

鲢转铁蛋白基因 cDNA 的克隆及其在 胚胎期的表达分析

张志伟^{1,2} 李忠² 梁宏伟² 罗相忠² 李林^{1,2} 邹桂伟^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430060

摘要 克隆鲢转铁蛋白(transferrin, Tf)基因的全长 cDNA 序列, 并对鲢转铁蛋白的组织表达模式、胚胎发育过程中的时序表达模式进行分析。结果显示, 该 cDNA 全长 2 365 bp, 包含 2 025 bp 开放阅读框(ORF), 编码 674 个氨基酸。鲢转铁蛋白与草鱼转铁蛋白的同源性高达 74%, 与人乳铁蛋白同源性最低, 为 39%, 与其他鲤科鱼类转铁蛋白的同源性约 65%~73%, 与非鲤科鱼类的同源性约 43%~50%。系统进化树分析显示, 鲢转铁蛋白基因与斑马鱼、草鱼、鲤、鲫等几种鲤科鱼类亲缘关系最近, 单独聚为一支。鲢转铁蛋白基因仅在肝脏和脾脏中表达(肝脏中表达量高于脾脏)。在胚胎发育过程中, 转铁蛋白基因对原肠中期后的器官分化和形态建成起到了一定的作用, 而未影响原肠中期前的细胞分裂增殖。

关键词 转铁蛋白; 鲢; RACE; 实时荧光定量

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0352-06

转铁蛋白(transferrin, Tf)是 1945 在人血清中首次发现的一种非血红素结合铁蛋白, 其主要生理功能为结合、运输 Fe^{3+} , 承担对铁的吸收、贮存和利用以及在各部位之间的转运^[1]。转铁蛋白具有抗菌杀菌的功能, 是维持细胞生长和增殖所必须的生长因子^[2-3]。可见, 转铁蛋白是一种参与了生命多种过程的重要的功能蛋白。鱼类转铁蛋白的研究起步较晚但发展迅速, 血清转铁蛋白的多态性可用作系鉴定遗传育种的可靠的生化指标^[4], 而其与鱼类的耐低氧能力也普遍被认为是呈正显著相关的^[5]。转铁蛋白的多态性在分子水平上也得到了体现^[6], 并认为是适应自然选择的结果。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)是国内的传统养殖鱼类之一, 自人工繁殖技术获得成功以后, 其养殖范围更是扩展到全国大部分水域。然而鲢抗胁迫能力较差, 在外界应激刺激后容易死亡, 选育出具有较强耐性的鲢新品种一直是人们的目标。笔者拟通过获得鲢转铁蛋白基因并研究其在各个器官及胚胎发育过程的表达模式, 从而为转铁蛋白基因的进一步研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

从中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场采集集体质量 500 g 左右鲢, 分别取心脏、脑、肝脏、肾脏、脾脏、肌肉、鳃、血液等组织, 用 RNAlater (AXYGEN)保存。

在繁殖季节, 人工授精后, 取不同发育时期的胚胎, 并用 RNAlater 保存。采样前, 用含 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)水浸泡与样品接触的所有玻璃及金属器皿 24 h, 120 °C 高温高压灭菌后烘干。

1.2 总 RNA 的抽提和第一链 cDNA 的合成

按照 Trizol (INVITROGEN)说明书取鲢不同发育时期的胚胎以及各种成体组织的 RNA, 将溶于 RNase-free 水中的 RNA 放置于 -80 °C 冰箱中备用。以提取的总 RNA 为模板, 利用 RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 (TaKaRa)合成 cDNA 第一链, 于 -20 °C 保存备用。具体操作参考试剂盒说明书。

1.3 鲢 Tf 保守序列的获得

根据草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲫(*Carassius auratus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等已知

收稿日期: 2010-09-08

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycyt-x-49-01); 公益性行业(农业)科研专项(200903045)

张志伟, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail: pifuyoumou@126.com

通讯作者: 邹桂伟, 研究员, 研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail: zouguiwei@yfi.ac.cn

鱼类的 *Tf* 基因的保守序列,设计 2 对特异性引物(P1、P2 和 P3、P4)(表 1)扩增鲢 *Tf* cDNA 中间保守片段,引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。以本文“1.2”中第一链 cDNA 为 PCR 模板,PCR 反应体系为 50 μ L,各含:5 μ L 10 \times 反应缓冲液,1 μ L 上、下游引物(各 10 μ mol/L),1 μ L dNTPs (10 mmol/L),TaKaRa Ex Taq Hs 1.5 U,模板 10 μ L,以 ddH₂O 补足 50 μ L。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后割取目的片段,用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN)纯化回收后,连接到 pMD-18T 载体,转化大肠杆菌感受态细胞后,进行菌液 PCR 分析,检测到的阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

表 1 鲢转铁蛋白基因克隆和表达所用引物

Table 1 The primers used for *Tf* gene cloning and expression in silver carp

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'-3')
P1	AGTTACTTTGTCGTGGCGGTTGT
P3	CCTTAGCCCAGTCCTGTCCTTTA
P3	TTTGTTTGCCACGATGCAATCCC
P4	CCTTACGCACAACCGCCACGACA
P5	CCTACTTTGTCGTGGCGGTTGTGCGT
P6	GAATCACTTCCAGTCGGAGAGAGAGC
P7	AATGCATCGATAAAGTCAAGCGC
P8	TACCATCTGTGTAATCTCCAACA
P9	CGGCAGTAGGAAAAGTGTTGAGG
P10	GGTAGAGGAAGGAGTCTGTGGTT
P11	TGAGAGGTTTCAGGTGCCAG
P12	TGTCAGCAATGCCAGGGTAC

1.4 鲢 *Tf* cDNA 末端的克隆

根据已经克隆得到的鲢 *Tf* cDNA 部分序列,设计合成 3'RACE 引物(P5)和 5'RACE 基因特异引物(P6)(表 1)。使用 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)获得第一链 cDNA,并以此为模板,采用 Touch down PCR(TD-PCR)的方法及 Advantage 2 PCR Kit(Clontech)扩增得到鲢 *Tf* cDNA 的末端。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65~55 $^{\circ}$ C 1 min,每个循环下降 0.5 $^{\circ}$ C,20 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,20 个循环,72 $^{\circ}$ C 2 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后割取目的片段,用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收后,连接至 pMD-18T 载体,转化大肠杆菌感受态细胞后,采用菌液 PCR 检测阳性克隆,送至上

海生工生物工程技术有限公司测序。

1.5 半定量 RT-PCR 检测鲢 *Tf* 基因的组织表达特性

根据鲢转铁蛋白基因序列设计半定量引物(P7 和 P8)(表 1),扩增目的片段为 233 bp,参考鲢 *β -actin* 基因序列(登录号:AF301605)设计内参引物(P11 和 P12)(表 1)。反应体系为 15 μ L:1.5 μ L 10 \times 反应缓冲液,0.5 μ L 上、下游引物(各 10 μ mol/L),0.3 μ L dNTPs (10 mmol/L),TaKaRa Taq 1 U,cDNA 1 μ L,以 ddH₂O 补足体积。通过摸索最适退火温度和循环数后,确定 PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测鲢 *Tf* 在胚胎发育过程中的时序表达特性

根据克隆得到的鲢 cDNA 序列,设计并合成实时定量 PCR 引物(P9 和 P10),并以 β -actin(P11 和 P12)为内参引物。用本文“1.2”中的方法进行逆转录获得 cDNA 第一链,并以此作为模板。实时荧光定量 PCR 反应体系为:上、下游引物各 0.5 μ L,1 μ L 模板,7.5 μ L 2 \times SYBR Premix ExTaq (TaKaRa),加 ddH₂O 补足 15 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。实时荧光定量 PCR 反应使用的是 Rotor-Gene Q cycler (QIAGEN)。为保证结果的可靠性,每个样品重复 3 次。目的基因的相对表达量的计算采用 $\Delta\Delta$ CT 法,根据扩增曲线得到的 CT(荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数)值,计算出目标基因(*Tf*)和内参基因(*β -actin*)CT 值的差异;进而以差异最大的样本作为参照样本,计算出不同样品相对于参照样本基因表达倍数 $2^{-\Delta\Delta CT}$,进而得出基因相对定量的图表。

2 结果与分析

2.1 鲢 *Tf* cDNA 的克隆及序列分析

将本文“1.3”、“1.4”中得到的 cDNA 片段、3'端和 5'端序列,分别用 NCBI 中的 BLAST 在线程序进行同源性分析,证明其为草鱼、鲤、斑马鱼 *Tf* 同源片段,因而确定上述片段为鲢 *Tf* cDNA 的序列,使用 ContigExpress 软件,将几个序列片段进行比对拼接,即得到鲢转铁蛋白基因 cDNA 全长序列,长度为 2 365 bp,序列已提交至 GenBank (登录

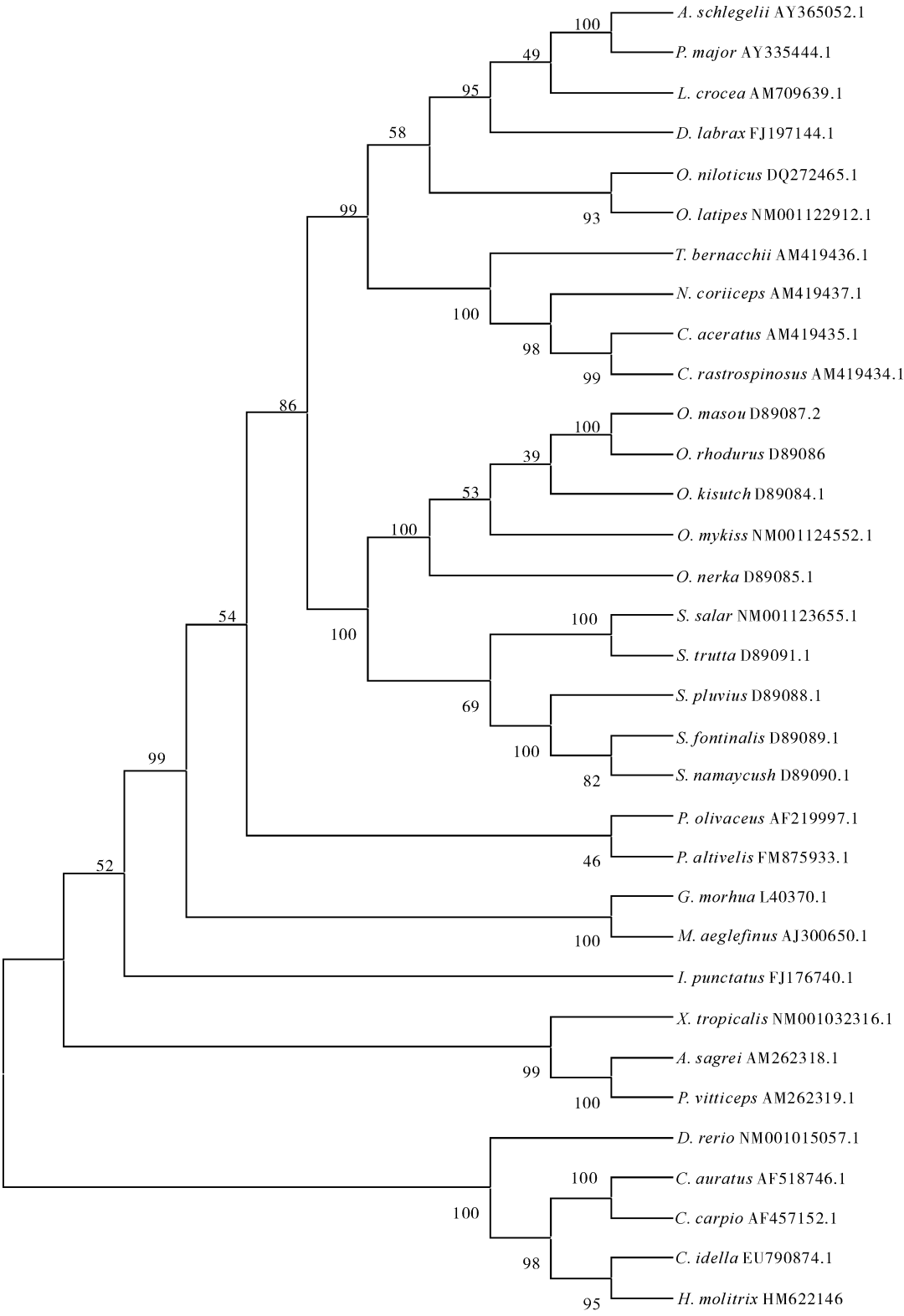


图 1 各种 *Tf* 编码的氨基酸序列系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic tree of *Tf* amino acid sequences

号;HM622146)。5'非编码区长 31 bp,3'非编码区长 309 bp,开放阅读框(ORF) 2 025 bp,编码 674 个氨基酸。在 3'非编码区处有一段为真核细胞多聚

腺苷酸 poly(A) 化提供信号的专一序列 AATA-AA,位于多聚腺苷酸前 21 bp 处。利用在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>),对鲢 *Tf* 进

行信号肽预测,结果表明其 N 端 21 个氨基酸为信号肽,长度为 14 个氨基酸,同时第 24~327 个氨基酸以及第 335~665 个氨基酸为 2 个保守的结构域。

2.2 鲢 Tf 系统比对

应用 MEGA 4 对鲢 *Tf* 和其他鱼类的 *Tf* 氨基酸序列构建 N-J 系统进化树,结果见图 1。

图 1 中,鲢与其他 4 种鲤科鱼类——草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲫 (*Carassius auratus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 单独聚为一支。绿色变蜥 (*Anolis sagrei*) 和松狮蜥 (*Pogona vitticeps*) 2 种爬行动物单独聚为一小支后又与非洲蟾蜍 (*Xenopus tropicalis*) 聚为一支。斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) (鲶形目) 单独为一支。鳕形目的 2 种鱼类,太平洋鳕 (*Gadus morhua*) 和黑线鳕 (*Melanogrammus aeglefinus*) 聚为一支。鲈形目的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和胡瓜鱼目的香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 聚为一支。鲑形目鱼类聚为一支。其中,湖红点鲑 (*Salvelinus namaycush*)、雨红点鲑 (*S. pluvius*) 和美洲红点鲑 (*S. fontinalis*) 聚为一小支,(鳟 (*Salmo trutta*) 和安大略鳟 (*S. salar*) 聚为一小支,5 种大麻哈鱼,虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、银大麻哈鱼 (*O. kisutch*)、马苏大麻哈鱼 (*O. masou*)、红大麻哈鱼 (*O. nerka*)、玫瑰大麻哈鱼 (*O. rhodurus*) 聚为一支。4 种南极鱼亚目鱼类,眼斑雪冰鱼 (*Chionodraco rastrospinosus*)、革手南极鱼 (*Notothenia coriiceps*)、肩孔南极鱼 (*Trematomus newnesi*)、头带冰鱼 (*Chaenocephalus aceratus*) 首先聚为一支,之后又与其他 5 种鲈

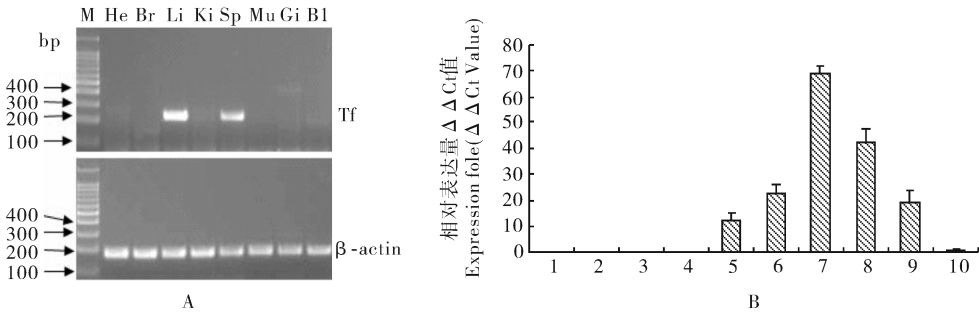
形目鱼类,大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、真鲷 (*Pagrus major*)、棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 聚为一支。聚类分析产生的进化树基本上反应了各参考物种的分类进化地位,由此可以在一定程度上推测鲢的系统进化地位。有研究认为淡水鱼类转铁蛋白的进化相对于海洋鱼类地位低,在本进化树中也得以证实,以鲈形目、鲈形目、鲑形目等为代表的海水鱼类与爬行动物的进化关系要比 5 种鲤科鱼类的进化关系要近,这一结果跟之前的研究^[7]相吻合。

2.3 鲢 Tf 在不同组织的表达分析

为了检测 *Tf* 基因在鲢成体不同组织中的表达模式,本研究对鲢肝脏、脾脏、心脏、脑、肾脏、肌肉、鳃和血液中的 *Tf* 进行了 RT-PCR 检测。结果表明:*Tf* 仅在肝脏和脾脏中表达(肝脏中表达量高于脾脏),在心脏、脑、肾脏、肌肉、鳃和血液中均未检测到表达(图 2-A)。

2.4 鲢 Tf 在胚胎发育过程中的时序表达模式及表达水平

现有研究表明,*Tf* 基因在哺乳动物的胚胎早期,对细胞分化、增殖起到了重要作用,本研究在鲢胚胎发育的早期进行了分期取样检测,样品阶段分别为受精卵、开始卵裂(2~4 细胞)、桑葚期、囊胚中期、原肠中期、神经胚期、尾牙期、肌节出现、肌肉效应期和出苗期。荧光定量 PCR 检测结果显示,*Tf* 基因在至原肠中期开始表达,在尾牙期达到最高峰,之后逐渐减少(图 2-B)。



A. 鲢 *Tf* 在成体各组织中的表达 Tissue-specific expression of *Tf* in silver carp; B. *Tf* 基因在鲢胚胎发育过程中的实时定量检测 Real-Time result of *Tf* in different stage embryos; M: 分子质量标记 Molecule marker; He: 心 Heart; Br: 脑 Brain; Li: 肝 Liver; Ki: 肾 Kidney; Sp: 脾 Spleen; Mu: 肌肉 Muscle; Gi: 鳃 Gill; Bl: 血 Blood; 1: 受精卵 Zygote; 2: 开始卵裂(2~4 细胞) Cleavage; 3: 桑葚期 Morula; 4: 囊胚中期 Blastula; 5: 原肠中期 Gastrula; 6: 神经胚期 Neurula; 7: 尾牙期 Tail bud; 8: 肌节出现 Somite emergence; 9: 肌肉效应期 Muscle contract; 10: 出苗期 Hatching.

图 2 鲢 *Tf* 的组织表达及胚胎发育过程的时序表达

Fig. 2 Tissue-specific expression and expression pattern of *Tf* during embryogenesis in silver carp

3 讨 论

鱼类转铁蛋白的研究已有报道,初期多为生理生化多态性的研究,后期逐步开展了基因克隆与进化、表达特征分析以及作为分子标记的遗传多样性的研究^[8-10]。本研究中克隆的鲢 *Tf* 基因开放阅读框(ORF) 2 022 bp,编码 674 个氨基酸。通过 NCBI 在线比对工具 BLAST 对鲢 *Tf* 氨基酸序列比对,与草鱼同源性最高为 74%,与人乳铁蛋白同源性最低(为 39%),与斑马鱼有 64% 的同源性,其他鲤科鱼类的同源性约 65%~73%,与非鲤科鱼类同源性约 43%~50%,与两栖、爬行、鸟类、哺乳类的同源性约 38%~42%。

Tf 基因在成熟斑马鱼各组织的表达情况,肝脏中大量表达,心脏和肠中微量表达,而在脑、眼、鳃、肌肉、精巢、卵巢中均不表达^[11]。而在草鱼,*Tf* 基因在肝脏中表达量最高,其次是脾和肠,并且在脑、鳃中也有痕量表达,肌肉、肾脏和心脏中不表达^[12]。而对真鲷进行的 *Tf* 组织特异性表达模型研究中,发现其 *Tf* 基因可被诱导在全身表达,而正常情况下仅在肝脏和脑中表达^[13],并认为这是因为转铁蛋白具有广泛的参与机体的免疫防卫功能。肝脏是鱼体重要且具有特殊功能的脏器,是代谢功能最为活跃的器官^[14],同时也是鱼体免疫系统的重要组成部分,能通过吞噬、隔离、消除入侵和内生的各种抗原。脾脏是血液循环系统的一个重要部分,同时也是鱼体最大的周围淋巴样器官,是淋巴细胞迁移和接受抗原刺激后发生免疫应答、产生免疫效应分子的重要场所^[15]。在本试验中,*Tf* 基因仅在成体的肝脏和脾脏中检测到表达,暗示着鲢 *Tf* 基因可能参与到机体组织的免疫、防卫等过程,与其他研究结果一致。

研究发现,哺乳动物的 *Tf* 基因在胚胎早期,对细胞分化和器官生成起到了重要作用。在对小鼠的研究中发现,在妊娠第 6 天的时候可在整个胚胎检测到 *Tf* mRNA 的表达^[16],在胚胎阶段,*Tf* 基因是由位于内胚层的卵黄囊(visceral yolk sac, VYS)合成的,而且还发现一个有趣的现象,就是 VYS 中 *Tf* mRNA 的含量甚至比成体肝脏的含量还要高几倍^[17]。这似乎可以认为在肝脏分化形成之前,是 VYS 合成了胚胎细胞生长所需的 *Tf* 基因。

在作为鱼类动物中最早被确立的模式动物斑马鱼 *Tf* 胚胎表达模式的研究中也有类似的发现。采

用 Northern 杂交的方法,可在受精后 20 h 初次检测到 *Tf* 基因的表达,在之后一直增加直到受精后 24 h,然后在 24~48 h 之间迅速减少^[11]。然而使用整胚原位杂交技术发现,在受精后第 7 小时,*Tf* 基因就开始由卵黄多核体(yolk syncytial layer, YSL)合成,即囊胚期的表胚层^[18]。随着细胞分裂、胚体的下包,细胞数目不断增多,表达量逐渐增多,而随着体细胞的大量增多,卵黄囊细胞在整胚中所占比例减少,从而表现出在 24~48 h 表达量减少的现象。

本试验中,在胚胎发育至原肠中期开始表达,至尾牙期达到最大值,之后逐渐减少。该结果表明 *Tf* 基因在鲢胚胎受精后至囊胚中期细胞分裂和增殖的过程中并未起到显著作用,而在原肠中期开始器官分化和形态建成开始形成的过程中发挥了作用。

参 考 文 献

- [1] HOLMBERG C G, LAUERLL C B. Investigations in serum copper I. Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum[J]. Acta Chem Scand, 1947, 1: 944-950.
- [2] OPPENHEIMER S J. Iron and its relation to immunity and infectious disease[J]. J Nutr, 2001, 131(2): 6165-6255.
- [3] LIU Y L, SUN J H, ZHANG J, et al. Effects of transferrin on the growth and proliferation of porcine hepatocytes: a comparison with epidermal growth factor and nicotinamide[J]. Chin Med J, 2003, 116(8): 1223-1227.
- [4] 朱蓝菲, 蒋一珪. 银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用[J]. 水生生物学报, 1987, 12(2): 105-111.
- [5] 龙华, 刘曼西. 淡水养殖鱼类血清转铁蛋白耐低氧特性的研究[J]. 华中理工大学学报, 2000, 28(1): 84-88.
- [6] YANG L, GUI J F. Positive selection on multiple antique allelic lineages of transferrin in the polyploid *Carassius auratus* [J]. Mol Biol Evol, 2004, 21(7): 1264-1277.
- [7] 李多云, 陈炯, 张祖兴, 等. 大黄鱼转铁蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(6): 563-568.
- [8] 甘云飞, 邹青青, 盛军庆, 等. 江西 3 种红鲤血清转铁蛋白遗传多样性[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2008, 32(5): 486-488.
- [9] 李多云, 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]. 科技通报, 2009, 25(6): 753-757.
- [10] LOK C N, LOH T T. Regulation of transferrin function and expression: review and update[J]. Biol Singals Recept, 1998 (7): 157-178.
- [11] SUDHA P M, WAN H Y, MALKEET S, et al. Expression analyses of zebrafish *transferrin*, *tfabp*, and *elastaseB* mRNAs as differentiation markers for the three major endodermal organs: liver, intestine, and exocrine pancreas[J]. Developmental

Dynamics, 2004, 230: 165-173.

[12] 王娜, 陈琼, 胡成钰. 草鱼转铁蛋白的克隆和组织表达[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 51-56.

[13] 蔡忠华, 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.

[14] JACQUES B, GEMMA G A. The structure and function of fish liver[M]. New Hampshire: USA Science Publishers, 1996: 77-93.

[15] FANGE R, NILSSON S. The fish spleen: structure and function[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1985, 41: 152-158.

[16] PLOWMAN G D. Characterization and expression of the melanotransferrin gene[D]. Seattle: University of Washington, 1986.

[17] EKBLOW P, THESLEFF I. Control of kidney differentiation by soluble factors secreted by the embryonic liver and the yolk sac[J]. Dev Biol, 1985, 110: 29-38.

[18] TETSUHIRO K, MICHEAL T, NEIL A H, et al. A gene expression screen in zebrafish embryogenesis[J]. Genome Res, 2001, 11: 1979-1987.

Whole sequence of cDNA cloning and tissue expression analysis of transferrin gene in *Hypophthalmichthys molitrix* during embryogenesis

ZHANG Zhi-wei^{1,2} LI Zhong² LIANG Hong-wei²
LUO Xiang-zhong² LI Lin^{1,2} ZOU Gui-wei^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430060, China

Abstract Full length cDNA of silver carp transferrin, *Hypophthalmichthys molitrix*, was first cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and SMART RACE methods. The entire transferrin cDNA sequence is 2 365 bp long and the open reading frame is 2 025 bp and encodes a protein with 674 amino acids. Molecular characteristics of the gene were forecasted by online molecular softwares. The results showed that it is composed of two domains, with a signal peptide of 15 amino acids which located at the 21st amino acid of N-terminal. Silver carp transferrin gene has high homology with the other species, sharing the highest identity of 74% with grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Phylogenetic tree analysis revealed that transferrin of five Cyprinid fish, *Danio rerio*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella* and *Hypophthalmichthys molitrix* were classified together. Silver carp transferrin mRNA only expressed in liver and spleen (a higher expression level in liver). During embryogenesis, the expression of transferrin mRNAs was first detected at the gastrula stage and the expression level increased steadily until the tail bud embryo. Transferrin mRNA showed marked reduction after the stage of tail bud embryo until larvae. Results from the present study indicated that transferrin played an important role in organogenesis during embryogenesis.

Key words transferrin; silver carp; RACE; real-time PCR

(责任编辑: 边书京)