

红鳍东方鲀 *MIF* 基因的鉴定及生物信息学分析金红建^{1, 2} 邵健忠² 项黎新²

(1. 中国计量学院生命科学院, 杭州 310018; 2. 浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

IDENTIFICATION AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF *FUGU RUBRIPES MIF* GENEJIN Hong-Jian^{1, 2}, SHAO Jian-Zhong² and XIANG Li-Xin²

(1. College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018; 2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

关键词: 红鳍东方鲀; *MIF*; 生物信息学Key words: *Fugu rubripes*; *MIF*; Bioinformatic

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)01-0135-04

巨噬细胞游走抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF), 最早是在 1966 年研究迟发型过敏反应中发现的细胞因子。Weiser 等于 1989 年首次克隆了人 *MIF* 基因^[1]。Bernhagen 等发现, 当垂体前叶细胞暴露于内毒素脂多糖 (LPS) 后, 就会释放 MIF 分子, 表明 MIF 是联系内分泌和免疫系统的中介因子^[2]。研究发现, MIF 能激活细胞外信号调节激酶 1 (ERK1)/ERK2——有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPKs) 家族的成员^[3]。MIF 上调 TLR4 的表达, 从而促进了机体对含内毒素细菌的侦察, 使位于宿主抗微生物防卫系统第一线的细胞, 如巨噬细胞, 能迅速对入侵的微生物起反应^[4, 5]。此外, MIF 还能抑制 p53 活性^[6]。报道称, MIF 能抑制 IgE 的合成, 并且它具有特异性抗原抑制因子的活性^[7]。可见, MIF 作为宿主感染和应激反应的调节因子发挥重要作用^[8]。T 细胞组成型表达 MIF^[9], MIF 抑制对细胞毒性 CD8 + T 细胞的调节效应^[10], 所以 MIF 在适应性免疫系统中同样具有重要的功能。

哺乳动物、鸟类、两栖类和寄生虫, 以及某些植物等已知的 MIF 具有较高同源性, 物种间 MIF 的保守性暗示了 MIF 可能有重要的生物学功能^[11]。然而, 目前鱼类中有关 MIF 的研究很有限, 仅有两种无颌鱼盲鳗、海七鳃鳗以及一种有颌鱼 *P. chilotes* 等有序列报道^[12]。脊索动物文昌鱼中最近也发现有 *MIF*^[13]。我们采用生物信息学技术, 成功地在红鳍东

方鲀 (*Fugu rubripes*) 基因组中鉴定了 *MIF* 基因 (*FrMIF*)。研究结果为今后利用基因组信息资源和生物信息学快速克隆新的鱼类功能基因打下了方法学基础, 也为进一步研究鱼类 *MIF* 基因功能提供了重要线索。

1 材料与方法

1.1 *FrMIF* 基因的鉴定 用人 *MIF* 氨基酸 (Q99836) 序列为查询序列对红鳍东方鲀基因组数据库 (<http://genome.jgi-psf.org/fugu6/>) 进行 tblastn 分析, 将检索到的匹配结果用 GenScan、FGENESH 等基因识别软件预测可能的编码信息, 预测到的蛋白质序列均提交到 Swiss-Prot 数据库中进行 BLAST 搜索分析。将获得的 *FrMIF* 进一步分析, 搜索 PROSITE 数据库预测功能域, SignalP V3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 软件预测信号肽, 用 ExPasy 提供的在线软件 (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测等电点和分子量。

1.2 序列比对及系统进化分析 从 GenBank、SwissProt 数据库获取已经报道的 *MIF* 基因的蛋白质序列, 蛋白质多序列比对采用 Clustal W 方法, 用 Mega^[14] 软件建立包括红鳍东方鲀在内的 20 个物种的 *MIF* 分子进化树。用于系统进化树构建的各个物种的 *MIF* 的蛋白质及其 GenBank 或 Swiss-port Accession Numbers 分别是: 人 Human, P14174; 猴 *Rhesus macaque*, Q6DN04; 猪 Pig, P80928; 绵羊 Sheep, Q30DR4; 牛 Bovine,

收稿日期: 2004-12-30; 修订日期: 2006-11-19

基金项目: 国家自然科学基金 (30371096、30571423、302710153); 浙江省自然科学基金 (Z305039); 高等学校博士学科点专项基金 (20030335040) 资助

作者简介: 金红建 (1976—), 男, 浙江永康人; 讲师, 博士研究生; 研究方向为鱼类分子免疫学。Tel: 0571-86835701, E-mail: jinjh@cjl.edu.cn

通讯作者: 邵健忠 (1963—), 男, 浙江嘉兴人; 教授, 博士研究生导师; 研究方向为鱼类细胞与免疫学。Tel: 0571-88206582, E-mail: shaojz@zju.edu.cn

P80177; 小鼠 Mouse, P34884; 大鼠 Rat, P30904; 鸡 Chicken, Q02960; 非洲爪蟾 *Xenopus laevis*, Q76BK2; *Paralabidochromis chilotes*, Q7ZZB7; 大西洋盲鳗 *Myxine glutinosa*, Q86BT2; 海七鳃鳗 *Petromyzon marinus*, Q7ZZB8; 文昌鱼 *Branchiostoma belcheri*, Q698K1; 美洲花蜱 *Amblyomma americanum*, Q9GUA9; 班氏丝虫 *Wuchereria bancrofti*, Q44786; 毛首鞭形线虫 *Trichuris trichiura*, Q9U920; 马来布鲁丝虫 *Brugia malayi*, Q9NAS2; 线虫 *Caenorhabditis elegans*, Q9U228; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, Q2Q493。

1.3 不同生物 MIF 基因结构的比较 用 NCBI mapviewer 获取其他物种(鸡、大鼠、小鼠、人)的 MIF 基因的染色体定位和基因组 DNA 序列信息。利用 BLASTN 和 SIM4 将每种生物的 MIF 基因组序列和其相应的 cDNA 序列进行比较,得到每种生物 MIF 基因的外显子、内含子的数目及大小。

2 结果与讨论

2.1 FrMIF 基因的鉴定

用人 MIF 氨基酸(Q99836)序列为查询序列对红鳍东方鲀基因组数据库进行 tblastn 分析,发现 Q99836 与 scaffold_2118 的 4169—7056 序列相匹配。从数据库中获得匹配序列及其上、下游各 1000bp 序列,预测可能的编码信息。发现的 FrMIF 基因由 3 个外显子和两个内含子组成,3' 端发现在终止密码子下游 61bp 处有 1 个 ATTTA, PolyA 加尾信号在终止

密码子下游 130bp 处(图 1)。蛋白质序列提交到 SwissProt 数据库中进行 BLAST 搜索分析,结果显示,FrMIF 与已知的其他物种 MIF 高度同源。在小鼠基因组中发现有 9 个 MIF 假基因^[15],马来布鲁线虫基因组中发现有 2 个拷贝^[16],最近 Genbank 中登陆的文昌鱼 MIF 也有两个拷贝,但是,已报道的盲鳗、海七鳃鳗以及 *P. chilotes* 等鱼类 MIF 都只发现 1 个拷贝^[12],在红鳍东方鲀基因组中是否只存在 1 个 MIF 拷贝,尚难以定论。

FrMIF 基因编码 115 氨基酸,预测其分子量大小为 12.4kDa,等电点 pI 为 7.40,其氨基酸组成特点是酸性氨基酸(Asp 和 Glu)残基数为 9(7.8%),碱性氨基酸(Arg 和 Lys)残基数为 9(7.9%),表明 FrMIF 蛋白为微碱性蛋白质。根据 Kyte 和 Doolittle 的方法^[17],对 FrMIF 多肽的疏水/亲水性进行了分析,结果显示,其疏水性平均值(average hydrophobicity)为 0.05,和其他已知蛋白比较,FrMIF 是可溶性蛋白。

用 SignalP 3.0 程序,对 FrMIF 多肽序列中信号肽的剪切位点进行了预测,结果显示 FrMIF 多肽 N-端不存在信号肽,也表明它不是通过传统的蛋白分泌途径从细胞释放的。

通过搜索 PROSITE 和 Pfam 数据库,获得了 FrMIF 多肽序列中可能包含的结构域和功能位点,以确定其所属的蛋白质家族。结果,FrMIF 氨基酸序列中包含 1 个 N-酰基化位点 GISPNR(89—94),此外还包含 1 个 Pfam profile—PF01187(MIF domain)(2—115)。可见,我们获得的 FrMIF 确实属于 MIF 蛋白质家族。

```

AAGAAGACTGCACTTCCGCCGCTTACAGAAAGCGTCAATTTCCAAGATATAAGGTCTGTCTCTTTCCGATTGGCAAAGACTGCA
GCAATAAATTAATAATCATGCCGATTTTTGGTGAATACCAACGTAAGCAAGGCTGACGTGCCTGTGCTCTGCTATCCGAGGC
M P I F V V N T N V A K A D V P V A L L S E A
TACCAATGAGCTGGCTAAAGCTATGGGAAACCTGCACAGCagagacatgtaacctttacattctccttgggttgcagctctgaaaa
T N E L A K A M G K P A Q
tacaccttaagggctcacatatttggatagtaaaagcaagaatttatatggtagaaggcaaaccttgcaaacattctaacatgcag
ctaaattacaatataatgacactgaaaaagcagaacaaaatctgatgaaacagatgctctgagtttacagcagaattttcagaa
ttctctctgctttataataacatggacctatgtttacaagataactactgaggggtataaccactcatttacaccactcattgtt
gtgtgtttctcttctcagTACATTGCTGTGCACATCAACACTGACCAAGATGATGATGTTGGAGGAAAAGGAGACCCCTGTGCTC
Y I A V H I N T D Q M H H F G G K G D P C A
TCTGCTCCCTGCACAGTATTGGTAAGATCAATGGAGCTCAAAAACAAGCAATACTCCAAACTCTTGTGTGATCAGCTCAGCAAA
L C S L H S I G K I N G A Q N K Q Y S K L L C D Q L S K
ACCTGGGATCTCTCCTAACAGCagagggaggaaatggcctcactcttgacagtgcatgatacttatgcaatacattaactg
H L G I S P N R
atactcatttgaattctctttctacactattctctgttctcagGATTTTATATTAACTTTGTTGACATGGATGCAGCCAAATGTCTG
I Y I N F V D M D A A N V
GCTGGAGCAGCGATACCTTTGCTGAGCTCTCTACACTGCAATAGAAGATCATTCCATTATTTACTACATGTGCAATGTCAAT
G W S S D T F A *
CAAATTTAAAGATGACTGCTAGTCTAGGGGTCACAATCTACACAGTCACATACAATACACGTTTGAATTCCAATAAAATACATA
TACTGTATATACATGTTCTTTCTTTTGATAAGCTGTCTGTGAGAAATACATTGTTTTATCTGTAATAATAACTGAGTCACAGT

```

图 1 FrMIF 基因组序列及外显子所翻译的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences for FrMIF

星号代表终止密码子,下划线部分为 PolyA 信号保守序列,斜体部分为 RNA instable motif

The stop codon is indicated by an asterisk and the consensus sequence (AATAAA) for polyadenylation is underlined. The RNA instable motif (ATTTA) is in italics.

2.2 序列比对及系统进化分析

多序列联配显示,FrMIF 氨基酸序列与其他 19 种不同生物 MIF 蛋白质序列有普遍的相似性。FrMIF 与哺乳动物 MIF 的序列等同性(identity)为 66.7%—70.9%,鸟类 66.7%,两栖类 62.4%,鱼类 39.3%—76.9%,脊索动物 40.9%,寄生虫 36.8%—44.3%,植物 32.5%(图 2)。可见,FrMIF 与有颌鱼类 *P. chilotes* 的 MIF 相似性最高达 76.9%,而与无颌鱼类(盲鳗和海七鳃鳗) MIF 的相似性仅为 39.3%—52.2%,与各种

寄生虫 MIF 的相似性仅为 36.8%—45.3%。

蛋白质多序列比对采用基于氨基酸相对突变率矩阵 PAM250 的 Jotun Hein 方法。来源相同的物种在进化树上往往聚集成簇。结果显示, MIF 基因可归为几个大簇,包括哺乳动物、鸟类/两栖类、有颌鱼类(*P. chilotes* 和红鳍东方鲀)、无颌鱼类(盲鳗、海七鳃鳗)、脊索动物(文昌鱼)、寄生虫(美洲花蜱、美丽线虫、毛首鞭形线虫、马来布鲁线虫和班氏丝虫)和植物(拟南芥)。其中,FrMIF 和 *P. chilotes* MIF 在进化上的距离最短(图 3)。

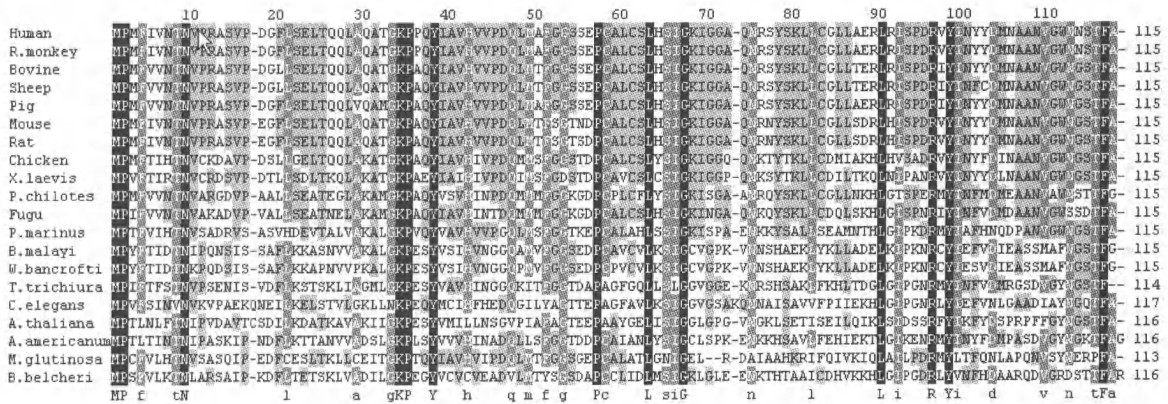


图 2 FrMIF 与其他 19 种生物 MIF 基因的氨基酸序列同源性比较

Fig.2 Alignment of the predicted amino acid sequence of the FrMIF with those of corresponding proteins in other 19 organisms

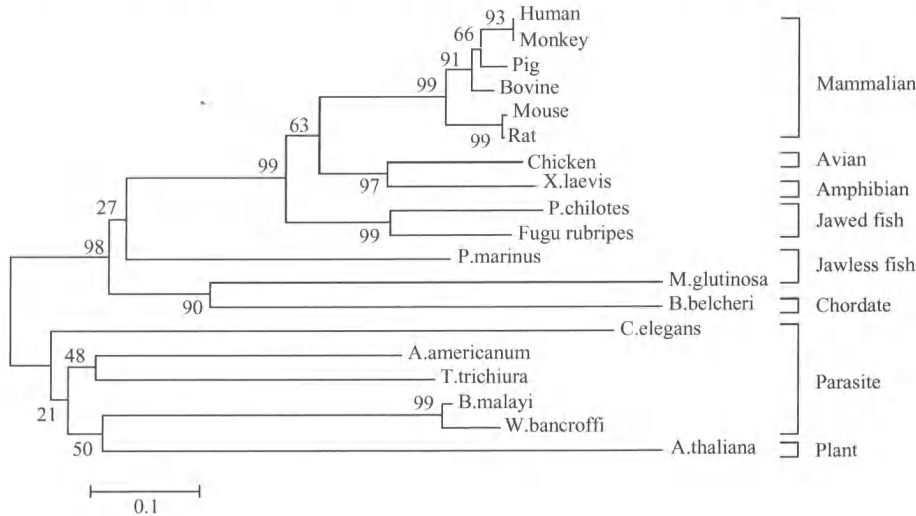


图 3 FrMIF 的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic tree showing the evolutionary relationship of FrMIF with other proteins of the MIF family

2.3 不同生物 *MIF* 基因结构的比较

预测的 *FrMIF* 内含子 5' 和 3' 的剪接一致序列都是 GT/CAG(图 1)。人、小鼠、大鼠、鸡和 *Fugu* 的 *MIF* 基因都具有三个外显子、两个内含子,可见 *MIF* 基因的外显子/内含子结构

物种间高度保守。尽管不同物种的 *MIF* 基因内含子大小、5'UTR 和 3'UTR 长度各不相同,但是 *FrMIF* 的 3 个外显子编码的氨基酸残基数目和人、小鼠、大鼠、鸡完全一致,分别为 36、58、21(图 4)。表明 *MIF* 基因结构在脊椎动物进化中是高度

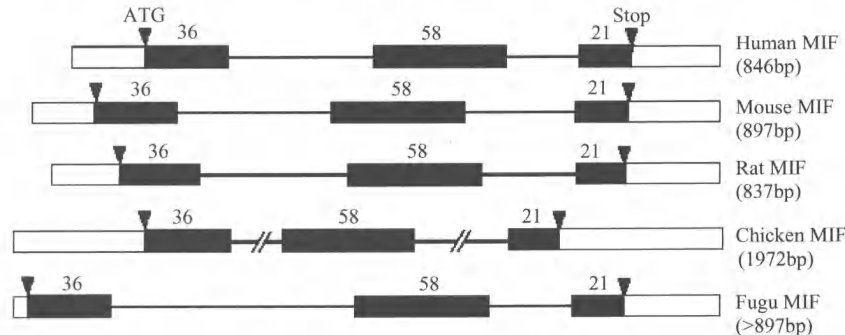


图 4 5 种不同生物 *MIF* 基因结构比较

Fig.4 Comparison of the genomic organization of *MIF* genes from 5 species

盒子代表外显子,水平线代表内含子;开放阅读框和非翻译区分别用黑盒子和白盒子表示;外显子上的数字代表每个外显子编码的氨基酸残基数
Boxes represent exons and horizontal lines adjacent to exons represent introns. Open reading frames and untranslated regions as shown as black boxes and white boxes, respectively. The numbers of the amino acid residues coded by the exon are indicated above.

的保守的,暗示 *MIF* 可能具有重要的生物学功能。

随着一批模式生物基因组测序工作的陆续完成,鱼类免疫学领域取得了诸多进展^[18]。当前,如何利用越来越丰富的基因组信息资源,揭示基因在不同物种间的遗传与进化规律、探索基因的生物学功能以及发现和鉴定新的功能基因,已成为当前基因组学研究的核心任务。在众多物种中,红鳍东方鲀因其基因数目和人类接近,但其基因组结构却非常紧凑而引起了人们的极大关注^[19]。以红鳍东方鲀为模式生物开展比较基因组学研究,不仅对加速鱼类基因结构与功能研究具有重大意义,而且对人类基因进化与功能等研究也将产生巨大的推动作用。

我们应用生物信息学技术,首次成功鉴定了 *Fr-MIF* 基因并进行了生物信息学分析,为进一步开展 *MIF* 在鱼类中的生物学功能研究打下了基础。此外,我们还通过生物信息学方法,在斑马鱼和草鱼等鱼类中鉴定了一批免疫功能基因如 *ILF*、*NKEF*、*QM* 等在鱼类中的同源序列^[20]。上述研究验证了利用数据库搜索鉴定鱼类新基因的可行性,这也是我们应用生物信息学技术作为基因克隆辅助手段,克隆鱼类功能基因的一次有意义的尝试。可以预见,今后几年,基因组及 EST 分析必将作为指导鱼类和其他物种新基因克隆的重要辅助手段而得到广泛应用^[21]。

参考文献:

- [1] Weiser W Y, Temple P A, Witek-Giannotti J S, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, **86**(19): 7522—7526
- [2] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell R A, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia [J]. *Nature*, 1993, **365**(6448): 756—759
- [3] Mitchell R A, Metz C N, Peng T, et al. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(25): 18100—18106
- [4] Roger T, David J, Glauser MP, et al. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4 [J]. *Nature*, 2001, **414**(6866): 920—924
- [5] Roger T, Froidevaux C, Martin C, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4) [J]. *J Endotoxin Res*, 2003, **9**(2): 119—123
- [6] Mitchell R A, Liao H, Chesney J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, **99**: 345—350
- [7] Ishizaka K, Ishii Y, Nakano T, et al. Biochemical basis of antigen-specific suppressor T cell factors: controversies and possible answers [J]. *Adv Immunol*, 2000, **74**: 1—60 (Review)
- [8] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3**(10): 791—800
- [9] Bacher M, Metz C N, Calandra T, et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**(15): 7849—7854
- [10] Abe R, Peng T, Sailors J, et al. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor [J]. *J Immunol*, 2001, **166**(2): 747—753
- [11] Pastrana D V, Raghavan N, FitzGerald P, et al. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor [J]. *Infect Immun*, 1998, **66**(12): 5955—5963
- [12] Sato A, Uinuk-ool T S, Kuroda N, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) of jawed and jawless fishes: implications for its evolutionary origin [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, **27**(5): 401—412
- [13] Du J, Xie X, Chen H, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in chinese amphioxus as a molecular marker of immune evolution during the transition of invertebrate/vertebrate [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, **28**(10): 961—971
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, **5**(2): 150—163
- [15] Bozza M, Kolakowski L J, Jenkins N A, et al. Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes [J]. *Genomics*, 1995, **27**(3): 412—419
- [16] Zang X, Taylor P, et al. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode: Gene cloning, protein activity, and crystal structure [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(46): 44261—44267
- [17] Kyte J, Doolittle Rv F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. *J Mol Biol*, 1982, **157**: 105—132
- [18] Zhang Y B, Zhang Q Y, Gui J F. Interferon system and identification of Interferon system genes in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 317—322 [张义兵,张奇亚,桂建芳. 鱼类干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定. 水生生物学报, 2004, **28**(3): 317—322]
- [19] Aparicio S, Chapman J, Stupka E, et al. Whole-enome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes* [J]. *Science*, 2002, **297**(5585): 1301—1310
- [20] Jin H J, Wan L Z. Electronic cloning and analysis of zebrafish *ILF2* gene [J]. *Journal of China Institute of Metrology*, 2003, **14**(1): 70—73 [金红建,王兰州. 斑马鱼 *ILF2* 基因的电子克隆分析. 中国计量学院学报, 2003, **14**(1): 70—73]
- [21] Hu Y, Kong D D, He Y K. On-line cloning and evolution and analysis of *CrMinD* gene from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(1): 106—109 [胡勇,孔东东,何奕昆. 衣藻 *CrMinD* 基因的网上克隆及其进化分析. 水生生物学报, 2004, **28**(1): 106—109]