including a short 5' UTR of 31 bp and 3' UTR of 341bp and an open reading frame of 2072 bp which could code a 691 amino acids peptide with putative MW of 74.3kDa and putative PI of 5.63. The sequence shared high identity and similarity with other animals' transferrin, especially with the fish TF genes. There was about 65-89% identities with other fish, and about 40-50% identities with each of the mammalian TFs. **Conclusions:** Phylogenetic analysis showed that the TF gene evolution from the same ancestor with the others animals' transferrin. RT-PCR showed that the Black Seabream TF was constitutively expressed in liver, and it could be regulated by pathogen stimulating, the distribution of TF expression increased significantly after pathogen stimulating.

Key words: Black Seabream; Transferrin; Homology cloning; Molecular characterization

Chinese Library Classification (CLC): Q78; Q75 Document Code: A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5225-05

前言

转铁蛋白是一种存在于脊椎动物血清中的铁离子转运蛋白，是细胞铁离子的供体，它主要在肝脏中合成，但是在大脑和其它组织中也有低剂量表达[1]。转铁蛋白属于黑核细胞铁离子蛋白结合家族成员（eukaryotic iron-binding protein family），与转铁蛋白功能相关的其它家族成员包括乳铁蛋白(lactoferrin)，卵黄转铁蛋白（ovotransferrin）以及黑色素转铁蛋白(melanotransferrin)等[2]。

转铁蛋白是大多数组织细胞生长所必须的物质，它可以将环境中的铁离子转运到细胞生长需要的部位，为组织细胞提供生长所需的铁离子；并通过结合环境中的铁离子，限制病原复制时对铁的利用，达到抑制细菌生长的作用[3]。转铁蛋白除了具有铁离子转运能力外，还可以作为细胞因子，行使其它生物学

* 基金项目：天津市滨海新区科技小巨人成长计划项目(2011-XJR12065)；深圳南山区创新研发项目（KC2013JSCX0003A）

作者简介：陈艳萍，女，硕士，主管药师，研究方向：生物工程

△通讯作者：周进，E-mail: zhou.jin@sz.tsinghua.edu.cn

（收稿日期：2014-03-17 接受日期：2014-04-15）

机能,包括促进嗜中性粒细胞成熟,支持干细胞的生长与分化,调控趋化因子合成并作为炎症介质介导一氧化氮合成,诱导呼吸代谢爆发等多重功能[4]。

本研究以养殖黑鲷为材料,采用同源克隆的策略,对黑鲷转铁蛋白基因进行克隆与体外表达,为转铁蛋白基因的开发与利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验用鱼购自广东省深圳市南澳养殖场,体重约 700 g,于流水实验槽中控温暂养一周。暂养期间水温 22± 2 ℃,溶氧约 6 mg/L,每日投喂约占体重 15‰的商品人工配合饵料。

1.2 黑鲷总 RNA 的提取与反转录

用新鲜培养的鳗弧菌(Vibrio anguillarum),以围心腔注射的方式感染经暂养的健康黑鲷,约 1× 10^8 菌 /kg 鱼。24 h 后,取经感染鱼的肝脏进行匀浆,并以 Trizol Reagent (Invitrogen, Japan) 提取组织的总 RNA。用约 5 μg 的总 RNA 为模板,以 oligo dT (Promega,USA) 为引物,在 MMLV 反转录酶(Promega,USA)的作用下,启动反转录,合成 cDNA。

1.3 TNFα 同源序列的克隆

根据其它物种 TRF 基因序列的保守区域设计简并引物 dTRF-F 和 dTRF-R(见表 1)。以黑鲷 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:10× PCR 反应缓冲液 5 μL,25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,10nmol/L 引物 dTRF-F 和 dTRF-R 各 2 μL,Taq 酶 1.25 U,用 PCR 水将反应体系补充至 50 μL。PCR 反应条件为:1 个循环,94 ℃变性 5 min;35 个循环:94 ℃变性 45 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 45 s;1 个循环,72 ℃延伸 10 min; 4 ℃ 保温。PCR 反应产物在 15‰琼脂糖上电泳,以 100 bp DNA Marker 为对照,EB 染色,紫外灯下观察 PCR 反应结果。将与预测大小相近的 PCR 产物,经 PCR 产物纯化试剂盒(Promega,USA)回收,连入 pMD18-T 载体(TaKaRa,大连),转化到大肠杆菌 XL-1blue 感受态细胞中。转化后的细菌均匀涂布到含 X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上,经 37 ℃过夜培养。以载体引物 M13 正反向为引物,对转化子进行筛选。根据片段大小,选取 3 个与预测片段大小相近的阳性克隆,经质粒纯化后,采用 ABI377 DNA 自动测序仪测序。

表 1 简并引物及 RACE 引物

Table 1 Gene specific primers and adapter primers

引物名称 Primers	序列 Sequences
dTRF-F	5' TAT GAG YTG YTG TGC AHG G -3'
dTRF-R	5' ATD ACW GGR ACC AGV CCA C-3'
dT primer	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACT17- 3'
TF-TF117 primer	5'- CGACAGTGAGGCTGGTGA -3'
Adapter primer	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
TRF-TF55	5'-GGAGCCTTCCAATGTCTG-3'
TRF-TF280	5'-CGACGCATGGAGCATCAAC-3'
oligo dG	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACG-3'
TRF-TR300	5'-AGTCATGCTGTTGATGCTCC-3'
TRF-TR180	5'-GATGGTGCTCATGTATTCAG3'
TRF-TR64	5'-GGAAGGCTCCACCGTAGTCA-3'

1.4 RACE PCR 克隆转铁蛋白基因的全长

3’末端的克隆:以提取的总 RNA 为模板,用接头引物 Adapter dT,在 Superscript II 反转录酶(Gibco,Japan)的作用下,启动反转录合成 cDNA。以带接头的 cDNA 为模板,用接头通用引物 Universal primer 和基因特异性引物 TRF-TF55 进行第一轮 PCR 扩增;然后,用第一轮 PCR 扩增产物为模板,以 Universal primer 和基因特异性引物 TRF-TF280 采用半巢式 PCR (semi-nested PCR),扩增基因的 3’末端。PCR 反应体系与前述相同,采用热启动(hot start)的 PCR 程序:1 个循环,94 ℃,5 min;10 个循环:94 ℃,45 s,66 ℃,30 s 每一循环温度降低 0.6 ℃),72 ℃,1 min;25 个循环:94 ℃,45 s,60 ℃,30 s,72 ℃,1 min;1 个循环,72 ℃,10 min;4 ℃保温。由于转铁蛋白基因片段较大,不能一次性将序列测定完全,在新扩增出的序列中新合成引物 TRF-TF550 完成 TRF3’末端测定。

5’末端的克隆:以 oligo dT 为引物,用 Superscript II 反转录酶启动反转录,合成 cDNA 第一链。cDNA 模板经 PCR 纯化试剂盒纯化,在 dCTP 存在的条件下,用末端转移酶(TdT)(Promega,USA),在新合成的 cDNA 末端加上 poly C 尾。以加尾的 dC-cDNA 为模板,用接头引物 Adapter dG 和基因特异性引物 TRF-TR300,进行第一轮 PCR 扩增;以第一轮反应产物为模板,用 Universal primer 和 TRF-TR180 为引物,采用半巢式 PCR 扩增基因的 5’末端,反应条件与 3’末端扩增相似。在 PCR 反应产物在 1%琼脂糖上电泳,EB 染色,紫外灯下观察 PCR 反应获得的扩增片段。在新扩增的序列上继续设计新的引物 TRF-TR64 和 TRF-TR143,分别与 Universal Primer 进行 PCR 扩增,完成 TRF 基因 5’末端的扩增。

分别将 3’和 5’端的扩增片段连接到 pMD18-T(TaKaRa,大连)载体上克隆,获得的转化子经 PCR 筛选后进行序列测定,序列经 BLAST 2 软件拼接后完成全基因的克隆。

1.5 序列分析

扩增序列同源性比对和相似性搜索用 BLAST [5]软件进行;多序列联配采用 CLUSTAL W[6]程序;以 BLAST 软件进行序列拼接;模体用 InterPro[7]软件查找;信号肽查找用 SingalP[8]程序分析;跨膜区用 TargetP[9]程序搜寻;采用 CLUSTAL W 程序和 MEGA 2.1[10]软件,以邻位相连法(neighbor-joining)构建进化树。

1.6 表达研究

采用 RT-PCR 方法,检测黑鲷 TNFα 基因经病原鳗弧菌刺激后,在不同组织和器官中的转录表达。分别将健康及经鳗弧菌感染 24 小时黑鲷的血液、大脑、头肾、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肌肉等器官或组织取出,提取总 RNA 并合成 cDNA。以各 cDNA 为模板,用引物 Actin-F 和 Actin-R 扩增的结构型表达 β-Actin 基因的部分片段为内参照,调整各样品模板浓度。在相同模板量的前提下,用 TNFα 特异性基因引物 TFF 和 TR2 对样品进行扩增,检测样品在不同组织、器官及在病原刺激前后的表达。

2 结果

根据相邻物种转铁蛋白基因序列的保守区域设计兼并引物 dTRF-F 和 dTRF-R 扩增出 483 bp 的同源扩增片段,该序列

经 BLAST 比对，与部分鱼类和哺乳动物转铁蛋白基因有高度的同源性。在获得的 TRF 基因部分序列中设计引物 TRF-TF55/ TRF-TF280/ TRF-TF556 和 TRF-TR300/ TRF-TR180/TRF-TR64/ TRF-TR14-3，对该基因的 3’ 和 5’ 末端进行扩增，以获得基因的全序列，基因扩增片断和引物位置如图 1 所示。

经 3’ RACE PCR 扩增，获得 1320 bp 的基因扩增片段，该序列由载体引物和基因特异性引物共同完成序列测定。序列分析表明，该序列包含基因终止信号 AATAAA 结构，以及蛋白质终止密码子 TAG 结构。5’RACE PCR 由扩增序列拼接而成，扩增片段及引物位置如图 1 所示。5’RACE PCR 获得了起始氨基酸 Met，表明完成了全长基因的克隆。

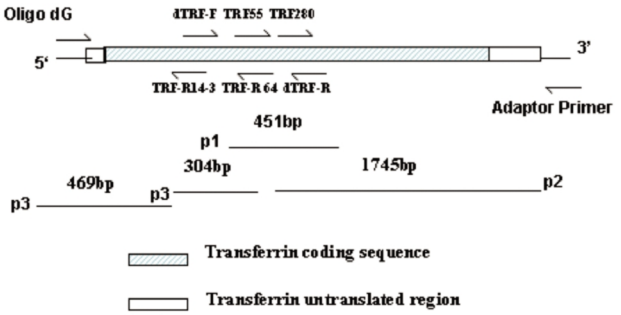

图 1 黑鲷 TNFα 基因克隆的流程图，表示三段相互交叠的克隆片段拼接而成的 TNFα 全基因序列，以及所用引物的相对位置

Fig.1 Schematic diagram shows the overlapping of cloned TRF fragments and the position of primers used in TRF gene cloning

多个基因扩增片段经 BLAST 2 软件拼接，获得 2431 bp 黑鲷转铁蛋白基因(Genebank accession number: AY365052)。可编码 691 个氨基酸，预测蛋白的分子量(MW)约为 74. 37 kDa，等电点(PI)为 5.63。以 SignalP 软件分析表明，该蛋白有一个长度为 18 个氨基酸的信号肽。与其它动物转铁蛋白结构相似，黑鲷转铁蛋白分子由两个结构相似的叶状结构域构成的单一肽链，在哺乳动物中分别称为 N 叶和 C 叶。黑鲷转铁蛋白的 N 叶(24-339)与 C 叶(240-681)结构域之间有 34.7% 的同源性。经 InterPro 软件分析，在每个叶蛋白结构域中都包含三个转铁蛋白家族的签名序列模式（Signature），分别为氨基酸环 YYAVAVVKKG/YGGAFQCLADDA，GEVAF/KYELLRKDNT RAP IDSYSTCHLAKVPAHAVV 和碳水化合物环 YYAVAVVKKG/YAGAFRCLVEG，AGDVAF/ DYELICPNKSP VPV TDYLSCHLARVPAHAVV(图 2)；该蛋白缺乏明显的糖基化位点。与人和其它动物转铁蛋白相比，黑鲷转铁蛋白每个叶状结构域中都包含一个铁离子结合位点，分别由 Asp73/Asp394、Tyr103/Tyr429、Try200/Try524 和 His256/His592 等氨基酸组成，对应人转铁蛋白基因铁结合位点分别为 Asp82/Asp411、Tyr114/Tyr445、Try207/Try536 和His268/His604。

与其它动物转铁蛋白的多序列联配结果显示，黑鲷转铁蛋白的氨基酸序列与其它动物相比有较高的同源性(表 2)，同源性最高为真鲷，其同源性高达 91.0%，其次是日本青鳉(75%)；与其它脊椎动物相比同源性相对较低，约为 42-45%。

黑鲷转铁蛋白所有的半胱氨酸都非常保守，二级结构分析显示，黑鲷转铁蛋白信号肽后所有的 32 个半胱氨酸都参与二硫键的组成，共形成 16 个二硫键桥结构。其中 7 个二硫键桥分布在 N 叶，9 个分布在 C 叶(图 3)。在每叶蛋白结构域上的三个签名序列的区域，以及转铁蛋白铁结合位点等蛋白功能域区域也都高度保守。

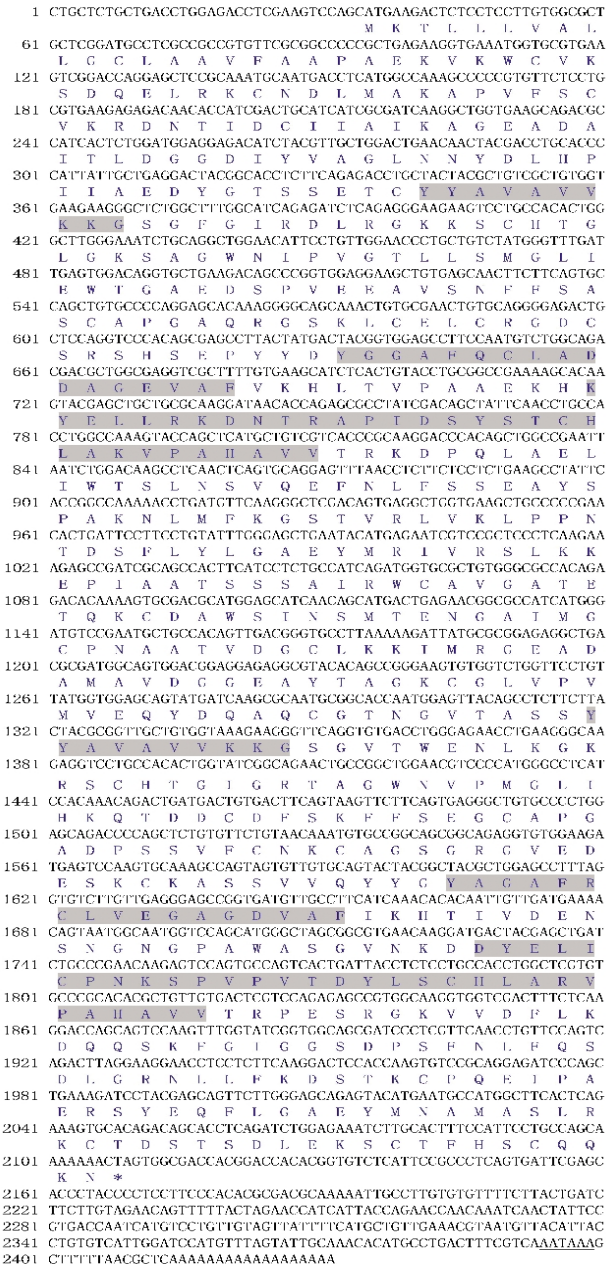

图 2 黑鲷转铁蛋白全基因序列示意图。虚线代表信号肽切割位点，阴影部分分别表示转铁蛋白基因的两叶结构域上的三个签名序列；阴影加下划线代表核酸的终止序列 AATAAA 结构；星号代表基因的起始和终止密码子

Fig. 2 The full length sequence of Black Seabream transferrin gene. The broken line showed the signal peptide site; each of the transferrin family signatures was in shade; the arrow indicated the separated site of the two lobe of the transferrin; the stop codon of the sequence (AATAAA) was underline and the sparks showed the start and stop codon

表 2 黑鲷与其它动物转铁蛋白氨基酸同源性比较

Table 2 Homology analysis of Black Seabream transferrin amino acids sequence with the transferrin of other animals

Common name(名称)	Identity (%)(相似性)	Accession No.(GeneBank 号)
Human (人)	44.9	AY308797
Mouse (鼠)	44.2	BC012313
Cow (牛)	43	U02564
Horse (马)	43.7	U21127
Pig (猪)	43.9	X12386
Africa frog(爪蟾)	43.3	AF139169
Rainbow trout(虹鳟)	68.6	BAA48103
Flounder (牙鲆)	63.6	AF219997
Japanese medaka(青鳉)	74.2	P79819
Common Carp(鲤鱼)	47.2	AY457152
Red Seabream(真鲷)	87.1	AY335444
Ascidian (海鞘)	17.6	AB047294
Flesh fly(果蝇)	18.4	D28940
Cockroach (蟑螂)	24.3	L05340
Mosquito (蚊)	18.2	AF019117

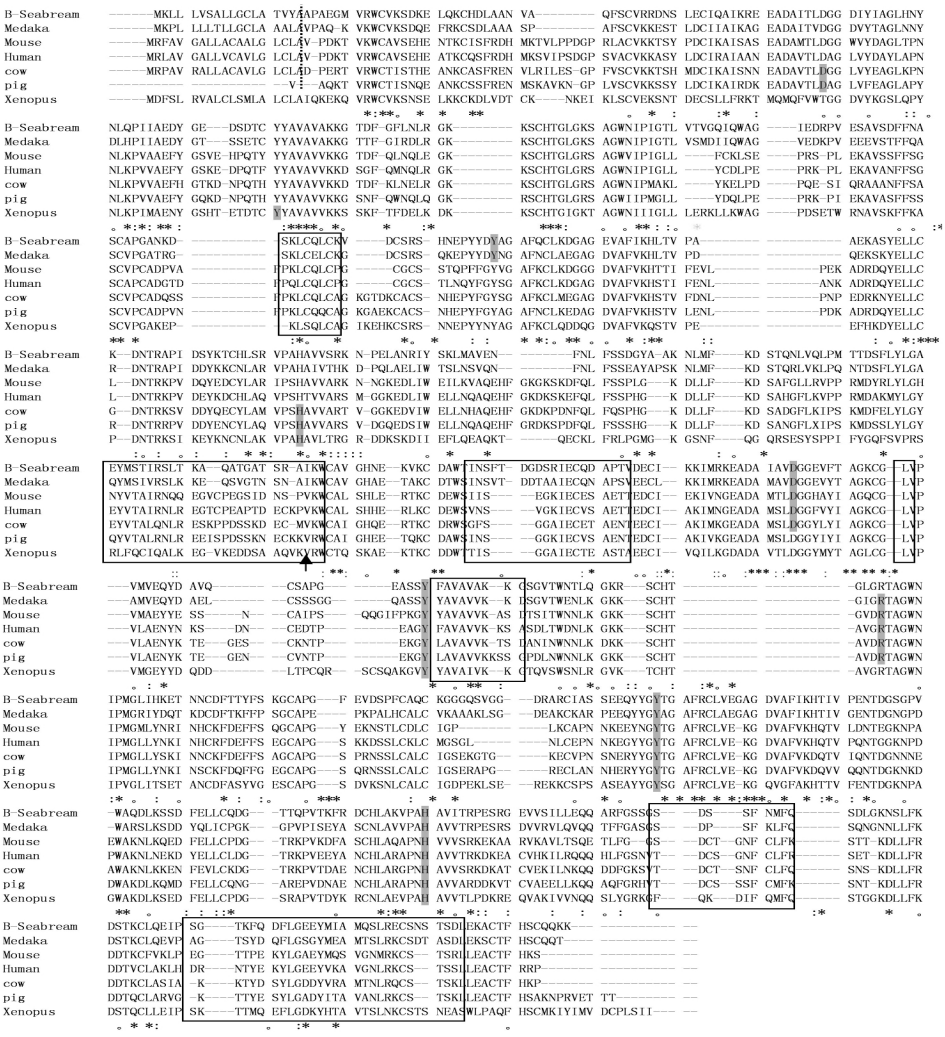

图 3 黑鲷转铁蛋白与其它动物转铁蛋白的相似性比较。星号代表同源性(*),点代表相似性(。或:);虚线表示信号肽切割位点;箭头表示 N 叶和 C 叶分割位点;方框为转铁蛋白家族签名序列位置;阴影部分为铁结合位点;+ 为参与二硫键的半胱氨酸

Fig. 3 Multiple alignments of the transferrin in Black Seabream with other known transferrin amino acids sequence. Identical (*) and similar (.Or :), residues aligned by the CLUSTAL W program. The signal peptides were indicated with broken line, the arrow showed the interface of the Nlobes and the C lobes, the transferrin family signature were in the box, the Fe banding site were in shade box and conserved cysteine residues were marked with +

进化分析显示(图 4),黑鲷转铁蛋白与其它哺乳类转铁蛋白基因是由共同祖先进化来的。其中,各种鱼类转铁蛋白的亲缘关系明显高于其它哺乳类,各个物种进化上的亲缘关系由近到远依次为:黑鲷、其它鱼类、两栖类、哺乳类以及其它动物。

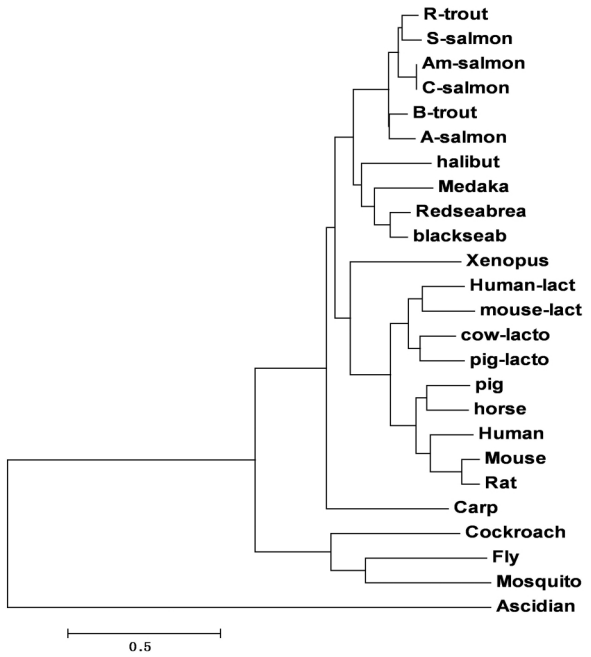

图 4 黑鲷 TNF 基因的进化树分析。采用临位相联法,以 CLUSTAL W 和 MEGA2 软件构建系统无根进化树,表示黑鲷 TNFα 与其它动物 TNFα 和 TNFβ 之间的进化关系

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the relationship among the full-length Black Seabream.TNFαamino acids sequence with other animals TNFα and TNF βsequences. The sequences were aligned by CLUSTAL W program and a phylogenetic tree was constructed by neighbour-joining methods within MEGA version 2

表达研究结果表明,黑鲷转铁蛋白在组织中成结构型表达,表现为在刺激与非刺激组织中转铁蛋白的表达水平没有显著性差异。但是,在不同的组织中,它的表达量有很大的不同。实验结果表明,黑鲷转铁蛋白在肝脏中表达最高,其次是头肾、脾脏和大脑。病原刺激对转铁蛋白的表达没有显著影响,但是能改变该基因在组织中的分布(图 5)。

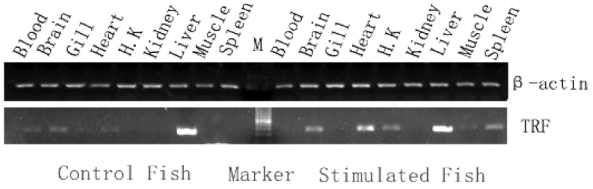

图 5 黑鲷 TNF 基因 RT-PCR 的表达分析

Fig. 5 RT-PCR to analyze the tissues expression and distribution of Black Seabream TNF gene

3 讨论

转铁蛋白不仅是机体铁离子转运蛋白,在机体生长代谢中发挥重要的作用,而且它还可以作为细胞因子广泛参与机体的免疫调节,控制病原菌的繁殖,具有广泛的生物学活性[11, 12]。本研究以海水养殖黑鲷为材料,对黑鲷转铁蛋白基因进行克隆与表达,为进一步开发转铁蛋白在生产上的应用和研究其抗病机理提供依据。

采用同源克隆的方法,应用一对兼并引物在黑鲷 cDNA 中获得了 451bp 的转铁蛋白基因同源片段,采用 RACE-PCR 技术,对该基因的 3'和 5'末端进行克隆,并将几段克隆片段进行拼接,获得了 2444 bp 黑鲷转铁蛋白全基因序列。基因结构分析表明,该基因与其它动物转铁蛋白和乳铁蛋白都有很高的同源性。其中,与其它鱼类转铁蛋白同源性最高,约为 65-75%的同源性,与哺乳类转铁蛋白和乳铁蛋白各有 40-50% 的同源性,与昆虫等无脊椎动物相比,也有 15-25% 的同源性。虽然该序列与哺乳类转铁蛋白和乳铁蛋白都具有很高的同源性[13],但是,进化分析表明,哺乳类的乳铁蛋白是在与鱼类转铁蛋白分化后,才从哺乳类转铁蛋白特化来的一种蛋白。乳铁蛋白是在哺乳类转铁蛋白基础上进化来的,其结构与转铁蛋白相似,功能与转铁蛋白有一定的差异,转铁蛋白功能以铁离子转运为主,而乳铁蛋白主要功能为清除环境中多余的铁离子,起清道夫的作用[14]。

与高等动物转铁蛋白基因结构相似,黑鲷转铁蛋白基因在信号肽后有两个极为相似的区域,在蛋白结构中表现为两个结构相似的叶状结构域,这两个结构域有 36% 的同源性,被认为是机体在进化过程中通过基因复制形成的,以加强对铁离子的转运能力。但是,Stafford(2001)报道用鱼的转铁蛋白刺激金鱼巨嗜细胞,诱导一氧化氮反应的研究表明,双叶转铁蛋白并不具有显著的生物学活性,而经蛋白酶酶切后的单叶转铁蛋白可以显著提高巨嗜细胞的活性[15]。因此,转铁蛋白在表达其对铁离子转运能力和诱导一氧化氮产生等免疫学反应上的生物学作用机制是否相同,目前还不清楚。

对黑鲷转铁蛋白的二级结构分析表明,与其它动物相比,该序列参与形成二硫键的 32 个半胱氨酸以及该蛋白的功能域,铁结合位点都高度保守[16-18]。在参与形成蛋白高级结构的两个叶状结构域中,都有三个转铁蛋白基因家族和一个 MHC 的签名序列模式,它们分别参与铁离子结合和机体的免疫调节,不同种动物转铁蛋白基因的这些区域高度保守,说明黑鲷转铁蛋白基因在二级结构和功能上与其它动物转铁蛋白相似。

表达研究表明,黑鲷转铁蛋白主要在肝脏中表达,转铁蛋白在肝脏中的表达为结构型表达,表现为在未刺激的机体中,也可正常表达。黑鲷转铁蛋白基因除了可以在肝脏结构型表达外,在大脑也有少量表达,这一结果与其它动物转铁蛋白表达一致。虽然黑鲷转铁蛋白在肝脏中成结构型表达,但是在病原刺激下,它可以被诱导而全身都可以表达,这一结果与转铁蛋白广泛参与机体的免疫防卫的功能有关[19, 20]。在黑鲷转铁蛋白的 N 叶和 C 叶各发现一个 MHC 分子签名序列模式,这也表明该基因与免疫密切相关[21]。

参 考 文 献(References)

[1] Lambert LA. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820 (3): 244-255

[2] Lambert LA, Perri H, Halbrooks PJ, et al. Evolution of the transferrin family: conservation of residues associated with iron and anion binding [J].Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2005, 142 (2):129-141

(下转第 5234 页)

investigation[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(15): E925-929

[20] McCord DH, Cunningham BW, Shono Y, et al. Biomechanical analysis of lumbosacral fixation [J]. Spine, 1992, 17 (8suppl): S235-S243

[21] Yazici M, Akel I, Demirkiran HG. Demirkiran, Lumbopelvic fusion with a new fixation technique in lumbosacral agenesis: three cases[J]. J Child Orthop, 2011, 5(1): 55-61

[22] McLain RF, Sparling E, Benson DR. Early failure of short-segment pedicle instrumentation for thoracolumbar fractures. A preliminary report[J]. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75(2): 162-167

[23] Yu BS, Zhuang XM, Zheng ZM, et al. Biomechanical advantages of dual over single iliac screws in lumbo-iliac fixation construct [J]. Eur Spine J, 2010, 19(7): 1121-1128

[24] Ohtori S, Sainoh T, Takaso M, et al. Clinical incidence of sacroiliac joint arthritis and pain after sacropelvic fixation for spinal deformity [J]. Yonsei Med J, 2012, 53(2): 416-421

[25] Kebaish KM. Sacropelvic fixation: techniques and complications[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35(25): 2245-2251

(上接第 5229 页)

[3] Luck AN, Mason AB. Transferrin-mediated cellular iron delivery [J]. Curr Top Membr, 2012, 69:3-35

[4] Luck AN, Mason AB. Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: focus on serum transferring [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(8):1012-1019

[5] Oehmen CS, Baxter DJ. ScalaBLAST 2.0: rapid and robust BLAST calculations on multiprocessor systems [J]. Bioinformatics, 2013, 15; 29(6):797-798

[6] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23(21):2947-2948

[7] Mulder N, Apweiler R. InterPro and InterProScan: tools for protein sequence classification and comparison [J]. Methods Mol Biol, 2007, 396:59-70

[8] Hansen BT, Davey SW, Ham AJ, et al. P-Mod: an algorithm and software to map modifications to peptide sequences using tandem MS data [J]. J Proteome Res, 2005, 4(2):358-368

[9] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. Nat Protoc, 2007, 2(4):953-971

[10] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244-1245

[11] Jeremy HB, Tryfonia MF. The role of iron and transferrin in lymphocyte transformation [J]. Trends in Immunology, 1983, 4(12): 347-351

[12] Abe Y, Nagata R, Hasunuma Y, et al. Isolation, characterization and cDNA cloning of a one-lobed transferring from the ascidian Halocynthia roretzi [J]. Comp Biochem Physiol, Part B, 2001,128: 73-79

[13] Demmer J, Stasiuk SJ, Adamski FM, et al. Cloning and expression of the transferring and ferrin genes in a marsupial, the brushtail possum (Trichosurus vulpecula) [J]. Biochim Biophys Acta,1999, 1445:65-74

[14] Ghareeb BA, Thepot D, Puissant C, et al. Cloning, structural organization and tissue specific expression of the rabbit transferring gene [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1398:387-392

[15] Stafford J, Belosevic M. Transferring and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation [J]. Dev comp immunol, 2003, 27(6-7):539-554

[16] Lambert LA. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820 (3): 244-255

[17] Luck AN, Mason AB. Transferrin-mediated cellular iron delivery [J]. Curr Top Membr, 2012; 69:3-35

[18] Luck AN, Mason AB. Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: focus on serum transferrin [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(8):1012-1019

[19] Oehmen CS, Baxter DJ. ScalaBLAST 2.0: rapid and robust BLAST calculations on multiprocessor systems [J]. Bioinformatics, 2013, 15; 29(6):797-798

[20] 李明云, 张春丹. 四种海水养殖鱼类血清转铁蛋白多态性的初步研究 [J]. 科学通报, 2009, 6:753-757

[21] 蔡中华, 宋林生, 高春萍等. 真鲷转铁蛋白基因的克隆与表达特征分析 [J]. 高技术通讯, 2005, 15(5):105-110