

# 尼罗罗非鱼 DMRT 蛋白 B 细胞表位的预测

杨东 刘红艳 张繁荣 余来宁\* (江汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430056)

**摘要** [目的] 预测尼罗罗非鱼 DMRT 蛋白 B 细胞表位。[方法] 以尼罗罗非鱼 Dmt 基因序列为基础, 按 Carrier-Robson 法, Chou-Fasman 法和 Karplus-Schulz 法预测其编码蛋白的二级结构; 用 Kyte-Doolittle 法, Eniri 法及 Janeson-Wolf 法分别预测 B 细胞表位。[结果] Carrier-Robson 法和 Chou-Fasman 法的预测结果均表明, 在尼罗罗非鱼 DMRT 蛋白分子 N 端第 31~56、68~75、110~116、209~211 区段和第 239~243 区段可能是 螺旋中心; 蛋白 N 端第 95~99、177~183、225~234 区段和第 251~254 区段可能是 折叠中心; 按 Kyte-Doolittle 的亲水性方案、Eniri 方案和 Janeson-Wolf 抗原指数方案, 辅以对 DMRT 蛋白的二级结构中的柔性区域的分析, 预测 DMRT 蛋白的 B 细胞表位, DMRT 蛋白 N 端第 13~16、35~38、47~54、84~93、101~109、127~156、166~177 区段和第 198~201 区段附近很可能为 B 细胞表位优势区域。[结论] 该研究结果为 DMRT 蛋白克隆抗体的制备及探索尼罗罗非鱼性别调控机理提供了参考资料。

**关键词** 尼罗罗非鱼; DMRT 蛋白; B 细胞表位; 二级结构

中图分类号 S965.125 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)27-11669-02

## Prediction of B Cell Epitope of DMRT Protein in *Oreochromis niloticus*

YANG Dong et al (College of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056)

**Abstract** [Objective] The research aimed to predict the B cell epitope of DMRT protein in *Oreochromis niloticus*. [Method] The secondary structure of amino acid sequence of DMRT protein was revealed by Carrier-Robson, Chou-Fasman and Karplus-Schulz methods. The hydrophilicity plot, surface probability and antigenic index were obtained by Kyte-Doolittle, Eniri and Janeson-Wolf methods, respectively. Based on the above results, the B cell epitopes for DMRT were predicted. [Result] Both the prediction results from Carrier-Robson, Chou-Fasman methods indicate that the  $\alpha$ -helix centers of DMRT protein in *Oreochromis niloticus* are in the N terminal No. 31-56, 68-75, 110-116, 209-211 and 239-243; the  $\beta$ -sheet centers of DMRT protein in *Oreochromis niloticus* are in the N terminal No. 95-99, 177-183, 225-234 and 251-254. With the assist of Kyte-Doolittle, Eniri and Janeson-Wolf methods, the B cell epitopes for DMRT were located in or nearby the N terminal No. 13-16, 35-38, 47-54, 84-93, 101-109, 127-156, 166-177 and 198-201. [Conclusion] These results are helpful for preparing antibody of DMRT protein and revealing the sex determination mechanism of *Oreochromis niloticus*.

**Key words** *Oreochromis niloticus*; DMRT protein; B cell epitopes; Secondary structure

作为目前已知最保守的性别分化相关基因, Dmt1 家族成员与果蝇的性别决定基因 Doublesex (dsx) 和线虫性别决定基因(Mab-3) 一样, 编码的蛋白质包含一个以锌指结构与特异 DNA 序列相结合的保守基序, 即 DM(doublesex and mab-3) 结构域, 参与性别决定和分化发育调控<sup>[1]</sup>。目前 DM 盒基因已发现存在于爬行类、鸟类及哺乳类动物中<sup>[2-3]</sup>。鉴定 Dmrt1 基因在性别决定及发育中的重要作用, 进一步对其参与调控的分子机制进行研究有重要意义。由于鱼类在脊椎动物系统进化中具有重要地位, 因而对其 Dmt 基因的研究将有助于阐明动物发育中的性别决定机制<sup>[4]</sup>。

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 属于鲈形目丽鱼科(Gichlidae) 罗非鱼属(*Tilapia*), 原产于非洲约旦, 是联合国推荐养殖的优质水产养殖品种, 1978 年由长江水产研究所引进。此外, 该鱼类还是研究性染色体进化的一个重要的模式生物。该研究在已获得的 DMRT 氨基酸的基础上, 运用计算机技术和分子生物学软件对 Dmt1 基因的蛋白质二级结构和 B 细胞抗原表位进行分析和预测, 为制备 DMRT 蛋白单克隆抗体及探索尼罗罗非鱼性别调控机理提供参考资料。

## 1 材料与方法

**1.1 DMRT 蛋白氨基酸序列** 尼罗罗非鱼 DMRT 的氨基酸序列测定见笔者前期报道<sup>[5]</sup>。具体序列见图 1。

## 1.2 方法

**1.2.1 DMRT 蛋白二级结构柔性区域预测。** 采用 Carrier-Robson 法, Chou-Fasman 法和 Karplus-Schulz 法预测蛋白质

的二级结构中的柔性区域, 各残基  $P$ ,  $P'$ ,  $PT$ ,  $PC$  等参数意义见文献[6-8]。

**1.2.2 DMRT 蛋白的 B 细胞表位预测。** 以 7 个氨基酸残基为一组, 按 Kyte-Doolittle 的氨基酸亲水性标准, 预测其亲水性; 按 Eniri 方案预测蛋白质的表面可能性; 以及按 Janeson-Wolf 方案预测抗原性指数。各方案参数的意义见文献[9-11]。

```

1  C S R C R N H G Y V S P L K G H K R F C
21  N W R D C Q C P K C K L I A E R Q R V M
41  A A Q V A L R R Q Q A Q E E E L G I C S
61  P V S L S G S E M M V K N E V G A D C L
81  F S V E G R S P T P T S H A T S A V T G
101 T R S A S S P S P S A A A R A H T E G P
121 S D L L L E T P Y Y N F Y Q P S R Y P T
141 Y Y G N L Y N Y S Q Y Q M P H G D G R L
161 P S H S V S S Q Y R M H S Y Y P A A T Y
181 L T Q G L G S T S C V P P F F S L D D N
201 N N S C S E T M A A S F S P G S I S A G
221 H D S T M V C R S I S S L V N G D A K A
241 E C E A S S Q A A G F T V D A I E G G A
261 T K
  
```

图1 尼罗罗非鱼 DMRT 氨基酸序列

Fig.1 Amino acid sequence of DMRT in *Oreochromis niloticus*

## 2 结果与分析

**2.1 DMRT 蛋白质二级结构预测** Carrier-Robson 法和 Chou-Fasman 法对 DMRT 蛋白的二级结构进行预测的结果基本一致, 均发现 DMRT 蛋白中 螺旋数目较少, 但 Carrier-Robson 法预测 DMRT 中 折叠数目比 Chou-Fasman 法多, 在分布区段上 螺旋与 折叠呈交叉分布; 在形成转角结构方面, 2 种方法预测的结果有一定差异, 但都呈散在性分布(图 2)。用 Karplus-Schulz 法预测 DMRT 蛋白的柔性区域, 发现该蛋白的柔性区域呈散在性分布, 其中 7 个较大的柔性区域位于第 11~17、47~55、84~94、97~110、182~190、198~206 和 229~240 区域(图 3)。

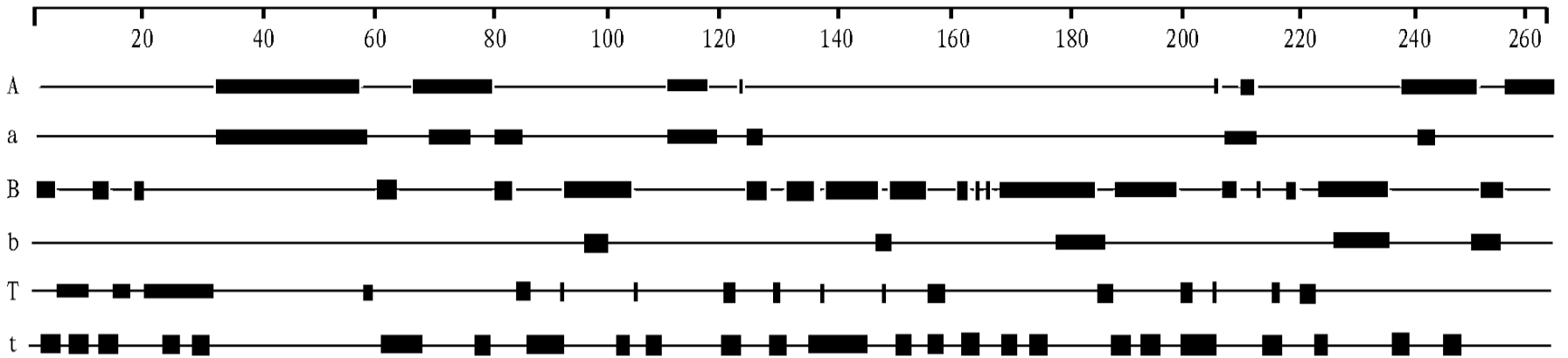
基金项目 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室资助项目。

作者简介 杨东(1974-), 男, 湖北武汉人, 博士, 讲师, 从事遗传学研究。\* 通讯作者。

收稿日期 2008-06-24

**2.2 DMRT 蛋白的 B 细胞表位可能性预测结果** 按 Kyte-Dodittle 的氨基酸亲水性标准, 预测 DMRT 蛋白分子 N 端第 1~40、45~57、84~180 区段和第 196~206 区段为高亲水性区域(图4)。按 Eniri 方案预测氨基酸残基位于蛋白质的表面可能性, 提示 DMRT 蛋白 N 端第 13~16、35~38、47~54、84~93、101~109、127~156、166~177 区段和第 198~201 区段很有

可能位于蛋白质的表面(图5)。按 Jameson-Wolf 方案, DMRT 蛋白分子 N 端第 1~9、10~39、45~58、81~95、99~109、111~125、152~170、195~206、213~225 和 234~247 区段为抗原性指数较高的区域(图6)。根据以上多种预测结果, 提示蛋白展示在蛋白表面的可能性区域可能是 B 细胞表位优势区域。



注:A, Carrier-Robson 法预测螺旋区域;B, Carrier-Robson 法预测折叠区域;T, Carrier-Robson 法预测转角区域;a, Chou-Fasman 法预测螺旋区域;b, Chou-Fasman 法预测折叠区域;t, Chou-Fasman 法预测转角区域。  
 Note: A, Helix regions predicted by Carrier-Robson method; B, Sheet regions predicted by Carrier-Robson method; T, Turn regions predicted by Carrier-Robson method; a, Helix regions predicted by Chou-Fasman method; b, Sheet regions predicted by Chou-Fasman method; t, Turn regions predicted by Chou-Fasman method.

图2 Carrier-Robson 法与 Chou-Fasman 法预测 DMRT 蛋白的二级结构

Fig.2 The secondary structure predicted by Carrier-Robson and Chou-Fasman methods

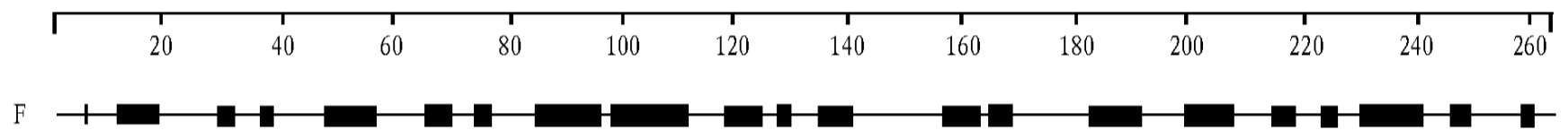


图3 DMRT 的柔性区域

Fig.3 Flexible regions of DMRT protein

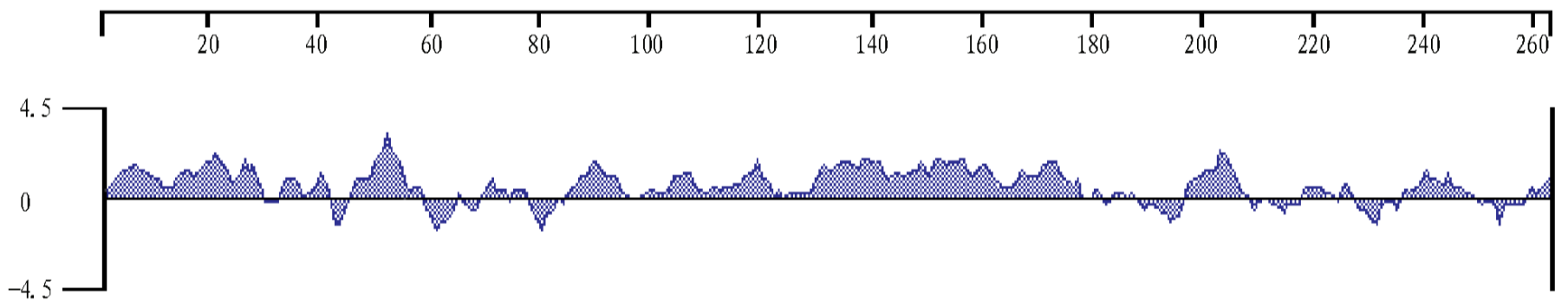


图4 DMRT 蛋白的亲水性分析

Fig.4 Hydrophilicity analysis of DMRT protein

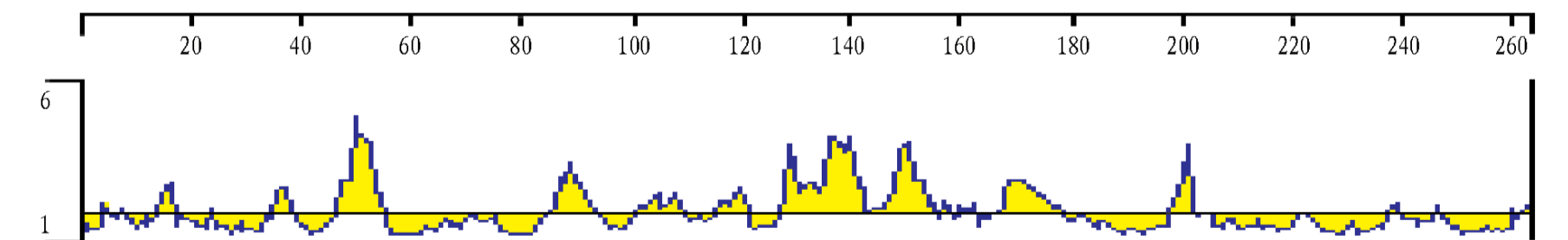


图5 DMRT 蛋白的表面可能性区域

Fig.5 Surface probability regions of DMRT protein

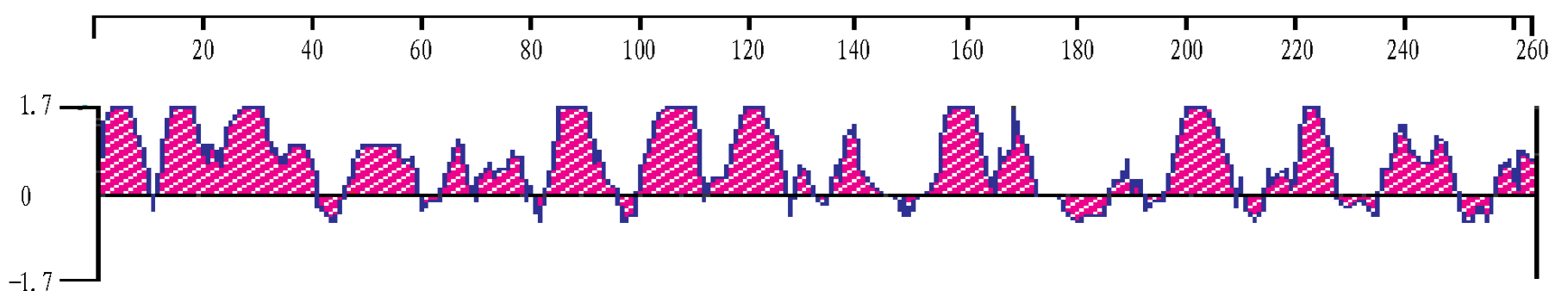


图6 DMRT 蛋白的抗原指数

Fig.6 Antigenic index of DMRT protein

- calcium-dependent protein kinase (CDPK) [J]. FEBS Lett, 1998, 430(3): 381-384.
- [6] FUGLSANG A T, GUO Y, CUNT A, et al. Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein [J]. Plant Cell, 2007, 19(5): 1617-1634.
- [7] SEHNKE P C, CHUNG H J, WU K, et al. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(2): 765-770.
- [8] SEHNKE P C, FERL R J. Plant metabolism: enzyme regulation by 14-3-3 proteins [J]. Curr Biol, 1996, 6(11): 1403-1405.
- [9] BORNE F. The variable C-terminus of 14-3-3 proteins mediates isoform-specific interaction with sucrose-phosphate synthase in the yeast two-hybrid system [J]. J Plant Physiol, 2005, 162(2): 161-168.
- [10] COMPAROT S, LINQIAH G, MARTIN T. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism [J]. J Exp Bot, 2003, 54: 595-604.
- [11] IILLO C, KAZAZIC S, RUCFF P, et al. Characterization of nitrate reductase from light- and dark-exposed leaves. Comparison of different species and effects of 14-3-3 inhibitor proteins [J]. Plant Physiol, 1997, 114: 1377-1383.
- [12] SCHOONHEIM P J, VEGA H, PEREIRA D D A C, et al. A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach [J]. Plant Physiol, 2007, 143(2): 670-683.
- [13] MARGOLIS S S, WALSH S, WISER D C, et al. PPI control of M-phase entry executed through 14-3-3-regulated CDC25 dephosphorylation [J]. EMBO J, 2003, 22: 5734-5745.
- [14] DE VETTEN N C, LUG, FERL R J. A maize protein associated with the G-box binding complex has homology to brain regulatory proteins [J]. Plant Cell, 1992, 4(10): 1295-1307.
- [15] SCHLITZ T F, MEDINA J, HILL A, et al. 14-3-3 proteins are part of an abscisic acid-MYB19 (VPI) response complex in the E-primaster and interact with VPI and EnBP1 [J]. Plant Cell, 1998, 10(5): 837-847.
- [16] PANS, SEHNKE P C, FERL R J, et al. Specific interactions with TBP and TFIIB in vitro suggest that 14-3-3 proteins may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex [J]. Plant Cell, 1999, 11(8): 1591-1602.

(上接第11670页)

### 3 讨论与结论

Garner- Robson 法, Chou - Fasman 法和 Karplus - Schulz 法所预测蛋白质的二级结构有一定差异。但预测结果均表明尼罗罗非鱼 DMRT 蛋白 N 端第 31 ~ 56、68 ~ 75、110 ~ 116、209 ~ 211 区段和第 239 ~ 243 区段可能为  $\alpha$  螺旋中心; N 端第 95 ~ 99、177 ~ 183、225 ~ 234 区段和第 251 ~ 254 区段可能是  $\beta$  折叠中心。综合分析结果表明 DMRT 蛋白分子 N 端第 5 ~ 6、40 ~ 44、105 ~ 107、112 ~ 116、189 ~ 190、202 ~ 203 区段和第 210 ~ 215 区段及 11 ~ 17、47 ~ 55、84 ~ 94、97 ~ 110、182 ~ 190、198 ~ 206、229 ~ 240 区域, 有较柔软的结构。这些区段有可能进行一定幅度的摆动或折叠而形成较复杂的三级结构。

Kyte - Doolittle 方案, Eniri 方案和 Jameson - Wolf 方案预测结果综合分析, DMRT 蛋白 N 端第 1 ~ 15、37 ~ 47、99 ~ 120、161 ~ 165、172 ~ 176、181 ~ 192 区段和第 196 ~ 215 区段可能为 B 细胞表位。根据 Garner - Robson 法, Chou - Fasman 方法和 Karplus - Schulz 方法的预测结果, 在 DMRT 蛋白分子 N 端第 1 ~ 15、37 ~ 47、99 ~ 120、181 ~ 192 区段和第 196 ~ 215 区段内或附近都有柔性区域。所以, 这几个区段内或附近很可能为 B 细胞表位优势区域。

蛋白质中某段氨基酸序列能否诱导体内产生抗体与其是否位于蛋白表面, 亲水性和机体免疫状态等有关。该研究

- [17] SCHOONHEIM P J, SINIGE M P, CASARETTO J A, et al. 14-3-3 adaptor proteins are intermediates in ABA signal transduction during barley seed germination [J]. Plant J, 2007, 49(2): 289-301.
- [18] GAMPALAS S, KIM T W, HE J X, et al. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis [J]. Dev Cell, 2007, 13(2): 177-189.
- [19] ISHIDA S, FUKAZAWA J, YUASA T, et al. Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator Repression of shoot growth by gibberellins [J]. Plant Cell, 2004, 16(10): 2641-2651.
- [20] BAI M Y, ZHANG L Y, GAMPALAS S, et al. Functions of GZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(34): 13839-13844.
- [21] CHEN F, LI Q, SUN L, et al. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress [J]. DNA Res, 2006, 13(2): 53-63.
- [22] XU W F, SHI W M. Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: Analysis by real-time RT-PCR [J]. Ann Bot (Lond), 2006, 98(5): 965-974.
- [23] 徐碧玉, 苏伟, 张建斌, 等. 香蕉果实 SMART cDNA 文库的构建及利用 PCR 方法筛选香蕉 Actin2 基因 [J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(5): 375-380.
- [24] 李燕强, 金志强, 徐碧玉. 香蕉果实 RNA 提取方法的改进和比较 [J]. 福建热作科技, 2005, 30(2): 37-43.
- [25] YAO Y, DU Y, JIANG L, et al. Molecular analysis and expression patterns of the 14-3-3 gene family from *Oryza sativa* [J]. J Biochem Mol Biol, 2007, 40(3): 349-357.
- [26] VAN HEUSDEN G P, GRIFFITHS D J, FORD J C, et al. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue [J]. Eur J Biochem, 1995, 229(1): 45-53.
- [27] VAN HEUSDEN G P, VANDERZANDEN A L, FERL R J, et al. Four Arabidopsis thaliana 14-3-3 protein isoforms can complement the lethal yeast bnh1 bnh2 double disruption [J]. FEBS Lett, 1996, 391(3): 252-256.

的分析是基于单个氨基酸的性质, 缺少对氨基酸残基之间力的相互作用分析, 所以预测抗原表位尤其是构象依赖性表位有一定的局限性。该研究仅对 DMRT 蛋白的候选表位进行初步筛选, 其效果必须通过分子生物学试验来确认。

### 参考文献

- [1] RAYMOND C S, SHAMU C E, SHEN M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex determining genes [J]. Nature, 1998, 391: 691-695.
- [2] REN L L, CHENG H H, GUO Y Q, et al. Evolutionary conservation of Dmt gene family in amphibians, reptiles and birds [J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(23): 1992-1996.
- [3] SMITH C A, MCCLIVE P J, WESTEMPS, et al. Conservation of a sex determining gene [J]. Nature, 1999, 402: 601-602.
- [4] MARCHANDO, GOROROUN M, DCOTTA H, et al. DMR11 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1493: 180-187.
- [5] 杨东, 刘红艳, 张繁荣, 等. 尼罗罗非鱼性别相关基因 Dmt1 的 RACE 扩增和序列分析 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(15): 6194-6195, 6222.
- [6] GARNER J, OSCUTHORPE D J, ROBSON B. Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins [J]. J Mol Biol, 1978, 120: 97-120.
- [7] CHOU P Y, FASMAN G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence [J]. Adv Enzymol, 1978, 47: 45-148.
- [8] CHOU P Y. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation [M]. New York: Plenum Press, 1990: 549-586.
- [9] KARPLUS P A, SCHLITZ G E. Prediction of chain flexibility in proteins [J]. Naturwissenschaften, 1985, 72: 212-213.
- [10] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. J Mol Biol, 1982, 157: 105-132.
- [11] EMIN E A, HUGHES J, PERLOW D. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide [J]. J Virology, 1985, 55: 836-839.