

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00595

# 人猿超科和旧大陆猴 7 种高等灵长类 FKN 全基因序列的测定及进化分析

洪晓武<sup>1</sup>, 张亚平<sup>2</sup>, 储以微<sup>1</sup>, 高海峰<sup>1</sup>, 蒋正刚<sup>1</sup>, 熊思东<sup>1</sup>

1. 复旦大学上海医学院免疫学系, 免疫生物学研究所, 上海 200032;
2. 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223

**摘要:** 测定人猿超科(人、黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩和长臂猿)和旧大陆猴(猕猴和叶猴)7 种高等灵长类 FKN 全基因序列, 探讨其系统进化分析。用简并引物 PCR(Degenerated PCR)法分别扩增 FKN 的 3 个外显子, 其产物经琼脂糖凝胶回收、纯化后测序, 然后用 BioEdit 软件剪切拼接 FKN 基因全序列, 用 DNASTar 比对后比较基因和氨基酸序列同源性, Mega 软件重构 FKN 基因进化树, 应用 Datamonkey 分析 FKN 的负选择位点。序列分析发现人猿超科较旧大陆猴 FKN 基因除了有散在的点突变外, 还有一明显的 30 bp 的核苷酸缺失突变; 人 FKN 基因序列与黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、长臂猿、猕猴和叶猴的同源性分别是 99.2%、98.4%、98.1%、96.5%、95.9% 和 93.8%, 由此推导的氨基酸序列同源性分别是 98.5%、98.0%、97.7%、94.7%、93.7% 和 90.5%; FKN 基因进化树表明人与黑猩猩关系更近, FKN 基因进化和通常认为的物种进化一致; Datamonkey 分析结果显示 FKN 存在 3 个负选择位点 53Q、84D、239N。成功获得人、黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、长臂猿、猕猴和叶猴 7 种高等灵长类物种 FKN 全基因序列, 为后续探讨 FKN 在高等灵长类物种进化过程中免疫学功能演变及其结构与功能的关系奠定基础。

**关键词:** 人猿超科; 旧大陆猴; FKN; 测序; 进化分析

## Complete sequence determination and phylogenetic analysis of FKN among seven higher primates including homonids and Old World Monkeys

HONG Xiao-Wu<sup>1</sup>, ZHANG Ya-Ping<sup>2</sup>, CHU Yi-Wei<sup>1</sup>, GAO Hai-Feng<sup>1</sup>, JIANG Zheng-Gang<sup>1</sup>, XIONG Si-Dong<sup>1</sup>

1. Department of Immunology, Shanghai Medical College, Institute for Immunobiology, Fudan University, Shanghai 200032, China;
2. Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

**Abstract:** To obtain full-length FKN nucleotide sequences of homonids including human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon, and Old World Monkeys including macaque and leaf monkey and make phylogenetic analysis, three exons of FKN were amplified by degenerated PCR using obtained peripheral blood cells DNA as template which was extracted from homonids and Old World Monkeys. After extracting and purifying from agarose gels, PCR products were se-

收稿日期: 2007-10-23; 修回日期: 2008-02-18

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30700737)和复旦大学上海医学院青年科学基金项目(编号: 06J-1)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No.30700737) and Program of Young Science Fund of Shanghai Medical College, Fudan University (No.06J-1)]

作者简介: 洪晓武(1975-), 男, 安徽绩溪人, 讲师, 博士, 研究方向: 分子免疫学。Tel: 021-54237362; E-mail: xiaowuhong@fudan.edu.cn

通讯作者: 张亚平(1965-), 男, 云南昭通人, 教授, 博士, 研究方向: 分子进化学。Tel: 0871-5190761; E-mail: zhangyp@mail.kiz.ac.cn;

熊思东(1962-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士, 研究方向: 分子免疫学。Tel: 021-54237749; E-mail: sdxiang@shmu.edu.cn

quenced and then spliced by using BioEdit. All the FKN sequences were aligned and compared the percent identity by using DNASTar. The phylogenetic tree was constructed using maximum evolution approach in Mega. The negative selection sites were analyzed by using Datamonkey. There is an apparent 30 bp nucleotides deletion mutation in homonids FKN comparing to that of Old World Monkeys besides other point mutations. Homology of nucleotide sequence between human and chimpanzee, gorilla, orangutan, gibbon, macaque and leaf monkey is 99.2%, 98.4%, 98.1%, 96.5%, 95.9% and 93.8%, respectively. Homology of amino acid sequence of them is 98.5%, 98.0%, 97.7%, 94.7%, 93.7% and 90.5%, respectively. In the same time, the genealogical relationship of human is a lot closer to chimpanzee than it is to gorilla and other apes. It is generally agreed that the evolution rule of FKN gene is in accord with that of the higher primates. In addition, Datamonkey shows that there are 3 negative selection sites 53Q, 84D and 239N in FKN. The full-length FKN gene of human, chimpanzee, gorilla, orangutan, gibbon, macaque and leaf monkey were sequenced successfully, and the FKN sequences analysis lays the foundation for further studying its evolution in immunological function in higher primates and the relation between its structure and function.

**Keywords:** homonids; Old World Monkeys; FKN; sequence; phylogenetic analysis

灵长类的系统发育一直是进化研究的热点之一,但由于缺乏完整的化石记录,迄今为止仍然存在许多争议<sup>[1]</sup>,例如关于人猿超科内部人、黑猩猩和大猩猩之间的关系,目前多数结论认为人与黑猩猩关系更近<sup>[1,2]</sup>,但也有其他观点认为人与大猩猩的关系近于与黑猩猩的关系或者认为黑猩猩与大猩猩关系更近<sup>[3,4]</sup>。因此,对这一问题尚无完全一致的结论。从核基因组序列进行分子水平的研究,对于阐明这一问题必不可少。

趋化因子 Fractalkine(FKN)是迄今为止发现的唯一的CX3C(δ)型成员,也是第一个发现的以分泌型和膜结合型两种形式同时存在的趋化因子,在人心、脑、肾脏、结肠、前列腺、心肌、骨骼肌、神经元及DC等多种组织和细胞上均广泛表达<sup>[5]</sup>,同时FKN也广泛表达在非人高等灵长类物种<sup>[6]</sup>。

FKN以其独特的分子结构和存在形式成为研究的热点,但主要集中在其免疫功能方面:包括介导细胞迁移及以不依赖选择素和整合素的方式捕获或吸引白细胞紧密粘附,参与免疫炎症反应<sup>[7]</sup>,参与细胞间信息传递,促进正常免疫细胞的成熟和分化<sup>[8]</sup>,抑制Fas-FasL诱导的细胞凋亡<sup>[9]</sup>,保护和促进中枢神经系统的小胶质细胞的生存<sup>[10]</sup>等。

Shall<sup>[11]</sup>认为FKN在白细胞迁移过程中发挥着关键作用,反映了一种进化上的需要。但迄今为止尚未见FKN基因在系统进化分析方面的报道。此外,从FKN基因进化过程预测在其介导的免疫学功能中起关键作用的氨基酸位点,目前也没有报道。

基于此,本文着重于测定人猿超科和旧大陆猴

7种高等灵长类FKN全基因序列,对序列进行了核苷酸、氨基酸水平的比较,重构FKN基因进化树,并预测FKN的负选择位点,这为后续探讨FKN在高等灵长类物种进化过程中免疫学功能的演变奠定基础,同时也为研究FKN结构与功能的关系提供理论参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本

人猿超科(Homonids):人(Human, *Homo sapiens*)、黑猩猩(Chimpanzee, *Pan troglodytes*)、大猩猩(Gorilla, *Gorilla gorilla*)、红毛猩猩(Orangutan, *Pongo pygmaeus*)和长臂猿(Gibbon, *Hylobates lar*);旧大陆猴(Old World Monkeys, OWMs):猕猴(Macaque, *Macaca assamensis*)和叶猴(Leaf Monkey, *Presbytis francoisi*) 7种高等灵长类物种外周血标本由中国科学院昆明动物研究所提供。

### 1.2 基因组DNA的制备、PCR和测序

采集7种高等灵长类物种外周血各2 mL,按基因组DNA抽提试剂盒(TaKaRa Biotech)说明书抽提DNA。按照UCSC(<http://genome.ucsc.edu>)上对人FKN基因Blat结果设计简并引物(表1)。PCR反应的总体积为50 μL,其中基因组DNA约20 ng, 10×ExTaq缓冲液5 μL, 10 pmol/μL dNTPs 4 μL, ExTaq™ 0.25 U, 10 pmol/μL的引物各1 μL,加灭菌的去离子水至50 μL。PCR反应程序为:95 1 min; 94 30 s, 55~60 (依照不同模板不同引物

有所变化)30 s, 72 45 s, 35 个循环; 72 10 min。取 2  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 回收产物(Watson Biotech 试剂盒)并纯化后, 在 ABI 3700 型自动测序仪上进行核苷酸序列测序。

表 1 FKN PCR 简并引物和测序引物  
Table 1 Degenerated PCR primers and sequencing primers for FKN

片段 Segment	引物名称 Primer name	引物用途 Primer use	引物序列 Primer sequence (5 $\rightarrow$ 3 )
Exon1	F1f	PCR/sequencing	GCCGCCTGGCTCTATCCGC
	F1r	PCR/sequencing	GCTGCATCTGGGGGAAGGGA
Exon2	F2f	PCR/sequencing	TGGCACGGGGTTGGGAAGC
	F2r	PCR/sequencing	CAGGTCTGGGAGCGGAGGTGTG
Exon3	F3f	PCR/sequencing	ATCTGGGCATAACCGAATCCCTG
	F3r	PCR/sequencing	AGACACAGGCCAGAGGAGTTTCAC
	F3fs	Sequencing	CTGGGCTGAGGCAAAGACC
	F3rs	Sequencing	TCTGGGGCTGGGGAGGAC

F1f, F2f, F3f: 表示外显子 1, 2, 3 的上游 PCR 简并引物和测序引物; F1r, F2r, F3r: 表示外显子 1, 2, 3 的下游 PCR 简并引物和测序引物; F3fs: 外显子 3 的上游测序引物; F3rs: 外显子 3 的下游测序引物。

F1f, F2f, F3f : Indicates forward primer of Exon1,2,3 respectively; F1r, F2r, F3r: Indicates reverse primer of Exon1,2,3 respectively; F3fs: Indicates forward sequencing primer of Exon3; F3rs: Indicates reverse sequencing primer of Exon3.

### 1.3 基因序列比对、同源性比较与基因进化树、负选择位点分析

首先将测序获得的序列用 Seqman 进行正反链拼接并转换成 seq 文件, 然后用 Clustal W 把 3 个不同的外显子分别进行排序, 接着用 Bioedit 剪切掉引物和其他非编码区序列, 随后依次将外显子 1, 2 和 3 基因序列串接形成完整的 FKN 序列, 先用 MegAlign 进行比对分析, 然后比较 FKN 基因和氨基酸序列同源性, 用 Mega 软件的 ME 法重构 FKN 基因进化树, 应用 Datamonkey(<http://www.Datamonkey.org/>)分析 FKN 的负选择位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 外显子扩增

分别用简并引物扩增 FKN 的外显子 1, 2 和 3, 然后用 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 得到相应的电泳条带(图 1)。

### 2.2 测序和比对

将人猿超科和旧大陆猴 7 种高等灵长类 FKN 基因各自 3 个外显子分别进行双向测序, 每个物种用 3 个样本, 每个样本测序 3 次, 对旧大陆猴和人猿超科 FKN 基因全序列比较的结果显示: 除了有散在的点突变外, 还发现人猿超科较旧大陆猴 FKN 基因在粘蛋白样区有一明显 30 bp 核苷酸缺失(图 2)。

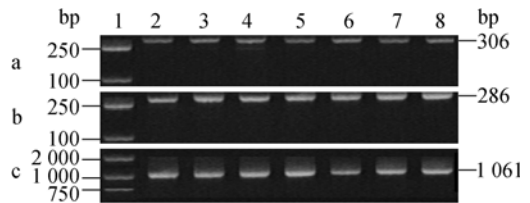


图 1 7 个物种 FKN 外显子扩增产物的 1.5%琼脂糖凝胶电泳图

a: 外显子 1; b: 外显子 2; c: 外显子 3。1: DL2000 DNA Marker; 2~8: 分别为人、黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、长臂猿、猕猴和叶猴外显子。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis(1.5%) of 7 primates FKN exons degenerated PCR products

A: Exon 1; b: Exon 2; c: Exon 3.1: DL2000 DNA Marker; 2~8: Human, chimpanzee, gorilla, orangutan, gibbon, macaque and leaf monkey respectively.

### 2.3 同源性比较与基因进化树、负选择位点分析

将所得的人猿超科和旧大陆猴 7 种高等灵长类 FKN 全基因序列及其推导氨基酸序列进行比较, 结果显示: 人 FKN 基因序列与黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、长臂猿、猕猴和叶猴的同源性分别是 99.2%、98.4%、98.1%、96.5%、95.9%和 93.8%, 由此推导的氨基酸序列同源性分别是 98.5%、98.0%、97.7%、94.7%、93.7%和 90.5%(图 3)。FKN 基因进化树表明人与黑猩猩关系更近, FKN 基因进化和通常认为的物种进化一致(图 4)。Datamonkey 分析结果显示 FKN 存在 3 个负选择位点 53Q、84D、239N(表 2)。

Human	ATGGCTCCGATATCTCTGTCGTGGCTGCTCGGCTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACTGTCCTGCTGGCTGGACAGCACCAAGGTGTGACG
Chimpanzee	ATGGCTCCGATATCTCTCTCGTGGCTGCTCCGCTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACCGTCTGCTGGCTGGACAGCACCAAGGTGTGACG
Gorilla	ATGGCTCCGATATCTCTCTCGTGGCTGCTCCGCTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACCGTCTGCTGGCTGGACAGCACCAAGGTGTGACG
Orangutan	ATGGCTCCGATATCTCTCTCGTGGCTGCTCCGCTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACCGTCTGCTGGCTGGACAGCACCAAGGTGTGACG
Gibbon	ATGACTCCGATATCTCTCTCGTGGCTGCTCCACTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACTGTCTGCTGGCTGGACAGCACCAAGGTGTGACG
Macaque	ATGGCTCCGATATCTCTCTCGTGGCTGCTCCACTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACTGTCTGCTGGCTGGACAGCACCAAGGTGTGACG
Leaf Monkey	ATGACTCCGATATCTCTCTCGTGGCTGCTCCACTTGGCCACCTTCTGCCATCTGACTGTCTGCTGGCTGGACAGCACCAAGGTGTGACG
Human	AAATGCAACATCACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTAGCTTTGCTCATCCACTATCAACAGAACCAAGGCATCATGCCGCCAAA
Chimpanzee	AAATGCAACATCACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTAGCTTTGCTCATCCACTATCAACAGAACCAAGGCATCATGCCGCCAAA
Gorilla	AAATGCAACATCACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTAGCTTTGCTCATCCACTATCAACAGAACCAAGGCATCATGCCGCCAAA
Orangutan	AAATGCAACATCACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTAGCTTTGCTCATCCACTATCAACAGAACCAAGGCATCATGCCGCCAAA
Gibbon	AAATGCAACATTACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTGGCTTTGCTCATCCACTATCAACAAAAACAGGAATCATGCCGCCAAA
Macaque	AAATGCAACATTACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTGGCTTTGCTCATCCACTATCAACAGAACCAAGGAATCATGCCGCCAAA
Leaf Monkey	AAATGCAACATTACGTGCAGCAAGATGACATCAAAGATACCTGTGGCTTTGCTCATCCACTATCAACAAAAACAGGAATCATGCCGCCAAA
Human	CGCGCAATCATCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTGTTCTGTGCCGACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGACGCGATGCAGCATCTGGAC
Chimpanzee	CGCGCAATCATCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTGTTCTGTGCCGACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGACGCGATGCAGCATCTGGAC
Gorilla	CGCGCAATCATCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTGTTCTGTGCCGACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGACGCGATGCAGCATCTGGAC
Orangutan	CGTGCAATCGTCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTGTTCTGTGCCGACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGACGCGATGCAGCATCTGGAC
Gibbon	CGTGCAATCGTCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTGTTCTGTGCCGACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGATGCGATGCAGCATCTGGAC
Macaque	CGTGCAATCGTCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTGTTCTGTGCCGACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGACGCGATGCAGCATCTGGAC
Leaf Monkey	CGTGCAATCGTCTTGGAGACGAGACAGCACAGGCTATTTCTGTGCCACCCGAAGGAGCAATGGGTCAAGGATGCGATGCAGCATCTGGAC
Human	CGCCAGGCTGCTGCCCTAACTCGAAATGGCGGCACCTTCGAGAAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGGCCCAGGACCAACCCCTGCCGCCGGGGGA
Chimpanzee	CGCCAGGCTGCTGCCCTAACTCGAAATGGCGGCACCTTCGAGAAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGGCCCAGGACCAACCCCTGCCGCCGGGGGA
Gorilla	CGCCAGGCTGCTGCTCTAACTCGAAATGGCGGCACCTTCGAGAAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGGCCCAGGACCAACCCCTGCCGCCGGGGGA
Orangutan	CGCCAGGCTGCTGCTCTAACTCGAAATGGCGGCACCTTCGAGAAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGGCCCAGGACCAACCCCTGCCGCCGGGGGA
Gibbon	CGCCAGGCTGCTGCTCTAACTCGAAATGGCGGCACCTTCGAGAAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGGCCCAGGACCAACCCCTGCCGCCGGGGGA
Macaque	CGCCAGGCTGCTGCTCTGACTCGAAATGGCGGCACCTTCGAGAAAGCAGATCGGCTGGTGAAGGCCCAGGACCAACCCCTGCCGCCGGGGGA
Leaf Monkey	CACCAAGGCTGCTGCTCTGACTCGAAATGGCGGCACCTTCGAGAAAGCAGATCGGCTGGTGAAGGCCCAGGACCAACCCCTGCTGCCGCCGGGA
Human	ATGGAAGAGTCTGTGGTCCTGGAGGCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGGCTGGAGCCGACTCCTTCTTCCAGGAAGCACAGAGGGCC
Chimpanzee	ATGGAAGAGTCTGTGGTCCTGGAGGCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGGCTGGAGCCGACTCCTTCTTCCAGGAAGCACAGAGGGCC
Gorilla	ATGGAAGAGTCTGTGGTCCTGGAGGCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGGCTGGAGCCGACTCCTTCTTCCAGGAAGCACAGAGGGCC
Orangutan	ATGGAAGAGTCTGTGGTCCTGGAGGCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGGCTGGAGCCGACTCCTTCTTCCAGGATGCACAGAGGGCC
Gibbon	ATGGAAGAGTCTGTGGTCCTGGAGGCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGGCTGGAGCCGAGCCCTTCTTCCAGGAAGCACAGAGGGCC
Macaque	ATGGAAGAGTCTGTGGTCCTGGAGGCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGGCTGAAGCCAACTCCTTCTTCCCGGAGGCACAGAGGGCC
Leaf Monkey	ATGGAAGAGTCTGTGGTACCGGAGGCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGGCTGAAGCCAACTCCTTCTTCCCGGAGGCACAGAGGGCC
Human	CTGGGGACCTCCCCAGAGCTGCCGACGGGGCGTGA CTGGTTCTCAGGGACCGGGCTCCCCCGGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAGGGCC
Chimpanzee	CTGGGGACCTCCCCAGAGCTGCTGACGGGGCGTGA CTGGTTCTCAGGGACCGGGCTCCCCCGGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAGGGCC
Gorilla	CTGGGGACCTCCCCAGAGCTGCCGATGGGGCTGA CTGGTTCTCAGGGACCGGGCTCCCCCGGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAGGGCC
Orangutan	CTGGGGACCTCCCCAGAGCTGCCGACGGGGCGTGA CTGGTTCTCAGGGACCGGGCTCCCCCGGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAGGGCC
Gibbon	CTGGGGACCTCCCCAGAGCTGCCGACGGGGCGTGA CTGGTTCTCAGGGACCGGGCTCCCCCTGACACCAAGGCTCAGGATGGAGGGCC
Macaque	CTGGGGACCTCCCCAGAGCTGACAGGGGGCGTGA CTGGTTCTCAGGGACCGGGCTCCCCCGGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAGGGCC
Leaf Monkey	TTGGGGACCTCCCCAGAGCTGACGGGGCGTGA CTGGTTCTCAGGGACCGGGCTCCCCCTCAGCACAAAGGCTCAGGATGGAGGGCC
Human	GTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCTCCCGTCTCCACTGCCGGCACGTGGCAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCCGCTCTGG
Chimpanzee	GTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCTCCCGTCTCCACTGCCGGCACGTGGCAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCCGCTCTGG
Gorilla	GTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCTCCCGTCTCCACTGCCGGCACGTGGCAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCCGCTCTGG
Orangutan	GTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCTCCCGTCTCCACTGCCGGCACGTGGCAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCCGCTCTGG
Gibbon	GTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCTCCCGTCTCCACTGCCGGCACGTGGCAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCCGCTCTGG
Macaque	GTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCTCCCGTCTCCACTGCCGGCGCTGGCAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCCGCTCTGG
Leaf Monkey	GTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCTCCCGTCTCCACTGCCGGCACGTGTGAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCCGCTCTGG

Human	GCTGAGGCAAAAGACCTCTGAGGCCCGGTCCACCCAGGACCC-----CTCCACCCAGGCCCTCCACT
Chimpanzee	GCTGAGGCAAAAGACCTCTGAGGCCCGGTCCACCCAGGACCC-----CTCCACCCAGGCCCTCCACT
Gorilla	GCTGAGGCAAAAGACCTCTGAGGCCCGGTCCACCCAGGACCC-----CTCCACCCAGGCCCTCCACT
Orangutan	GCTGAGGCAAAAGACCTCTGAGGCCCGGTCCACCCAGGACCC-----CTCCACCCAGGCCCTCCACT
Gibbon	GCTGAGGCAAAAGACCTCTGAGGCCCGGTCCACCCAGGACCC-----CTCCACCCAGGCCCTCCACT
Macaque	GCTGAGGCAAAAGACCTCTGAGGCCCGGTCCACCCAGGACCCCTTCCACCCAGGCCCTCTCCACCCAGGCCCTCCACT
Leaf Monkey	GCTGAGGCAAAAGACCTCTGAGGCCCGGTCCACCCAGGACCCCTTCCACCCAGGCCCTCTCTCCACCCAGGCCCTCCACT

Human	CCGTCTCTCCCCAGCCCCACAGGACAATGCTCCGTCTGAAGGCCACGCGTGTGTGGGTCAGGGACACAGCCCCAGGCCACAGAACTCTCTG
Chimpanzee	GCGTCTCTCCCCAGCCCCACAGGAGAAACGCTCCGTCTGAAAGGCCAGCGTGTGTGGGTCAGGGACACAGCCCCAGGCCACAGAACTCTCTG
Gorilla	GCATCTCTCCCCAGCCCCACAGGAGAAACGCTCCGTCTGAAGGCCACGCGTGTGTGGGTCAGGGACACAGCCCCAGGCCACAGAACTCTCTG
Orangutan	GCGTCTCTCCCCAGCCCCACAGGAGAAATGCTCCGTCTGAAGGCCACGCGTGTGTGGGTCAGGGACACAGCCCCAGGCCACAGAACTCTCTG
Gibbon	ACGTCTCTCCCCAGCCCCACAGGAGAAACACTCCGTCTGAAGGCCACGCGTGTGTGGGTCAGGGACACAGCCCCAGGCCACAGAACTCTCTG
Macaque	ACTTCTCTCCCCAGCCCCACAGGAGAAACACTCCGTCTGAAGGCCACGCGTGTGTGGGTCAGGGACACAGCCCCAGGCCACAGAACTCTCTG
Leaf Monkey	ACTTCTCTCCCCAGCCCCACAGGAGAAACACTCCGTCTGAAGGCCACGCGTGTGTGGGTCAGGGACACAGCCCCAGGCCACAGAACTCTCTG

Human	GAGCGGGAGGAGATGGSTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCCTTCCAGGACTGGGGGCCCTGGCAGCATGGCCCCACGTCTCTGTGGTCCCT
Chimpanzee	GAGCGGGAGGAGATGGSTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCCTTCCAGGACTGGGGGCCCTGGCAGCATGGCCCCACGTCTCTGTGGTCCCT
Gorilla	GAGCGGGAGGAGATGGSTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCCTTCCAGGACTGGGGGCCCTGGCAGCATGGCCCCACGTCTCTGTGGTCCCT
Orangutan	GAGCGGGAGGAGATGGSTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCCTTCCAGGACTGGGGGCCCTGGCAGCATGGCCCCACGTCTCTGTGGTCCCT
Gibbon	GAGCGGGAGGAGATGGSTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCCTTCCAGGACTGGGGGCCCTGGCAGCATGGCCCCACGTCTCTGTGGTCCCT
Macaque	GAGCGGGAGGAGATGGSTCCCGTGCCAGCGCACACAGATGCCCTTCCAGGACTGGGGGCCCTGGCAGCATGGCCCCACGTCTCTGTGGTCCCT
Leaf Monkey	CAGCGGGAGGAGATGGSTCCCGTGCCAGCGCACACAGATGCCCTTCCAGGACTGGGGGCCCTGGCAGCATGGCCCCACGTCTCTGTGGTCCCT

Human	GTCTCTCTCAGAAGGGACCCCCAGCAGGGAGGCCAGTGGCTTACAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGAC
Chimpanzee	GTCTCTCTCAGAAGGGACCCCCAGCAGGGAGGCCAGTGGCTTACAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGAC
Gorilla	GTCTCTCTCAGAAGGGACCCCCAGCAGGGAGGCCAGTGGCTTACAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGAC
Orangutan	GTCTCTCTCAGAAGGGACCCCCAGCAGGGAGGCCAGTGGCTTACAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGAC
Gibbon	GTCTCTCTCAGAAGGGACTCCAGCAGGGAGGCCAGTGGTTTACAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGAT
Macaque	GTCTCTCTCGGAAGGAACCCCCAGCAGGGAGGCCAGTGGCTTACAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGAC
Leaf Monkey	GTCTCTCTCGGAAGGAACCCCCAGCAGGGAGGCCAGTGGCTTACAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGAC

Human	CCCCAGAGGCTGGGCGTCTTATCACTCCTGTCCCTGACGCCCAGGCTGCCACCCGGAGGACAGGCGGTGGGGCTGCTGGCCTTCCCTTGGC
Chimpanzee	CCCCAGAGGCTGGGCGTCTTATCACTCCTGTCCCTGACGCCCAGGCTGCCACCCGGAGGACAGGCGGTGGGGCTGCTGGCCTTCCCTTGGC
Gorilla	CCCCAGAGGCTGGGCGTCTTATCACTCCTGTCCCTGACGCCCAGGCTGCCACCCGGAGGACAGGCGGTGGGGCTGCTGGCCTTCCCTTGGC
Orangutan	CCCCAGAGGCTGGGCGTCTTATCACTCCTGTCCCTGATGCCCAGGCTGCCACCCGGAGGACAGGCGGTGGGGCTGCTGGCCTTCCCTTGGC
Gibbon	CCCCAGAGGCTGGGCGTCTTATCACTCCCGTCCCTGACTCCAGGCTGCCACCCGGAGGACAGGCGGTGGGGCTGCTGGCCTTCCCTTGGC
Macaque	CCCCAGAGGCTGGGCGTCTTATCACTCCTGTCCCTGACGCCCAGGCTGCCACCCGGAGGACAGGCGGTGGGGCTGCTGGCCTTCCCTTGGC
Leaf Monkey	CCCCAGAGGCTGGGCGTCTTATCACTCCTGTCCCTGACGCCCAGGCTGCCACTCGGAGGACAGGCGGTGGGGCTGCTGGCCTTCCCTTGGC

Human	CTCCTCTTCTGCCTGGGGGTGGCCATGTTACCTTACCAGAGCCTCCAGGGCTGCCCTCGAAAGATGGCAGGAGAGATGGCGGAGGGCCCTT
Chimpanzee	CTCCTCTTCTGCCTGGGGGTGGCCATGTTACCTTACCAGAGCCTCCAGGGCTGCCCTCGAAAGATGGCAGGAGAGATGGTGGAGGGCCCTT
Gorilla	CTCCTCTTCTGCCTGGGGGTGGCCATGTTACCTTACCAGAGCCTCCAGGGCTGCCCTCGAAAGATGGCAGGAGAGATGGTGGAGGGCCCTT
Orangutan	CTCCTCTTCTGCCTGGGGGTGGCCATGTTACCTTACCAGAGCCTCCAGGGCTGCCCTCGAAAGATGGCAGGAGAGATGGCAGGAGGGCCCTT
Gibbon	CTCCTCTTCTGCCTGGGGGTGGCCATGTTGCTTACCAGAGCCTCCAGGGCTGCCCTCGAAAGATGGCAGGAGAGATGGTGGAGGGCCCTT
Macaque	CTCCTCTTCTGCCTGGGGGTGGCCATGTTGCTTACCAGAGCCTCCAGGGCTGCCCTCGAAAGATGGCAGGAGAGATGGTGGAGGGCCCTT
Leaf Monkey	CTCCTCTTCTGCCTGGGGGTGGCCATGTTGCTTACCAGAGCCTCCAGGGCTGCCCTCGAAAGATGGCAGGAGAGATGGTGGAGGGCCCTT

Human	CGCTACATCCCCCGGAGCTGTGGTAGTAATTATATGTCTCTGTCGCCCTGTGA
Chimpanzee	CGCTACATCCCCCGGAGCTGTGGTAGTAATTATATGTCTCTGTCGCCCTGTGA
Gorilla	CGCTACATCCCCCGGAGCTGTGGTAGTAATTATATGTCTCTGTCGCCCTGTGA
Orangutan	CGCTACATCCCCCGGAGCTGTGGTAGTAATTATATGTCTCTGTCGCCCTGTGA
Gibbon	CGCTACATCCCCCGGAGCTGTGGTAGTAATTATATGTCTCTGTCGCCCTGTGA
Macaque	CGCTACATCCCCCGGAGCTGTGGTAGTAATTATATGTCTCTGTCGCCCTGTGA
Leaf Monkey	CGCTACATCCCCCGGAGCTGTGGTAGTAATTATATGTCTCTGTCGCCCTGTGA

图 2 7 种高等灵长类 FKN 核苷酸序列及比对

Fig. 2 Alignment of nucleotide sequences of FKN genes in 7 higher primates

Percent identity										
	1	2	3	4	5	6	7			
Divergence	1		99.2	98.4	98.1	96.5	95.9	93.8	1	Human
	2	0.8		98.7	97.9	96.5	95.9	94.1	2	Chimpanzee
	3	1.6	1.3		98.2	96.6	95.9	94.3	3	Gorilla
	4	2.0	2.1	1.8		97.2	95.7	94.6	4	Orangutan
	5	3.6	3.6	3.5	2.9		95.5	95.1	5	Gibbon
	6	4.2	4.2	4.2	4.4	4.7		96.8	6	Macaque
	7	6.5	6.1	5.9	5.6	5.1	3.3		7	Leaf Monkey
	1	2	3	4	5	6	7			

(a)

Percent identity										
	1	2	3	4	5	6	7			
Divergence	1		98.5	98.0	97.7	94.7	93.7	90.5	1	Human
	2	1.5		98.0	96.7	94.2	94.0	91.2	2	Chimpanzee
	3	2.0	2.0		97.2	95.2	94.2	91.5	3	Gorilla
	4	2.3	3.3	2.8		95.5	93.5	91.2	4	Orangutan
	5	5.5	6.0	4.9	4.7		94.0	92.5	5	Gibbon
	6	6.6	6.3	6.0	6.8	6.3		94.6	6	Macaque
	7	10.2	9.4	9.1	9.4	8.0	5.6		7	Leaf Monkey
	1	2	3	4	5	6	7			

(b)

图 3 7 个物种 FKN 核苷酸(a)、氨基酸(b)序列同源性和差异性分析

Fig. 3 The nucleotide and amino acid identity and divergence of FKN among 7 primates

a: The nucleotide identity and divergence of FKN among 7 primates; b: The amino acid identity and divergence of FKN among 7 primates.

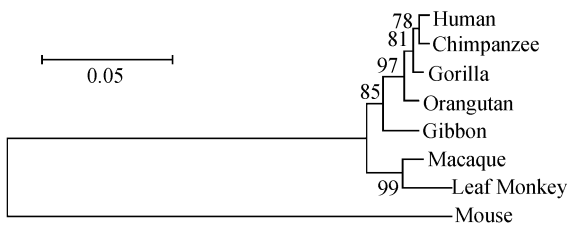


图 4 ME 法构建 FKN 基因进化树

Fig. 4 FKN phylogenetic tree among higher primates by bootstrap test of Minimum Evolution method  
Mouse as an Outgroup to Homonids and OWMs.

表 2 FKN 负选择位点

Table 2 Negatively selected sites of FKN (0.1 significance level)

密码子 Codon	dN-dS	标准化 dN-dS Normalized dN-dS	P-value
53	-2.97588	-16.0211	0.0833471
84	-2.97588	-16.0211	0.0501866
239	-2.97588	-16.0211	0.0501866

### 3 讨论

FKN mRNA 主要表达在脑组织等实质脏器, 而在外周血没有 mRNA 的表达, 仅存在基因组 DNA<sup>[5]</sup>, 由于高等灵长类物种实体组织标本来源困难, 很难通过 RT-PCR 的方法获得其全基因测序, 因此我们考虑用基因组 DNA 为模板对 FKN 的 3 个外显子进行分段扩增, 然后进行测序、拼接。基于此, 我们抽提了人猿超科和旧大陆猴 7 种高等灵长类外周血基因组 DNA, 用人 FKN 基因序列在 <http://genome.ucsc.edu> 上对人基因组做 Blat 后设计简并引物进行 PCR, 然后用纯化的 PCR 产物进行测序, 每个物种用 3 个样本, 每个样本分别双向测序 3 次, 保证了结果的真实性和客观性。

本研究系统比较了人猿超科和旧大陆猴 7 种高等灵长类 FKN 的全基因信息, 结果显示人猿超科较旧大陆猴 FKN 基因除了有散在的点突变外, 在粘蛋

白样区尚有一明显的 30 bp 核苷酸缺失, 且并不影响基因的“阅读框架”(ORF, open reading frame)。基因的缺失突变大多与疾病有关, 因此该缺失片段对 FKN 功能影响是一个值得关注的问题, Fong 等<sup>[13]</sup>研究表明: FKN 的 CX3C 趋化功能区独自承担结合其受体 CX3CR1 的任务而发挥趋化作用, 但单纯的 CX3C 趋化功能区对表达 CX3CR1 的细胞无粘附作用, 必需既有 CX3C 趋化功能区又有粘蛋白样区才有粘附作用。因此, 这段缺失突变很可能会影响 FKN 的粘附作用。

人 FKN 基因序列与黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、长臂猿、猕猴和叶猴的同源性分别是 99.2%、98.4%、98.1%、96.5%、95.9% 和 93.8%, 由此推导的氨基酸序列同源性分别是 98.5%、98.0%、97.7%、94.7%、93.7% 和 90.5%, 这说明人与非人高等灵长类物种 FKN 基因具有很高的同源性, FKN 基因进化树表明人与黑猩猩关系更近, FKN 基因进化和通常认为的物种进化一致, 这些提示 FKN 在高等灵长类物种中可能发挥相似的生物学功能, 但随着物种的不断进化, FKN 基因的生物学功能有可能发生演变, 这种演变可能主要体现在效应的强弱上。Datamonkey 分析结果显示 FKN 存在 3 个负选择位点 53Q、84D、239N, 按照进化生物学理论, 负选择位点一般是极其保守的, 对于基因功能的维持是极其重要的, 例如对蛋白质结构维持的位点一般都是负选择位点。一旦负选择位点发生突变, 就会被净化处理, 从而消失, 这提示 FKN 的 53Q、84D、239N 氨基酸位点可能在 FKN 介导的趋化、黏附等免疫学功能维持中起着非常重要的作用。

本研究的发现将为后续研究 FKN 基因的进化和免疫学功能演变关系提供良好的理论和实验基础, 同时也为研究 FKN 结构与功能的关系提供一个新的视点。

## 参考文献(References):

- [1] Arnason U, Xu X, Gullberg A, Graur D. The “Phoca standard”: an external molecular reference for calibrating recent evolutionary divergences. *J Mol Evol*, 1996, 43(1): 41–45. [\[DOI\]](#)
- [2] Miyamoto MM, Koop BF, Slightom JL, Goodman M, Tennant MR. Molecular systematics of higher primates: genealogical relations and classification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(20): 7627–7631. [\[DOI\]](#)
- [3] Slightom JL, Koop BF, Xu PL, Goodman M. Rhesus fetal globin genes. Concerted gene evolution in the descent of higher primates. *J Biol Chem*, 1988, 263(25): 12427–12438.
- [4] Ferris SD, Wilson AC, Brown WM. Evolutionary tree for apes and humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(4): 2432–2436. [\[DOI\]](#)
- [5] Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 1997, 385(6617): 640–644. [\[DOI\]](#)
- [6] Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, Butcher EC. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization *in vivo*. *J Clin Invest*, 2001, 108(9): 1331–1339.
- [7] Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*, 1998, 188(8): 1413–1419. [\[DOI\]](#)
- [8] Foussat A, Coulomb-L'Hermine A, Gosling J, Krzysiek R, Durand-Gasselin I, Schall T, Balian A, Richard Y, Galanaud P, Emilie D. Fractalkine receptor expression by T lymphocyte subpopulations and *in vivo* production of fractalkine in human. *Eur J Immunol*, 2000, 30(1): 87–97. [\[DOI\]](#)
- [9] Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB, Conlon PJ. The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol*, 2000, 165(1): 397–403.
- [10] Tong N, Perry SW, Zhang Q, James HJ, Guo H, Brooks A, Bal H, Kinneer SA, Fine S, Epstein LG, Dairaghi D, Schall TJ, Gendelman HE, Dewhurst S, Sharer LR, Gelbard HA. Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. *J Immunol*, 2000, 164(3): 1333–1339.
- [11] Schall T. Fractalkine—a strange attractor in the chemokine landscape. *Immunol Today*, 1997, 18(4): 147. [\[DOI\]](#)
- [12] Fong AM, Erickson HP, Zachariah JP, Poon S, Schamberg NJ, Imai T, Patel DD. Ultrastructure and function of the fractalkine mucin domain in CX3C chemokine domain presentation. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 3781–3786. [\[DOI\]](#)