

黄鳍金枪鱼巨噬细胞移动抑制因子(MIF)的克隆与序列分析

毛 勇^{1,2}, 王 军¹, 张之文¹, 王 定¹, 苏永全¹

(1. 厦门大学 海洋环境学院, 福建 厦门 361005; 2. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要:采用同源克隆的方法、利用 RACE 技术从黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)肝脏中克隆了其 MIF (TaMIF)的 cDNA 序列。TaMIF 的 cDNA 全长 706 bp 含一个 345 bp 的开放阅读框, 编码一个长 115 氨基酸的蛋白质。信号肽预测分析表明 TaMIF 没有信号肽。序列分析与进化分析表明, 黄鳍金枪鱼与近海养殖鱼类 MIF 的氨基酸序列高度相似, 进化地位相近, 预示着深海鱼类 TaMIF 与近海养殖鱼类具有相似的生物学功能。研究结果是对深海鱼类 MIF 基因信息资料的重要补充。

关键词:黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*); 巨噬细胞移动抑制因子(MIF); 分子克隆; 序列分析
中图分类号:Q173 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2009)09-0029-06

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)最初被认为是一种能抑制巨噬细胞移动的前炎症细胞因子^[1]。Weiser 等^[2]于 1989 年首次克隆了人 MIF 基因。MIF 是哺乳动物宿主炎症反应不可缺少的组成成分^[3~5]。MIF 还参与哺乳动物很多急性、慢性炎症反应的发病机制, 包括败血症、关节炎、肾小球肾炎、炎性肠炎和特异性皮炎等^[6]。但是 MIF 的过度表达, 会引起免疫系统功能紊乱, 出现全身性炎症反应综合症。

哺乳动物、鸟类、两栖类和寄生虫, 以及某些植物已知的 MIF 具有较高的同源性, 物种间 MIF 的同源性暗示 MIF 可能具有重要的生物学功能^[7]。最近, 从鱼类如斑马鱼(*Danio rerio*)和黑青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)中都分离到了 MIF 的同源体。发现鱼类 MIF 影响胚胎的增殖与分化^[8], 抑制巨噬细胞的移动^[9]。然而, 鱼类 MIF 的资料依然有限, 尤其是深海鱼类 MIF 的资料十分缺乏。

黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)是一种大洋洄游性鱼类^[10], 作者发现将其捕捞运输到近海进行人工养殖时, 受近海病原菌感染而死亡严重。而深海环境与近海环境之间在病原菌的种类和数量上都存在较大的差别, 黄鳍金枪鱼的免疫系统能否有效地检测和防御近海病原菌的感染? 深海鱼类的炎症感染机制是否与近海鱼类相似? 这是解析黄鳍金枪鱼近海养殖高死亡率亟待解决的问题。为此, 作者对黄鳍金枪鱼前炎症细胞因子 MIF(TaMIF)的 cDNA 序列进行了克隆鉴定并进行了进化分析, 探寻深海鱼类与浅海养殖鱼类 MIF 的差异。研究结果不仅有助于了解鱼类 MIF 的进化, 还将为揭示深海鱼类炎症疾病的发生机制提供基因信息资料。

1 材料与方法

1.1 金枪鱼的捕捞运输与近海暂养

2007 年 9 月, 黄鳍金枪鱼 280 条于台湾海峡海域钓捕之后, 通过活水船运输到福建省东山县, 平均体长 36.58 cm ± 2.61 cm, 平均体质量 0.81 kg ± 0.19 kg, 在水深 3 m 多的水泥池中暂养, 观察运输过程中擦伤形成的创口的感染症状。

1.2 分子克隆

1.2.1 RNA 提取、cDNA 合成

实验黄鳍金枪鱼的肝脏在 Trizol (Invitrogen) 中匀浆后, 按照说明书一步法提取总 RNA。再取 2 μg 的总 RNA 进行反转录反应。采用 M-MLV 反转录酶(Promega), 按说明书的方法合成 cDNA, 合成的 cDNA 冻存于 -20℃ 保存。

1.2.2 MIFcDNA 克隆

利用 NCBI 的 BLAST 来比对不同物种的 MIF 序列。根据硬骨鱼类间 MIF 基因的高度保守序列设计两个简并引物 F(5'-GTTC(/T)GTGGTGAA-CACCAACGT-3') 和 R(5'-GATGCCAGG(/A)TGTTTGTGAG-3'), 以肝脏的 cDNA 为模板进行常规 PCR, 克隆黄鳍金枪鱼 MIF 的 cDNA 片断, 退火温度为 53℃。PCR 仪是 GeneAmp PCR System 9700(ABI, USA)。

根据所获 MIF 的 cDNA 片断设计基因特异性引物进行 RACE 扩增, 方法按照 Smart RACE cDNA 合成试剂盒(Clontech)说明书进行。用来扩增 MIF

收稿日期: 2009-06-12; 修回日期: 2009-07-02

基金项目: 福建省科技重大专项(2004NZ03)

作者简介: 毛勇(1970-), 男, 湖南张家界人, 高级工程师, 博士研究生, 主要从事海洋生物学研究, 电话: 13606993858, E-mail: maoyong8888@sohu.com; 苏永全, 通信作者, E-mail: yqsu@jingxian.xmu.edu.cn

3'RACE 的引物序列为 F1(5'-TGATGTTTGGAG-GAAAGGGAGAC-3')和 F2(5'-CTCCACAGTAT-TGGCAAGATCAG-3'),扩增 5'RACE 的引物序列分别为 R1(5'-GATCTTGCCAATACTGTGGAGGG-3')和 R2(5'-GGTCTCCCTTTCCTCCAAACATC-3')。PCR 产物经凝胶电泳纯化后克隆到 pMD-19T 载体 (TaKaRa, Japan),然后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。在含氨苄的 LB 培养基中生长的阳性克隆,经 PCR 鉴定后提交送上海英骏生物科技有限公司测序。通过将扩增片断和引物序列重叠比对获得黄鳍金枪鱼 cDNA 的全长序列。

1.2.3 序列分析

运用 BLAST 程序 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)对所得 TaMIF 的氨基酸序列在 Genebank 上进行同源检索;运用 DNASTAR 中的 MegAlign 软件进行多重序列比较和计算脊椎动物不同物种 MIF 之间的同一性 (Identity),基于 Neighbor-Joining(NJ)方法用 MEGA3.0 构建系统进化树;用 Swiss model server 的 http://swissmodel.expasy.org 的软件进行蛋白质的二级结构预测分析。序列比对、相似性分析及系统进化树构建所涉及物种及其 MIF 蛋白质的 GenBank 登录号为^[7]:黄鳍金枪鱼 FJ447490;斑马鱼 NP_001036786;黑青斑河豚 ABG54278;大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) (FJ415099);眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) (FJ447488);底鲮 (*Fundulus heteroclitus*) (ABG54276);大唇朴丽鱼 (*Haplochromis chilotes*)

(ABG54275);副锯丽鱼 (*Paralabidochromis chilotes*) (AAP33794);大西洋鲑 (*Salmo salar*) (NP_00111708);虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (NP_001118053);鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) (EU368584);红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) (NP_001027889);小家鼠 (*Mus musculus*) (NP_034928);褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) (NP_112313);牛 (*Bos Taurus*) (NP_001028780);人 (*Homo sapiens*) (CAG46452);野猪 (*Sus scrofa*) (NP_001070681);马 (*Equus caballus*) (XP_001489661)。

2 结果

初步发现,黄鳍金枪鱼在由外海运输到内海环境进行养殖时,钩捕及运输擦伤引起的创口受到了较为严重的感染,并且其表皮症状与普通养殖品种擦伤引起的感染大不一样。擦伤创口感染后并不呈表面扩大,而是向内形成椭圆形孔状的溃烂,透达肌肉层和脂肪层,有的甚至见骨,导致死亡。擦伤鱼的 7 天死亡率高达 80% 以上。

本研究还克隆和分析了黄鳍金枪鱼中的前炎症细胞因子 MIF 的 cDNA 序列,发现黄鳍金枪鱼 MIF 的 cDNA 序列包括 124 bp 的 5'UTR,345 bp 的开放阅读框,237 bp 的 3'UTR,总计全长 706 bp,3'端含有两个连续的加尾信号 AATAAA 和一个 poly(A) 尾巴(图 1)。

```

CCAGCCACGTGATTCTCTGAAAGAGGTAACGGGTATTGCTTCATTCTCCGCTGCTGGACAGTTTTATGCAG
CGTTACAGCTTTCCGAGGAGCAGAAAAGAGGCACTCAAAGAATAATCATGCCGATGTTCTGGTGAACACTAA
M P M F V V N T N
CGTGGCCAAAAGCGACGTACCGGGCTCTGCTGTCTGAGGCCACCGAGGAGCTCGCCAAAGCTATGGGCAAACC
V A K S D V P A A L L S E A T E E L A K A M G K P
TGCACAGTACATTGCTGTGCATATCAACCTGACCAAAATGATGATGTTTGGAGAAAAGGAGACCCCTGCGCCCT
A Q Y I A V H I N P D Q M M M F G G K G D P C A L
CTGCTCCCTCCACAGTATTGGCAAGATCAGTGGTGCACACAACAAGCAATACTCTAAACTCTGTGTGGACTGCT
C S L H S I G K I S G A H N K Q Y S K L L C G L L
CAACAAACCTGGGCATCTCTGCTGACAGGATTTATATTAACCTTGTAGACATGGATGCAGCCAATGTGGCCTG
N K H L G I S A D R I Y I N F V D M D A A N V A W
GAACAACACTACCTTTGGCTGATGGATGTCAACACTGAAACAGAAGATCATTCCAGTATTTTCTCCATGT
N N T T F G
ATGAACAAAATTAAGAGACAAAATGAAGAAGAAAATACCTGGTTATTCATTGGTTAATATATTGTATGGCTA
TGTTACAAGCACTTAAATGGACCATTAGGTTTGCCTGATCCTGCTCAATTCGAATGCAATAAAATAAACCTG
TATAACATCACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 1 黄鳍金枪鱼 MIF 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 cDNA and amino acid sequence of TaMIF

据推算,黄鳍金枪鱼的 MIF 蛋白有 115 个氨基酸,分子质量约为 12.35 ku,等电点为 7.303,其氨基酸组成特点是酸性氨基酸(Asp 和 Glu)残基数为 9,碱性氨基酸(Arg 和 Lys)残基数为 9。疏水性氨基酸为 43,亲水性氨基酸 29。

用 SignalP3.0 程序,对黄鳍金枪鱼 MIF 多肽序列中信号肽的剪切位点进行了预测,结果显示黄鳍金枪鱼 MIF 多肽 N-端不存在信号肽,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 Pfam 数据库,获得了 TaMIF 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,TaMIF 氨基酸序列中包含 1 个 Pfam profile-PFam01187(MIF domain)(2-115)。可见,我们获得的 TaMIF 确实属于 MIF 蛋白质家族。二级结构预测还表明,TaMIF 由 2 个 α 螺旋和 6 个 β 折叠片按 $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 3\beta 4\beta 5\beta 6$ 的顺序构成(图 2)。

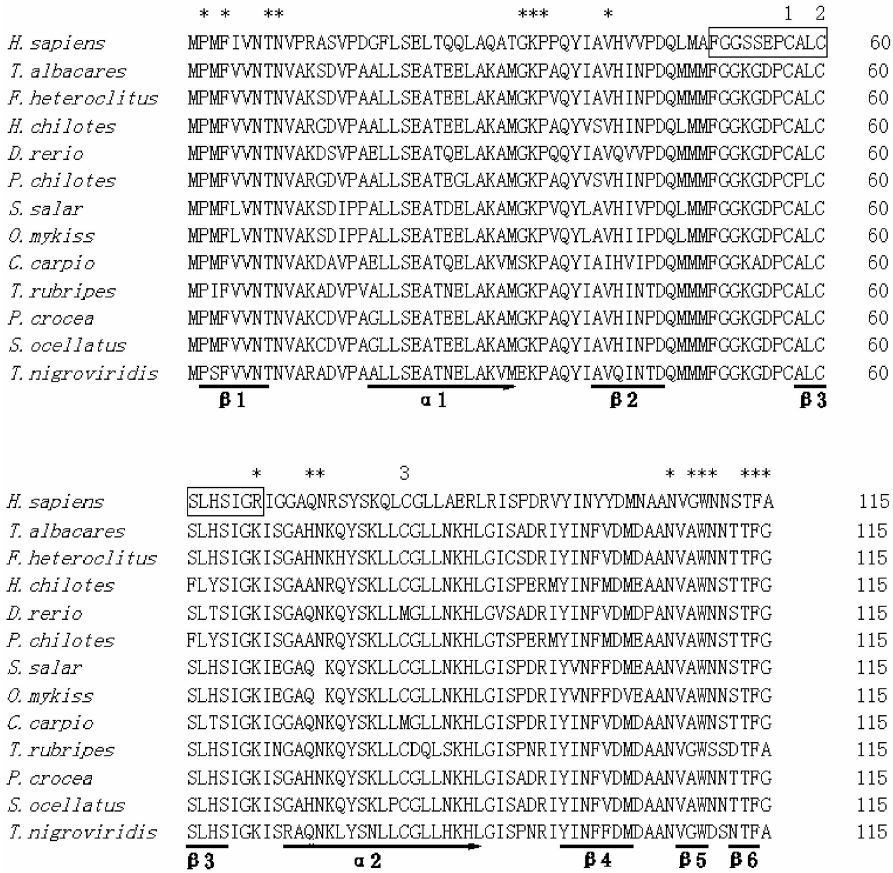


图 2 人和鱼类 MIF 氨基酸序列比对及序列分析

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of human and selected fish MIFs

* 和方框分别指与人 MIF 催化活性和免疫调节活性有关的氨基酸; 1~3. 指黄鳍金枪鱼 MIF 中的 cys; 箭头和直线分别指黄鳍金枪鱼 MIF 的 α 螺旋和 β 折叠片

positions believed to be involved in the catalytic activity are indicated with asterisks; positions believed to be involved in immunomodulatory activity are designated with frame; three cysteines are marked with number 1~3; regions predicted to be α -helices and β -strands in MIF of *P. crocea* are indicated at the bottom of the alignment by lines and arrows respectively

通过氨基酸序列的相似性分析,在脊椎动物不同物种的 MIF 之中,黄鳍金枪鱼的 MIF 与鱼类 MIF 氨基酸的同源性在 81.7%~98.3% 之间,其中与大黄鱼的同源性最高,达 98.3%;与黑青斑河豚的同源性最低为 81.7%。黄鳍金枪鱼 MIF 与哺乳动物 MIF 的同源性也较高,为 66.1%~71.3%,其中与

人的 MIF 的同源性达 66.1%(表 1)。系统进化树结果表明,哺乳动物和鱼类的 MIF 在进化树上分别聚类成簇,其中黄鳍金枪鱼与近海养殖鱼类大黄鱼和眼斑拟石首鱼的亲缘关系都非常接近,进化地位相当(图 3)。

表 1 黄鳍金枪鱼 MIF 与其它脊椎动物 MIF 的氨基酸序列两两之间的同一性比较(100%)

Tab. 1 Amino acid sequence percent identities between selected vertebrate MIFs(100%)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	序号及物种
98.3	97.4	96.5	87	85.2	86.1	86.1	87.8	86.1	85.2	81.7	67.8	67.8	71.3	66.1	69.6	68.7	1	黄鳍金枪鱼
	99.1	94.8	86.1	84.3	84.3	84.3	87.8	86.1	84.3	80.9	68.7	68.7	72.2	67	70.4	69.6	2	大黄鱼
		93.9	85.2	83.5	83.5	83.5	87	85.2	83.5	80	67.8	67.8	71.3	66.1	69.6	68.7	3	眼斑拟石首鱼
			84.3	82.6	85.2	85.2	85.2	83.5	82.6	80	66.1	66.1	69.6	65.2	67.8	67	4	底鲆
				96.5	80.9	80.9	77.4	79.1	78.3	77.4	67	67	69.6	64.3	67.8	67	5	大唇朴丽鱼
					77.4	77.4	76.5	77.4	76.5	75.7	64.3	64.3	67	61.7	65.2	65.2	6	副镊丽鱼
						97.4	80.9	78.3	78.3	74.8	67.8	67.8	70.4	67	68.7	67.8	7	大西洋鲑
							79.1	78.3	77.4	73.9	66.1	66.1	68.7	65.2	67	66.1	8	虹鳟
								87.8	77.4	75.7	67.8	67.8	71.3	67	69.6	70.4	9	斑马鱼
									79.1	77.4	67.8	67.8	71.3	65.2	69.6	68.7	10	鲤鱼
										86.1	67.8	67.8	70.4	64.3	68.7	67.8	11	红鳍东方鲀
											65.2	65.2	68.7	62.6	67	66.1	12	黑青斑河豚
												99.1	87.8	87.8	87.8	87.8	13	小家鼠
													88.7	88.7	88.7	88.7	14	褐家鼠
														90.4	93.9	95.7	15	牛
															93	91.3	16	人
																96.5	17	野猪
																	18	马

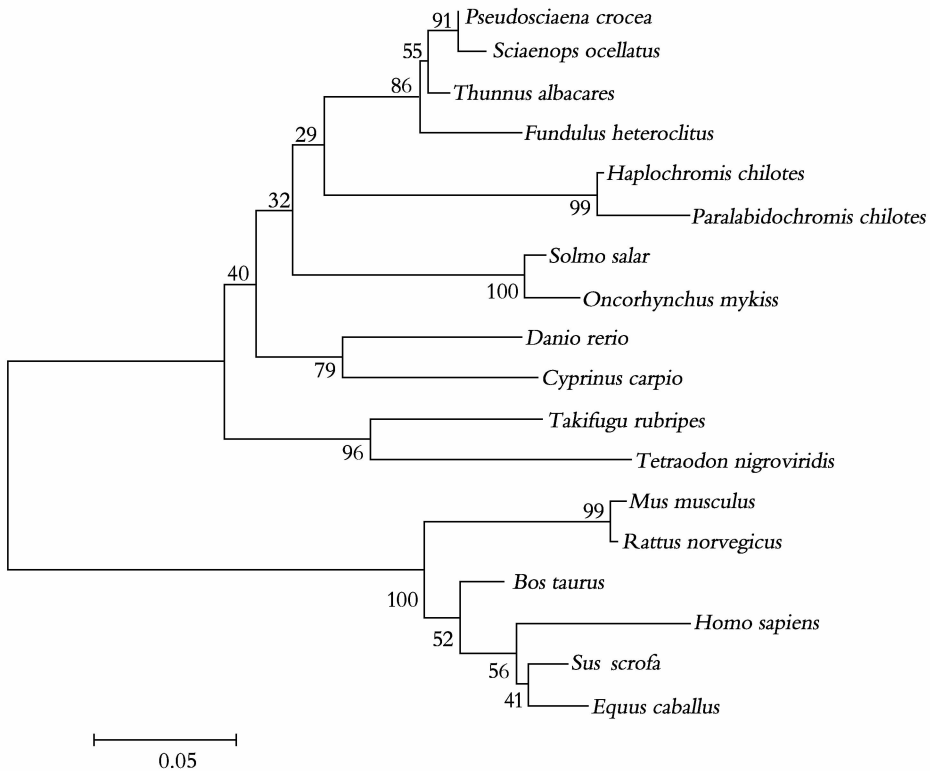


图 3 用 NJ 法构建的脊椎动物 MIF 的系统进化树(Bootstrap 值为 2 500)

Fig. 3 Phylogenetic tree of selected vertebrate MIF based on amino acid sequences using the neighbor-joining algorithm in MEGA (version 3.1).

3 讨论

作者发现,黄鳍金枪鱼虽然是深海鱼类,但 TaMIF 的 cDNA 结构与氨基酸的序列与近海养殖鱼类非常相似,与大黄鱼和眼斑拟石首鱼等传统养殖品种的氨基酸序列相似性超过了 97%,表明 MIF 是一类非常保守的蛋白质,也预示着 MIF 的生物学功能在深海鱼类黄鳍金枪鱼和近海鱼类之间也非常相似。

黄鳍金枪鱼的 MIF 有 3 个 cys(图 2),这与大多数哺乳动物和大多数鱼类(大黄鱼和眼斑拟石首鱼有 4 个 cys 除外)相似,而鸡是 4 个 cys,爪蟾(*Xenopus laevis*)是 5 个^[9]。但是,第 1 个与第 2 个 cys 残基(图 2)组成的 CALC 结构在所有的脊椎动物中都存在,被认为与 MIF 的疏基蛋白氧化还原酶的活性有关,对于脊椎动物 MIF 激活巨噬细胞的功能非常重要^[9,11];第 3 个保守的残基 cys(图 2),是哺乳动物 MIF 发挥互变异构酶活性的关键残基^[9,12],在大多数硬骨鱼类都存在。总的说来,有 18 个氨基酸(图 2)与脊椎动物 MIF 的催化活性有关^[13,14],其中黄鳍金枪鱼和人的 MIF 之间有 14 个是相同的;有 18 个氨基酸(图 2)与脊椎动物 MIF 的免疫调节活性有关^[14,15],其中黄鳍金枪鱼和人之间有 14 个氨基酸是相同的。结果表明,这些与 MIF 催化活性及免疫调节活性相关的氨基酸残基的在鱼类和哺乳动物之间是非常保守的,同时也预示深海鱼类 MIF 的功能可能与其它脊椎动物 MIF 的功能基本相似。

另外,黄鳍金枪鱼 MIF 的二级结构的组成与排列与人的一样,但与寄生虫 *Eimeria* MIF 的 $\alpha 1\beta 1\alpha 2\beta 2\beta 3\beta 4$ 的二级结构排列有所区别^[14],显示了黄鳍金枪鱼 MIF 与低等动物 MIF 的结构差异和进化分化的特点。当然,MIF 的二级结构预测都是以人的 MIF 作为模板进行预测的,不一定完全准确,只有晶体结构分析才能提供更加准确和真实的结果。

脊椎动物 MIF 的进化分析表明,深海鱼类与其它鱼类 MIF 同属于一个进化分支,并没有单独分化成簇,表明黄鳍金枪鱼与其它近海鱼类具有相近的进化地位。

参考文献:

[1] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory

factor: a regulator of innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3**(10): 791-800.

[2] 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 USA*, 1989, **86**(19): 7 522-7 526.

[3] 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.

[4] Roger T, David J, Glauser M P, *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] Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Nicoletti F. MIF in autoimmunity and novel therapeutic approaches [J]. *Ay-timmun Rev*, 2008, **19**: 1-6.

[7] 金红建,邵健忠,项黎新.红鳍东方鲀 MIF 基因的鉴定及生物信息学分析 [J]. *水生生物学报*, 2007, **31**(1): 135-138.

[8] Ito K, Yoshiura Y, Ototake M, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for development of zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2008, **32**(6): 664-672.

[9] Jin Hong-jian, Xiang Li-xin, Shao Jian-zhong. Molecular cloning and identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in teleost fish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, **31**(11): 1 131-1 144.

[10] 孟晓梦,叶振江,王英俊.世界黄鳍金枪鱼渔业现状和生物学研究进展 [J]. *南方水产*, 2007, **3**(4): 74-79.

[11] Kleemann R, Kapurniotu A, Frank R W, *et al.* Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase [J]. *J Mol Biol*, 1998, **280**(1):85-102.

[12] Kleemann R, Rorsman H, Rosengren E, *et al.* Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants [J]. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(24): 7 183-7 193.

[13] 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.

[14] Miska K B, Fetterer R H, Lillehoj H S, *et al.* Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, **151**(2): 173-183.

[15] Kleemann R, Hausser A, Geiger G, *et al.* Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1 [J]. *Nature*, 2000, **408**: 211-216.

Molecular cloning and sequence analysis of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene from *Thunnus albacares*

MAO Yong^{1,2}, WANG Jun¹, ZHANG Zhi-wen¹, WANG Ding¹, SU Yong-quan¹

(1. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: Jun. , 12, 2009

Key words: *Thunnus albacares*; macrophage migration inhibitory factor (MIF); molecular cloning; sequence analysis

Abstract: The cDNA sequence of an MIF homologue (TaMIF) was cloned from the liver of *Thunnus albacares* by a homologous cloning strategy and RACE approach. The full-length cDNA of TaMIF was 706 bases long and contained an ORF of 345 bases encoding a protein of 115 amino acid residues. Prediction of the signal peptide indicated that TaMIF lacks a signal peptide. Sequence analysis revealed a high structural similarity and phylogenetic analysis indicated a close relationship between TaMIF and other fish MIF, implying that TaMIF maybe have a similar function to offshore cultured fish MIFs. The result is the complement of the gene information to open-sea fish MIF gene.

(本文编辑:刘珊珊)