

[15] Meng J Z, Wang H Y, Liu X M, et al. Construction of small plasmid vectors for use in genetic improvement of the extremely acidophilic *Acidithiobacillus caldus* [J]. *Microbiological Research* 2013, 168: 469–476.

[16] Chen Z W, Liu Y Y, Wu J F, et al. Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, 74: 688–698.

[17] Bustamante P, M. Tello and O. Orellana. Toxin-antitoxin systems in the mobile genome of *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.

[18] González-Toril E, Aguilera A, Rodríguez N, et al. Microbial ecology of Río Tinto, a natural extreme acidic environment of biohydrometallurgical interest [J]. *Hydrometallurgy* 2010, 104 (3–4): 329–333.

## 大黄鱼 QM-like (PcQM) 蛋白生物信息学分析

陈心<sup>1,2</sup>, 叶全武<sup>1</sup>, 谢焕松<sup>1</sup>, 王军<sup>3</sup>, 苏永全<sup>3</sup>

1. 南通大学 生命科学学院 江苏 南通 226019; 2. 南通大学 海洋学院 江苏 南通 226019; 3. 厦门大学 海洋与地球学院 福建 厦门 361005

**摘要:** [目的]通过分析 PcQM 蛋白质的结构, 预测其高级结构和功能, 为进一步研究 PcQM 蛋白提供理论依据。[方法]利用 Blast P 和相关分析蛋白质理化性质与结构的软件, 对 PcQM 蛋白进行结构与功能预测分析。[结果]PcQM 蛋白不存在 N 端信号肽, 存在多个酶切位点, 无跨膜结构, 定位在细胞质中。不存在二硫键, 该蛋白含 26.05%  $\alpha$ -螺旋结构 (H), 20.93%  $\beta$ -折叠结构 (E), 53.02% 无规则卷曲 (L)。最后通过 Swiss-Model 程序预测了 PcQM 蛋白的三级结构。[结论]较全面地分析和预测了 PcQM 蛋白的理化性质、二级结构和三级结构等。为深入分析 PcQM 在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 体内免疫调节功能研究, 提供了理论依据。

**关键词:** PcQM 蛋白, 生物信息学, 理化性质, 二级结构, 三级结构

中图分类号: Q811.4 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-311X.2014.06.0136-4

## Bioinformatics analysis of QM-like (PcQM) protein from *Pseudosciaena crocea*

Xin Chen<sup>1,2</sup>, Quanwu Ye<sup>1</sup>, Huansong Xie<sup>1</sup>, Jun Wang<sup>3</sup>, Yongquan Su<sup>3</sup>

1. School of Life Science, Nantong University, Nantong 226019, China; 2. College of Ocean, Nantong University, Nantong 2260193, China; 3. College of Ocean & Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract [Objective]** The purpose of this study was to learn more function of PcQM protein by analyzing the AA sequence and predicting the structure of it. **[Methods]** Some related bioinformatics analysis software or system on internet such as Blast P, PredictProtein, Swiss-Model, was used to analyze the structure and prediction the structure and function of PcQM protein. **[Results]** The results showed that PcQM protein had many restriction enzyme sites. There was no signal peptide on N-terminal and no transmembrane structure. It was located in the cytoplasm. There were 26.05%  $\alpha$ -helical (H), 20.93%  $\beta$ -pleated sheet (E) and 53.02% random coil (L) predicted by PredictProtein. The tertiary structure was predicted by Swiss-Model. **[Conclusion]** The study has analyzed the sequence of PcQM protein and predicted the structure of it, which would lay a foundation for further learning the relationship between structure and function of the protein.

**Key words:** PcQM protein, bioinformatics, physicochemical property, secondary structure, tertiary structure

### 0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 隶属于脊索动物门 (Osteichthyes)、鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄鱼属 (*Larimichthys*) , 主要分布于中国和朝鲜沿海水域, 为我国主要的海产经济鱼类之一<sup>[1-2]</sup>。由于海洋环境污染严重, 病害发生频繁, 抗生素使用泛滥等, 造成大黄鱼种质资源退化严重<sup>[3-4]</sup>。深入了解其免疫机制, 是提高大黄鱼抗病能力的基础。

随着研究的深入, 发现核糖体蛋白不仅是组成核糖体的

一种重要组成成分, 而且具有多种核糖体外功能。在细胞生长、凋亡等过程中, 均有重要作用<sup>[5]</sup>。QM-like 蛋白属于核糖体大亚基中的一种蛋白 L10 (RPL10), 在细胞的生长、增殖、分化等过程中, 同样具有重要作用<sup>[6-8]</sup>。已有研究表明, QM-like 蛋白在鱼体的免疫系统中, 同样起着重要的调控作用<sup>[9-11]</sup>。目前为止, 对于鱼类 QM-like 蛋白的研究, 主要集中在 mRNA 等基因水平的分析, 对其蛋白高级结构与预测, 仅见美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 中报道<sup>[12]</sup>。本文主要利用各种生物信息学方法, 分析大黄鱼体内 PcQM 蛋白的 AA 序列, 并预测其蛋白高级结构, 为深入研究该蛋白在大黄鱼体内的免疫调节功能奠定理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

分析用 PcQM cDNA 和蛋白质序列均由作者实验室克隆并翻译获得, 上传至 GeneBank 数据库。PcQM cDNA 和 AA 序列号分别为 FJ455761 和 ACS93602。

PcQM AA 序列: mgrlarcyr ycknkpykps rfergvpdpk irifdlgrkk akvdefplcg hmvsdeyeql ssealeaari cankymvktc kgdgfhirmr lhpfhvi-

资助项目: 江苏省高校自然科学研究面上项目 (No. 12KJD240001) 资助 Supported by the the Natural Science Research Program of Universities in Jiangsu Province, China No. 12KJD240001

作者简介: 陈心 (1979-), 女, 江苏海门人, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 海洋生物免疫学与海洋生物活性物质, 发表论文 10 余篇, 其中 SCI 收录 3 篇, 获发明专利 1 项, Tel: 0513-85012821, Email: chenxin\_790523@163.com。苏永全 (1950-), 男, 教授, 博士生导师, 从事海水养殖病害防治、海水鱼类种质资源和遗传改良研究, 发表论文 80 余篇, 获新型实用专利 3 项、发明专利 3 项, Email: yqsu@xmu.edu.cn。收稿日期: 2014-07-21; 修回日期: 2014-08-19

rin kmlscagadr lqtmrgafg kpqgtvarvh igqvimsvrt kaqnkehvve alr-  
rakfkfp grqkihiskk ygftkfnacd fndmmaekrl ipdgegvkyi  
psrgplsrwk alhav

具体实验材料来源见参考文献[10]。

1.2 方法

将 PcQM AA 序列提交到网站 <http://www.expasy.org/> ,分析 PcQM 蛋白的疏水性、消光系数、酶切位点等理化性质进行分析;打开 SignalP4.1 Server ,提交 PcQM AA ,预测信号肽;将 PcQM AA 在 Blast P ( <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ) 程序中进行比对 分析 PcQM 蛋白保守结构域;打开 PredictProtein 程序 提交 PcQM AA 序列 ,对 PcQM 二级结构进行预测;打开 Swiss - Model 网站 ,提交 PcQM AA 序列 ,预测空间三维结构。

2 结果与分析

2.1 PcQM 蛋白理化性质分析和信号肽预测

将 PcQM AA 序列提交至网站 <http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl> ,分析其疏水性。结果表明 ,PcQM 蛋白总平均疏水性指数( Grand average of hydropathicity) 均为 -0.52 ,如图 1 所示。其中疏水性最强的分值都为 1.27 ,而最弱的都为 -2.78。按照氨基酸分值越低亲水性越高 ,分值越高疏水性越强的原则 ,PcQM 蛋白均表现为亲水性。经网站 <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> 分析可知 ,在水溶液 280 nm 处 ,SoQM 蛋白质浓度为 1.00 g/L。假设半胱氨酸( Cys) 都以还原态形式存在时 ,PcQM 蛋白的消光系数( Extinction coefficients) 都为 1 6430/M cm 吸光系数( Abs) 为都 0.67; 相同条件下 ,当 Cys 都以氧化态形式存在时 ,PcQM 蛋白消光

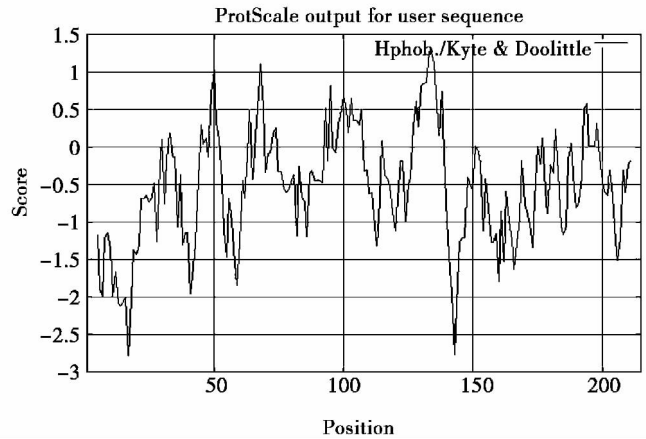


图1 PcQM 蛋白疏水性分析

Figure 1 Analysis of the hydrophobicity of PcQM protein

系数为 15 930 /M cm ,Abs 为 0.65。PcQM 蛋白的脂溶性指数( Aliphatic index) 为 67.16。通过网站 <http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/> 对 PcQM 蛋白的酶切位点进行了分析 ,结果表明 PcQM 蛋白都具有多个酶切位点 ,其中 Arg - C proteinase 有 22 个位点; Clostripain 有 22 个位点; Proteinase K 有 77 个位点; Trypsin 有 42 个位点。经过 PredictProtein 程序分析 ,PcQM 蛋白具有 2 个酰胺化位点( 1/MGRR 36/LGRK) 2 个蛋白酶 C 磷酸化位点( 137/SVR 和 168/SKK) ,1 个 N - 肉豆蔻酰位点( 114/GMRGAG) ,同时还都含有 1 个核糖体蛋白 L10 特征结构( RGAFGKPQGTVARV)。通过 Signal P4.1 分析可知 ,PcQM 蛋白无信号肽 ,如图 2 所示。

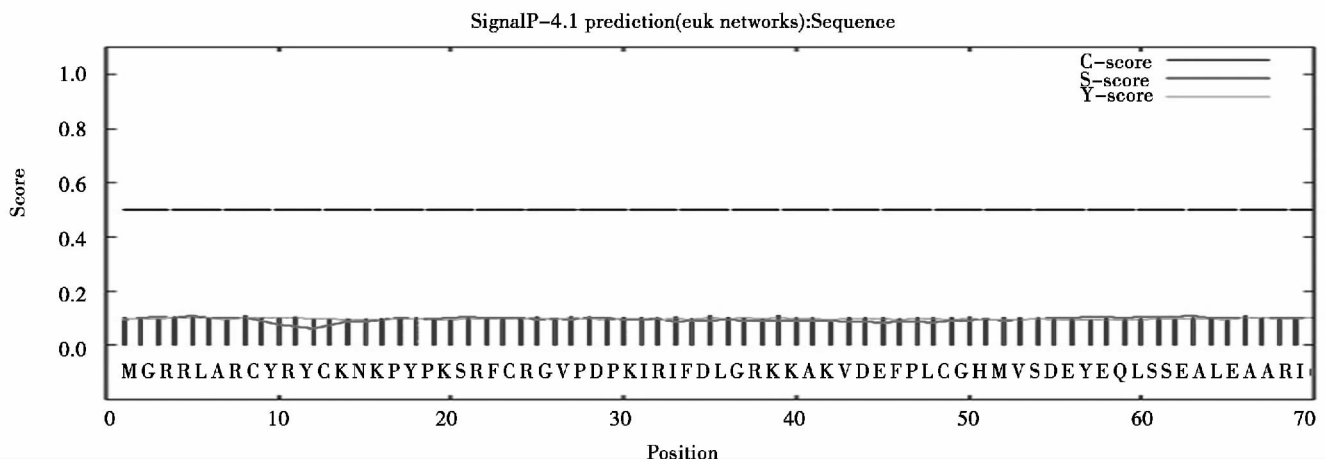


图2 PcQM 蛋白的信号肽预测结果

Figure 2 Prediction of the signal peptide of PcQM protein

2.2 PcQM 蛋白保守区域分析

通过 NCBI 网站 Blast P( <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ) 程序分析 ,发现 PcQM 蛋白属于 Ribosomal\_L16\_L10e 超家族 ,其中 41 - 165 AA 为该蛋白质主要的特征结构所在 ,如图 3 所示。

2.3 PcQM 蛋白二级结构预测

通过 PredictProtein 网站 ,分别预测了 PcQM 蛋白的二硫键和二级结构。结果发现 ,PcQM 蛋白虽然存在 9 个 Cys ,但都是

以还原态形式存在 ,而不存在二硫键结构 ,如图 4 所示。PcQM 蛋白二级结构的预测结果表明 ,该蛋白含有 26.05%  $\alpha$  - 螺旋结构( H) ,20.93%  $\beta$  - 折叠结构( E) ,53.02% 无规则卷曲( L) ,如图 5 所示。

2.4 PcQM 蛋白三维空间结构预测

通过 Swiss - Model 程序 ,对 PcQM 蛋白三维空间结构进行了预测 ,如图 6 所示。模板蛋白为 2zkr.1.9 ,PcQM 蛋白的 AA 序列与模板的同源性为 91.12% ,没有配体( ligands) 。GMQE

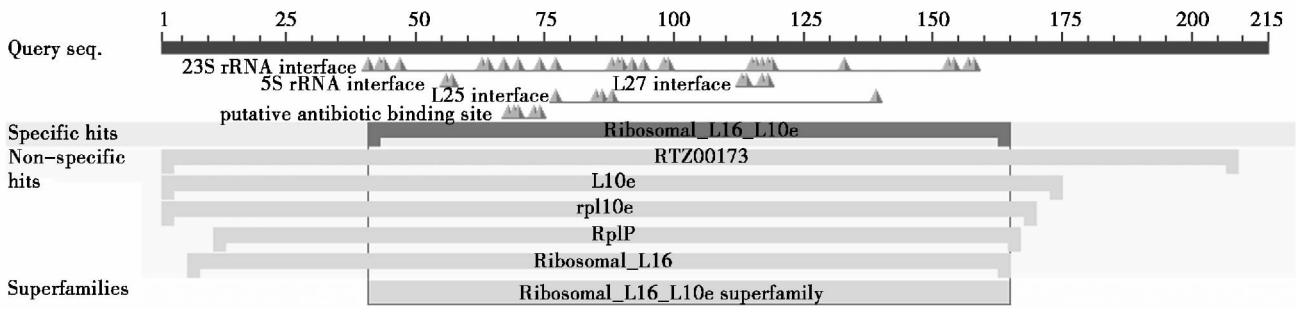


图3 PcQM蛋白的保守结构域

Figure 3 Conserved domains of PcQM protein

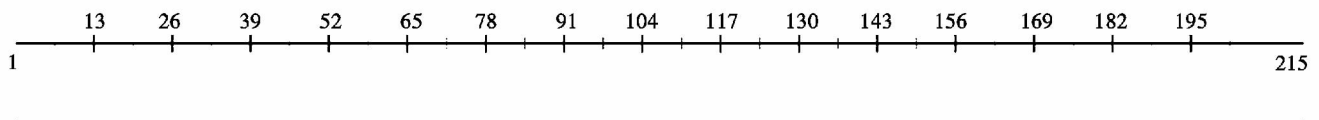


图4 二硫键结构预测

Figure 4 Prediction of the disulphide bridges

(Global Model Quality Estimation) 值为 0.72, QMEAN4 server 值为 -1.76。

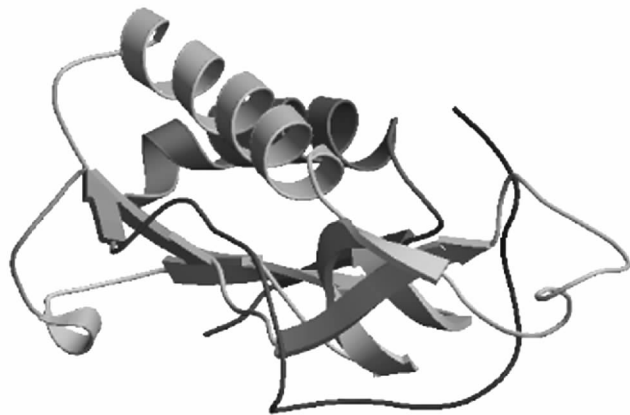


图6 PcQM蛋白三维结构的预测

Figure 6 Prediction of the tertiary structure of PcQM protein

### 3 讨论

QM-like 蛋白是一种重要的核糖体大亚基蛋白 L10, 在细胞的生长、发育及凋亡等过程中均具有重要作用。迄今为止, QM-like 蛋白功能研究主要集中于基因水平及体外表达研究等<sup>[8-11]</sup>, 而蛋白质高级结构报道较少。

随着生物信息学迅猛发展, 其对于蛋白质结构和功能预测研究领域日益重要。自从 2009 年以来, PredictProtein 程序每年点击率高达 1 000 000 次, 服务对象遍布 139 个国家<sup>[13]</sup>。Swiss-Model 程序同样已成为预测蛋白质三级结构的主要工具<sup>[14]</sup>。生物信息学分析, 不仅辅助了蛋白质基本性质的测定, 而且预测了蛋白一些高级结构, 为蛋白质功能深入研究提供了良好的理论依据<sup>[15]</sup>。

已有研究发现, 攻毒后大黄鱼和草鱼体内 QM-like 蛋白的 mRNA 表达量均发生变化, 这暗示着 QM-like 蛋白在鱼类免疫反应过程中起着重要的调节作用<sup>[9-10]</sup>。本研究通过生物信息学相关软件及网站, 分析可知 PcQM 蛋白为亲水性蛋白,

具有多个酶切位点和一个核糖体大亚基蛋白 L10 特征性结构。该结果与草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) QM-like 蛋白理化性质相似。

Mitsuhiro Nishimura 等<sup>[16]</sup>利用 X-射线晶体衍射法得到人类 L10 蛋白, 同时利用 SWISS-MODEL 等软件预测该蛋白结构, 人类 QM-like 蛋白与模型的相似程度达到 99.40%, E 值为 4.56e-90。结果发现 QM 蛋白的二级结构骨架与预测结果完全一致。本研究 PcQM 蛋白 AA 序列与模板的同源性为 91.12%。根据与模板序列相似度越高, 预测结构越准确原则, 及 GMQE 和 QMEAN4 server 值, 结果表明 PcQM 蛋白三维空间结构的预测结构具有较高可靠性<sup>[17-18]</sup>。本研究结果 PcQM 蛋白与美国红鱼 SoQM 相比, 两者间三级结构表示方法和所建模型的评估方式都有所不同, 但两者螺旋结构 (H) 折叠结构 (E) 和无规则卷含量基本相似<sup>[12]</sup>, 这主要是由 QM-like 蛋白的保守性所决定。本研究局限于软件的预测, 后续工作需通过核磁共振等实验方法, 对预测的 PcQM 蛋白高级结构进行验证, 以深入研究 PcQM 蛋白的生物学功能。

### 4 结论

本文较全面地分析和预测了 PcQM 蛋白的理化性质、保守结构域、二级结构和三级结构等。为深入分析 PcQM 在大黄鱼体内免疫调节功能研究, 奠定了理论依据。

### 参考文献

- [1] 翁丽萍. 养殖大黄鱼和野生大黄鱼风味的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012.
- [2] 叶金清. 官井洋大黄鱼的资源和生物学特征[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- [3] 徐晓津, 徐斌, 王军, 等. 大黄鱼感染哈维氏弧菌后血液生化指标的变化及组织病理学观察[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 618-625.
- [4] 倪海儿, 王国良. 网箱养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 疾病与环境因子的关系[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 72-77.
- [5] Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients [J]. *American Journal of Human Genetics*,

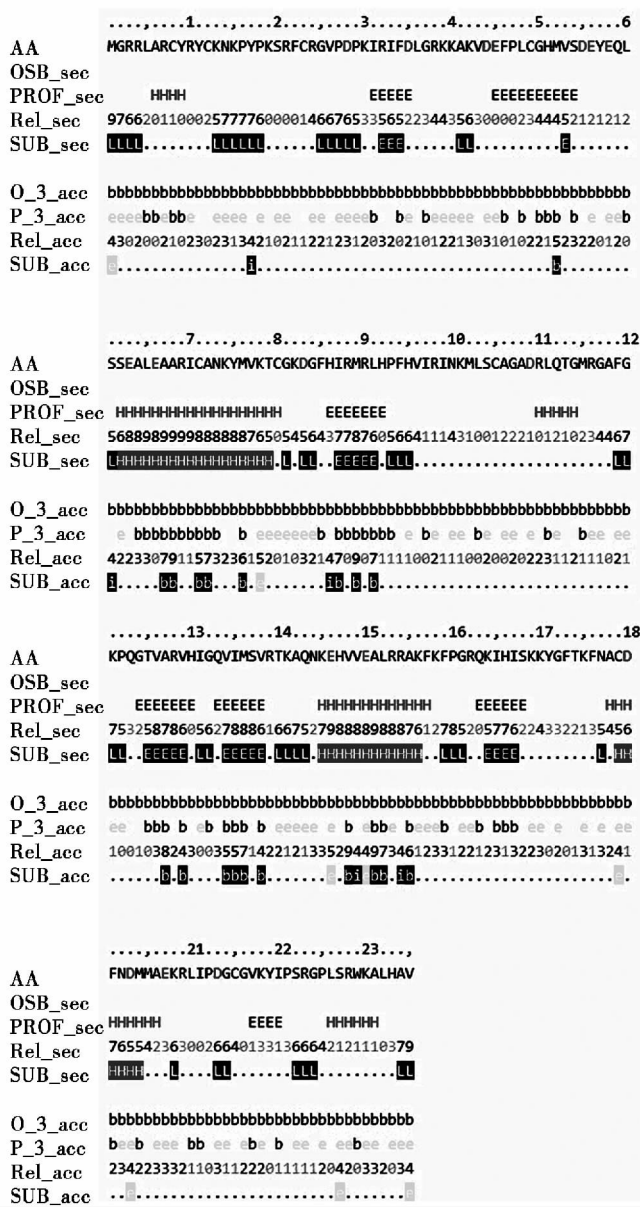


图 5 PcQM 蛋白二级结构预测

Figure 5 Prediction of the secondary structure of PcQM protein 2008 33(6) : 769 – 780.

[6]Falcone Ferreyra ML ,Casadevall R ,Luciani MD ,et al. New evidence for differential roles of H10 ribosomal proteins from Arabidopsis [J]. *Plant*

*Physiology* 2013 ,163( 1) : 378 – 391.

[7]Bhardwaj PK ,Ahuja PS ,Kumar S. Characterization of gene expression of QM from *Caragana jubata* a plant species that grows under extreme cold [J]. *Molecular Biology Reports* 2010 37( 2) : 1003 – 1010.

[8]Zhou F ,Jiang S ,Huang J ,et al. Molecular analysis of the QM gene from *Penaeus monodon* and its expression on the different ovarian stages of development [J]. *Molecular Biology Reports* 2011 38( 3) : 1921 – 1927.

[9]Wen Y ,Shao JZ ,Pan X ,et al. Molecular cloning ,characterization and expression analysis of QM gene from grass carp ( *Ctenopharyngodon idellus*) homologous to Wilms’ tumor suppressor [J]. *Comparative biochemistry and physiology b – biochemistry & molecular biology* 2005 ,141( 3) : 356 – 365.

[10]Chen X ,Su YQ ,Wang J ,et al. Isolation and identification of the immune – relevant ribosomal protein L10 ( RPL10/QM – like gene) from the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* ( Pisces: Sciaenidae) [J]. *Genetics and Molecular Research* 2012 ,11 ( 4) : 3755 – 3765.

[11]Chiocchetti A ,Pakalapati G ,Duketis E ,et al. Mutation and expression analyses of the ribosomal protein gene RPL10 in an extended German sample of patients with autism spectrum disorder [J]. *American Journal of Medical Genetics part a* 2011 ,155A( 6) : 1472 – 1475.

[12]Chen X ,Wu CW ,Zhong SP ,et al. Molecular characterization and structure analysis of RPL10/QM – like protein from the red drum *Sciaenops ocellatus* ( Sciaenidae) . [J] *Genetics and Molecular Research* 2011 ,10 ( 2) : 576 – 587.

[13]Yachdav G ,Kloppmann E ,Kajan L ,et al. Predict protein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features [J]. *Nucleic Acids Research* 2014 ,12: W337 – W343.

[14]Biasini M ,Bienert S ,Waterhouse A ,et al. SWISS – MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. *Nucleic Acids Research* 2014 ,12: W252 – W258.

[15]鲁毅 李任峰 徐萍 等. 来航鸡 FOXL2 蛋白的生物信息学分析 [J]. *生物技术* 2012 22( 2) : 43 – 46.

[16]Nishimura M ,Kaminishi T ,Takemoto C ,et al. Crystal structure of human ribosomal protein L10 core domain reveals eukaryote – specific motifs in addition to the conserved fold [J]. *Journal of Molecular Biology* ,2008 , 377( 2) : 421 – 30.

[17]Benkert P ,Kunzli M ,and Schwede T. QMEAN server for protein model quality estimation [J]. *Nucleic Acids Research* 2009 37: W510 – W514.

[18]Benkert P ,Biasini M , and Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. *Bioinformatics* , 2011 27: 343 – 350.

## 黄花蒿 *rbcL* 基因电子克隆、生物信息学及适应性进化分析

熊勇<sup>1</sup>,赵春艳<sup>2</sup>,杨青松<sup>1</sup>,杨晓兰<sup>1</sup>

1. 云南民族大学民族药资源化学国家民委 – 教育部重点实验室,云南 昆明 650500; 2. 中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所,云南 昆明 650221

摘要: [目的]运用电子克隆的方法获得黄花蒿中 *rbcL* 基因,并对该基因进行生物信息学及适应性进化分析,获得氨基酸正选择位点及其空间结构特征。[方法]以短葶飞蓬 *rbcL* 基因为种子序列(探针,Genbank 登录号为: KF482865. 1) ,对黄花蒿的 EST 数据库进行搜索,应用相关的生物软件进行拼接、组装,利用 PAML 程序检测其 *rbcL* 基因的适应性进化。[结果]获得一个 *rbcL* 基因的 cDNA 序列重叠群,该重叠群长为 1 832bp,包含一个完整的长为 1 461bp 的开放阅读框,共编码 486 个氨基酸,且与菊科的其他植物的 *rbcL* 基因具有较高的同源性,适应性进化分析在 *rbcL* 蛋白上有两个氨基酸正选择位点( 249S 和 449T )。[结论]电子克隆获得的 cDNA 序列为完整的黄花蒿 *rbcL* 基因全长 cDNA,黄花蒿对生境的适应可能与 *rbcL* 蛋白大亚基正选择位点空间结构有关。