

## 香蕉14-3-3蛋白基因 Ma-14-3-3d 的克隆及序列分析

李美英<sup>1,2</sup>, 徐碧玉, 杨小亮, 刘菊华, 张建斌, 金志强\*

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 2. 海南大学农学院, 海南儋州 571737)

**摘要** [目的] 克隆分析香蕉中14-3-3蛋白编码基因。[方法] 采用PCR与RACE技术相结合的方法克隆香蕉14-3-3基因, 并进行CDNA测序及同源性分析。[结果] 所克隆cDNA全长866 bp, 编码197个氨基酸残基, 具有植物14-3-3蛋白基因的特征结构域, 并与其他植物来源的14-3-3蛋白具有很高的序列相似性, 将其命名为Ma-14-3-3d(Musa acuminata 14-3-3 gene)。[结论] Ma-14-3-3d蛋白与来源于单子叶植物的14-3-3蛋白位于同一进化枝上。

**关键词** 香蕉; Ma-14-3-3d; 14-3-3蛋白; 克隆

中图分类号 S668.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)27-11691-04

## Cloning and Sequence Analysis of Ma-14-3-3d Encoding a Homologue 14-3-3 Protein from Banana

LI Mei-ying et al (Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

**Abstract** [Objective] The aim of the study is to clone and analyze the gene encoding 14-3-3 protein from banana. [Method] Together with PCR amplification, RACE (rapid amplification of cDNA ends) technique was employed to clone 14-3-3 gene from banana, then the amplified sequence was sequenced and homologously analyzed. [Result] A new cDNA homologous with 14-3-3 protein genes were obtained by RT-PCR and RACE (rapid amplification of cDNA ends) approaches. The full length of this cDNA was 866 bp encoding 197 amino acids. Alignment of deduced amino acid sequence with those from other plants revealed that the cDNA shared high homology with 14-3-3 protein genes from other plants, and was designated as Musa acuminata 14-3-3 gene (Ma-14-3-3d). Phylogenetic analysis reveals that Ma-14-3-3d has closer genetic relationship with those from monocotyledon species than those from other species. [Conclusion] Ma-14-3-3d belongs to the same lineage of 14-3-3 from monocotyledon.

**Key words** Banana; Ma-14-3-3d; 14-3-3 protein; Cloning

14-3-3蛋白是广泛存在于真核生物细胞中一类多基因家族蛋白, 结构高度保守, 分布于细胞内不同区域, 参与调控细胞内各种生命代谢过程<sup>[1-2]</sup>。14-3-3蛋白在四级结构上形成高度螺旋化的杯状二聚体蛋白, 内部形成带有负电荷的两性结构域槽, 构成这个槽的螺旋的一级氨基酸序列在所有的物种之间非常保守<sup>[3]</sup>。这种保守的两性结构域槽使得14-3-3蛋白二聚体可以与具有一定特征序列的靶蛋白配体相结合。

14-3-3蛋白与目标靶蛋白的结合随着细胞内环境的改变而变化, 且调控多种目标靶蛋白。大麦中有100多种蛋白质可与14-3-3蛋白发生作用, 包括各种蛋白激酶<sup>[4-6]</sup>、酶<sup>[7-11]</sup>、受体<sup>[12]</sup>、支架蛋白、细胞周期调控蛋白<sup>[13]</sup>、转录因子<sup>[14-16]</sup>和凋亡因子、线粒体/叶绿体前体蛋白以及植物激素信号转导过程的中介调节因子等<sup>[2,12,17-20]</sup>。所以植物的14-3-3蛋白具有多种调控功能, 与碳、氮代谢过程中的许多关键酶相结合进而调控着植物的碳、氮的代谢<sup>[7-11]</sup>, 与质膜H<sup>+</sup>-ATP酶相结合调控着物质的跨膜运输过程<sup>[6,10]</sup>, 与多种蛋白激酶结合参与调控着细胞的许多信号转导活动<sup>[5-6]</sup>, 与许多转录因子结合调控着基因的转录<sup>[14-16]</sup>, 参与植物对生物以及非生物的胁迫响应<sup>[21-22]</sup>。

香蕉是一种重要的热带、亚热带水果, 改良其品质为香蕉科学研究的一项主要内容。克隆香蕉中与生长发育相关的基因, 是从分子水平探索香蕉果实发育调控机理的必要途径。香蕉14-3-3蛋白可能在果实发育、品质形成及响应各种逆境反应过程中起着重要的调控功能。鉴于此, 笔者通过设计兼并引物, 利用降落PCR方法结合RACE技术克隆了香蕉

中的1个14-3-3蛋白基因的同源cDNA全长序列, 对该序列进行了初步的生物信息学分析, 为进一步研究香蕉14-3-3蛋白对其果实生长发育、在果实采后成熟过程中及在病原菌防卫反应中的调控规律奠定了基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 香蕉叶片和果实采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所澄迈香蕉种植园。香蕉果实cDNA文库由该研究组构建<sup>[23]</sup>; 大肠杆菌菌株由金志强实验室保存; 琼脂糖凝胶电泳产物回收纯化试剂盒购自QIAGEN公司; 克隆载体pMD18-T Vector与T4 DNA连接酶购自TaKaRa公司; Taq DNA聚合酶与DNA marker购自申能博采公司; 反转录试剂盒购自Fermantas公司; 其他试剂均为国产分析纯。

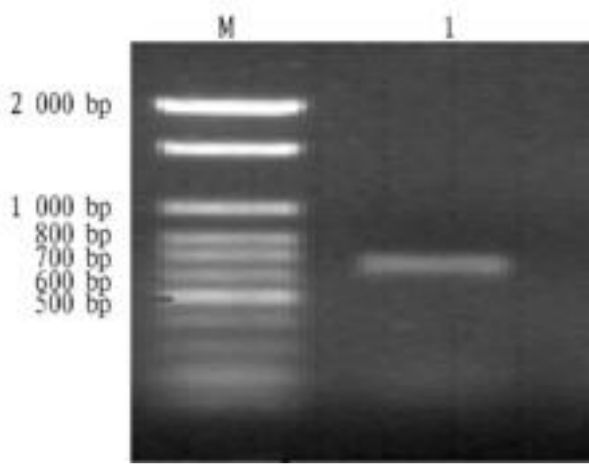
**1.2 香蕉总RNA的提取和反转录** 香蕉叶片及果实总RNA的提取按照改良CTAB方法<sup>[24]</sup>进行。所获总RNA用紫外分光光度计进行定量后, 取2 μg进行反转录合成cDNA第一链, 方法参照Fermantas反转录试剂盒使用说明。

**1.3 全长cDNA克隆** 根据GenBank中已经登录的其他植物14-3-3蛋白基因的核苷酸序列, 以保守结构区域设计一对兼并引物, 其上游引物为P1: 5'-NGARCARGCNGARMGNTAYG-3', 下游引物为P2: 5'-GANGTCCANARNGTNARRTR-3'。采用降落PCR方法以香蕉叶片RNA反转录的单链cDNA为模板, 克隆14-3-3蛋白基因的部分cDNA片段。PCR反应体系为: 10×PCR buffer 2.5 μl, Mg<sup>2+</sup> (2.5 mmol/L) 1.5 μl, cDNA文库液1 μl, 上游引物(10 mmol/L) 1 μl, 下游引物(10 mmol/L) 1 μl, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5 μl, Taq酶(5 U/μl) 0.3 μl, 加ddH<sub>2</sub>O至总体积25 μl。降落PCR的反应程序如下: 94℃ 预变性5 min后, 先进行10个循环的降落PCR反应, 94℃ 预变性50 s, 退火温度由60℃ 降到50℃, 每个循环降1℃, 时间45 s, 72℃ 延伸45 s; 再以94℃ 预变性50 s, 50℃ 退火45 s, 72℃ 延伸45 s, 进行30个循环常规PCR反应, 72℃ 终延伸10 min。

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(30471207)和公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-029)。

**作者简介** 李美英(1974-), 女, 山东菏泽人, 在读博士, 助理研究员, 从事基因工程在作物遗传育种中的应用。\* 通讯作者。

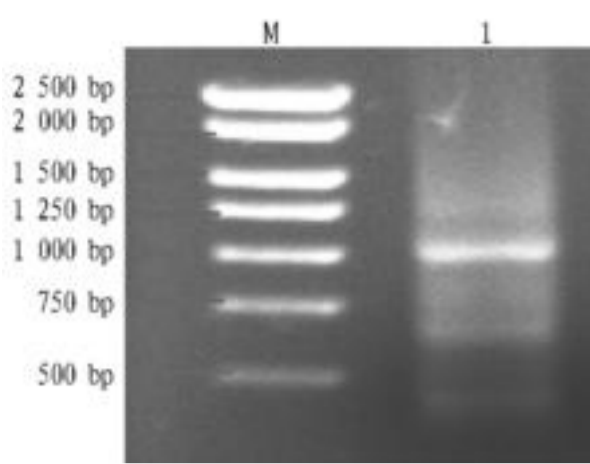
收稿日期 2008-06-16



注: M, marker ;1, 兼并引物 PCR 产物。

Note : M, Marker ;1, PCR amplification products by using degenerate primers .

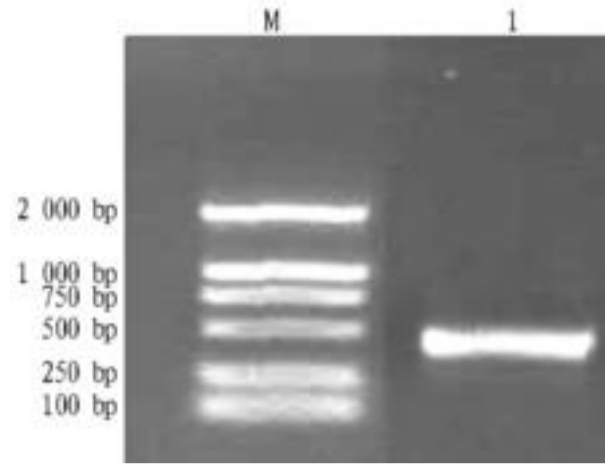
图1 兼并引物 PCR 扩增产物电泳结果  
Fig.1 The electrophoresis results of PCR amplification by using degenerate primers



注: M, marker ;1, 5 RACE PCR 产物。

Note : M, Marker ;1, Product of 5 RACE PCR amplification .

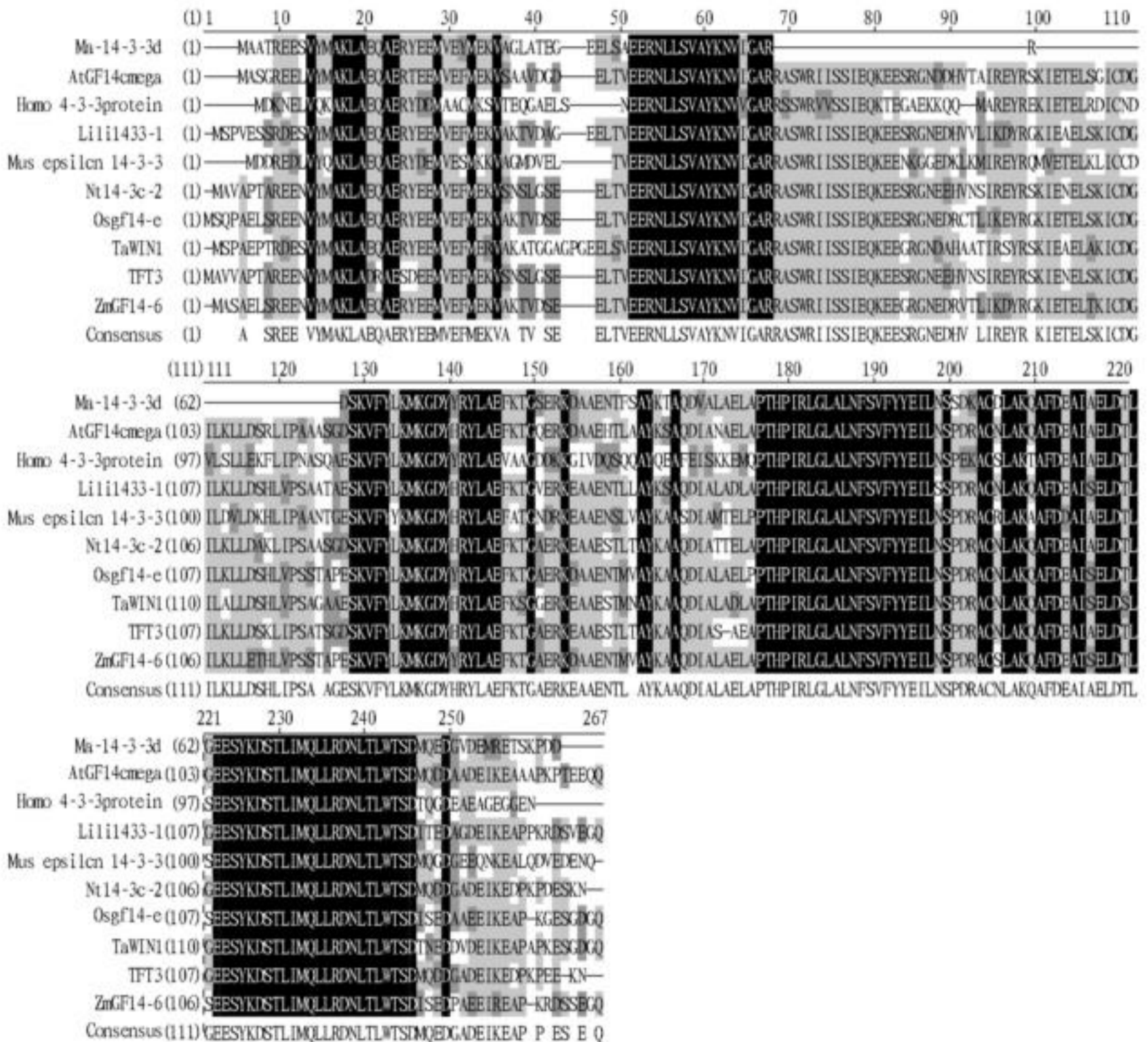
图2 Ma-14-3-3d 5 RACE PCR 扩增产物电泳结果  
Fig.2 The results electrophoresis of 5 RACE PCR amplification for Ma-14-3-3d



注: M, marker ;1, 3 RACE PCR 产物。

Note : M, Marker ;1, Product of 3 RACE PCR amplification .

图3 Ma-14-3-3d 3 RACE PCR 扩增产物电泳结果  
Fig.3 The electrophoresis results of 3 RACE PCR amplification for Ma-14-3-3d



注: 图中基因所属物种及对应序列号为: 拟南芥 AtGF14omega, AAA96253; 人 1433z, U28964; 百合 14-3-3-1, EF397607; 小鼠 14-3-3 epsilon, AF83478; 烟草 14-3-3c-2, BAD12172; 水稻 14-3-3e, AJ276594; 小麦 TaWIN1, BAB11739; 西红柿 TFT3, P93209; 玉米 ZnGF14-6, P49106。黑色区域部位的氨基酸序列同源一致性最高, 灰色区域部位同源性较高。

Note : The corresponding species for accession number in the figure are as follows . Arabidopsis AtGF14omega, AAA96253 ; Human 1433z, U28964 ; Lily 14-3-3-1, EF397607 ; Mouse 14-3-3 epsilon, AF83478 ; Tobacco 14-3-3c-2, BAD12172 ; Rice 14-3-3e, AJ276594 ; Wheat TaWIN1, BAB11739 ; Tomato TFT3, P93209 ; Maize ZnGF14-6, P49106 . Black area denotes highest homology of amino acid sequence, gray area denotes higher homology of amino acid sequence .

图4 Ma-14-3-3d 推导的氨基酸序列与其他植物和人类及小鼠的 14-3-3 蛋白氨基酸序列多重比对结果

Fig.4 The results of multiple sequence alignment among putative amino acid sequence of Ma-14-3-3d and amino acid sequences of 14-3-3 proteins from other plants, human and mouse

根据上述兼并引物克隆到的香蕉 14-3-3 蛋白同源基因的 cDNA 片段, 采取 RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 技术克隆该 cDNA 片段的全长序列。分别设计 5 RACE 的下游引物和 3 RACE 的上游引物, 5 RACE 的下游引物为 5'-CAAA-GAGTCAGGTTGTCAG-3', 3 RACE 的上游引物为 5'-AACAG-CTTCTCCGCCTACAAGG-3'。5 RACE 的上游引物为香蕉果实 cDNA 文库的接头引物 ptr5 :5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3', 3 RACE 的下游引物为文库的接头引物 ptr3 :5'-TAATAG-GACTCACTCACTATAGGG-3'。以香蕉果实的 cDNA 文库库液为模板进行 5' 末端和 3' 末端的 cDNA 片段扩增。反应程序为: 94 预变性 5 min 后, 94 变性 50 s, 55 退火 45 s, 72 延伸 45 s, 共 35 个循环, 72 终延伸 10 min。

**1.4 cDNA 序列测定及分析** 使用兼并引物扩增获得的 cDNA 片段产物, cDNA 5' 和 3' 末端产物经琼脂糖凝胶电泳后, 采用 II Angel Mri/ Mdi Purification Kit 试剂盒回收目的片段, 然后克隆到 pMD18-T 载体上, 进行序列测定(上海生工生物工程有限公司)。用 Vector NII 9.0 软件进行多序列比对分析, 用 MEGA 3.1 软件的 NJ (Neighbor-Joining) 法构建系统进化树。

## 2 结果与分析

**2.1 香蕉叶片同源 cDNA 片段的克隆** 采用兼并引物和降落 PCR 技术以香蕉叶的单链 cDNA 为模板克隆扩增香蕉 14-3-3 蛋白的基因的同源 cDNA 片段。PCR 扩增产物大小约为 650 bp 左右, PCR 扩增产物的电泳结果如图 1 所示。PCR 产物测序后, 通过 NCBI 中 BLASTX 软件分析发现该 cDNA 片段与其他植物 14-3-3 蛋白基因有很高的同源性, 为香蕉 14-3-3 蛋白基因。

**2.2 Ma-14-3-3d 基因全长 cDNA 的克隆** 在获得 cDNA 片段的基础上, 以香蕉果实 cDNA 文库库液为模板进行 5 RACE 及 3 RACE 的 PCR 扩增。如图 2 所示, 5 RACE PCR 产物为 900 bp 左右; 3 RACE PCR 扩增产物为 480 bp 左右(图 3)。

扩增所获 5' 和 3' 末端产物经序列测定分析拼接后得到长 866 bp 的 cDNA 序列。通过 BLASTX 软件分析表明, 该 cDNA 编码蛋白的氨基酸序列与其他植物的 14-3-3 蛋白的氨基酸序列具有很高的同源性。

**2.3 Ma-14-3-3d 基因序列分析** BLASTX 软件分析表明(图 4), 该 cDNA 序列内部有一段缺失, 所以该 cDNA 编码的氨基酸序列与其他物种相比同源性相对较低。与马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 的 14-3-3 蛋白 16R (AAL50217) 的同源一致性为 62%, 相似性为 68%; 与西红柿 (*Lycopersicon esculentum*) 的 14-3-3 蛋白 6 (TFT6) (AAL04424) 的同源一致性为 63%, 相似性为 69%; 与西红柿 14-3-3 蛋白 5 (TFT5) (CAA65148) 的同源一致性为 61%, 相似性为 69%; 与烟草 (*Nicotiana tabacum*) 14-3-3  $\alpha$ -1 (BAD12168) 的同源一致性为 59%, 相似性为 68%; 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) GF14 $\omega$  (AAA96253) 的同源一致性为 59%, 相似性为 67%; 与小麦 (*Triticum aestivum*) TaWN2 (BAB11740) 的同源性一致性为 56%, 相似性为 66%。与烟草 14-3-3 e-1 (BAD12176) 的同源性一致性为 57%, 相似性为 66%; 与大麦 (*Hordeum vulgare*) 的 14-3-3 蛋白 Hv14-3-3E (ABC00201) 的同源性一致性为 57%, 相似性为 67%; 玉米 (*Zea mays*) GF14-6 (AAB33304) 的同源性一致性为 57%, 相似

性为 64%。因此, 笔者认为该 cDNA 编码香蕉中的 14-3-3 蛋白命名为 Ma-14-3-3d (*Musa acuminata* 14-3-3d)。

在序列比对的基础上构建系统进化树, 以确定 Ma-14-3-3d 在系统进化中的地位。结果如图 5 所示, Ma-14-3-3d 与来自单子叶植物如小麦、大麦、水稻和百合的 14-3-3 基因的氨基酸序列亲缘关系较近, 并处于同一进化枝上, 说明该基因的进化与物种的进化可能相一致。

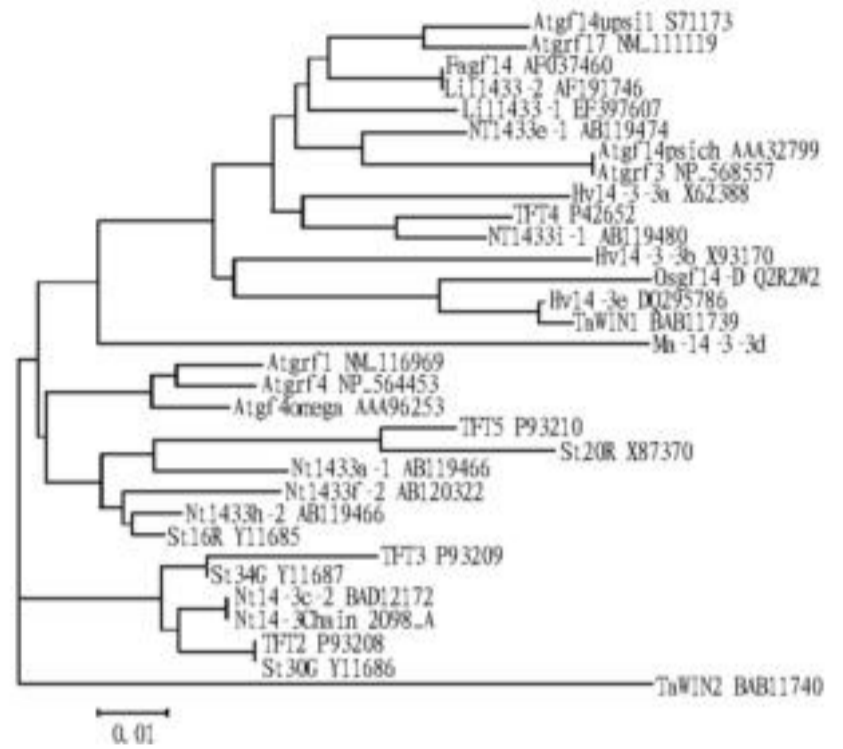


图5 Ma-14-3-3d 推导的氨基酸序列与其他植物 14-3-3 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of Ma-14-3-3d and amino acid sequences of 14-3-3 proteins from other plants

## 3 讨论

14-3-3 蛋白在植物器官发育、形态建成及对不同逆境生理条件的反应中具有很重要的作用。酵母的 2 个 14-3-3 蛋白 (BMh1 和 BMh2) 基因缺失可导致致死突变; 有研究表明, 植物同源的 14-3-3 蛋白基因能使酵母的致死突变体 bmh1 bmh2 复活<sup>[25-26]</sup>; 在水稻中, 14-3-3 蛋白编码基因 OsGf14-c 和 OsGf14-e 能完全弥补酵母的 BMh1 和 BMh2 的功能, 而 OsGf14-b 则没有这种基因互补的功能<sup>[27]</sup>。

经多重序列比对分析发现, Ma-14-3-3d 推导的氨基酸序列与马铃薯、西红柿、烟草、拟南芥、大麦、小麦和玉米等植物 14-3-3 蛋白的氨基酸序列的同源性较高, 推测其也具有其他植物 14-3-3 蛋白的功能及广泛结合不同目标靶蛋白的潜力。系统遗传进化分析发现, Ma-14-3-3d 与单子叶植物小麦生长发育必需的 14-3-3 蛋白 TaWN2 的亲缘关系较近, 并位于同一进化枝上, 这表明香蕉的 14-3-3 蛋白可能是维持香蕉生长发育的一种必需的功能调控蛋白。该研究为进一步探索 14-3-3 蛋白对香蕉生长发育调控机理奠定了基础。

## 参考文献

- [1] SEHNKE P C, DEILLE J M, FERL R J. Consuming signal transduction: The role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity [J]. *Hort Sci*, 2002, (51): 339-354.
- [2] ATKENA. 14-3-3 proteins: A historic overview [J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16 (3): 162-172.
- [3] BRIDGES D, MOORHEAD G B G. Review update: 14-3-3 proteins: A number of functions for a numbered protein [J]. *Sci STKE*, 2005, 296: 59-66.
- [4] YAFFE M B, RITTINGER K, VOINA S, et al. Structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity [J]. *Cell*, 1997, 91: 961-971.
- [5] CAMON L, HARPER J F, PALMGREN M G. 14-3-3 proteins activate a plant

- 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 EBP1 [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.

- [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 GEBZ1 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.

(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, Enri 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

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, SHAMUCE, 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. DMRT 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: Renum 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.