

用同源模建方法预测蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白的三维结构

孙浩¹, 赵雷修¹, 周凡蕊¹, 高慧^{2*}

(1. 西南林业大学理学院, 云南昆明 650224; 2. 云南中医学院, 云南昆明 650500)

摘要 [目的] 预测蔷薇科斜条卷叶蛾 (*Choristoneura rosaceana*) 信息素结合蛋白的三维结构。[方法] 用同源模建的方法构建蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白的三维结构, 并分别用 Procheck、Verify_3D、Errat、ProSa2003 等程序对模建结构的可靠性进行评价。[结果] 模建结构显示蔷薇科斜条卷叶蛾的信息素结合蛋白由 6 个 α -螺旋和连接这些螺旋的回折构成, 底物结合口袋成锥形的特征, 6 个保守的半胱氨酸形成 3 个对结构起稳定作用的二硫键。[结论] 预测结构可靠, 为蔷薇科斜条卷叶蛾的研究及虫害的防治奠定了理论基础。

关键词 同源模建; 蔷薇科斜条卷叶蛾; 信息素结合蛋白

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)14-06127-03

Homology Modeling of Pheromone Binding Protein of *Choristoneura rosaceana*

SUN Hao et al (Faculty of Science, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] The research aimed to predict the three dimension structure of pheromone binding protein *Choristoneura rosaceana*. [Method] The three dimension structure of pheromone binding protein of *Choristoneura rosaceana* was modeled by homology modeling method. The different evaluation of the model by Procheck, Verify_3D, Errat and ProSa2003 respectively indicates that the model is reliable. [Result] The pheromone binding protein of *Choristoneura rosaceana* consists of 6 α -helices and loops between them. 6 conserved cysteines form 3 disulfide bonds which can stabilize the structure. [Conclusion] This study can provide a foundation for the research and pest control of *Choristoneura rosaceana*.

Key words Homology modeling; *Choristoneura rosaceana*; Pheromone binding protein

气味结合蛋白 (Odorant Binding Proteins, OBPs) 是在昆虫体内发现的一类嗅觉蛋白。它们是细胞外较小的可溶性蛋白, 位于感觉树突周围的液体中。通常认为它可捕捉气味和信息素分子, 并将它们转运到嗅觉受体上^[1]。昆虫对信息素和其他气味的感知是一系列复杂过程的结果, 近年来的许多研究对这些过程进行了大量阐述。脊椎动物和非脊椎动物都通过它们的嗅觉系统来探测气味, 动物的化学感觉对于其觅食、交配、躲避有毒物质和恶劣环境来说是必要的^[2]。对于陆生动物, 大多数气味都是空气中的疏水小分子, 它们必须穿过亲水介质 (脊椎动物的粘液、昆虫的感受器淋巴液) 才能到达嗅觉受体 (olfactory receptors, ORs)^[3-4]。这个克服亲水介质能垒的过程通常需借助气味结合蛋白来完成^[5]。气味分子的转运是陆生动物独有的, 就这一点而言, 气味结合蛋白从很大程度上体现了陆生动物嗅觉系统的适应性进化^[6]。

昆虫中 OBPs 可分成 3 种类型^[7-8], 分别是: 信息素结合蛋白 (pheromone-binding proteins, PBPs)、一般气味结合蛋白 (general odorant-binding proteins, GOBPs) 和触角特异性蛋白 (antennal specific proteins, ASPs) [也称为触角结合蛋白 x (antennal-binding proteinx, ABPx)]。昆虫触角上的感器淋巴液 (sensillum lymph) 中含大量的 OBPs (浓度高达 10 mmol/L)^[9-11]。

蔷薇科斜条卷叶蛾 (*Choristoneura rosaceana*) 属色卷蛾属 (*Choristoneura*), 是我国进出口贸易中需检测的有害生物之一。该虫主要分布于加拿大德纽芬兰和新斯科舍至范库弗峰岛, 在美国除西南部干旱地区外广泛分布, 在我国无分布。

幼虫取食多种野生植物的叶和果实, 主要寄主为木本植物, 包括许多果树、灌木和松, 特别偏爱蔷薇科种类。蔷薇科斜条卷叶蛾在美国已产生抗药性, 造成的损失逐年增加, 是一种对我国农林业具有严重威胁的害虫。

三维结构在研究 OBPs 的功能方面起着至关重要的作用。因为在其他一些试验中得出的看似正确的结论, 后来却被晶体结构试验证明是错误的^[12], 所以只有掌握 OBPs 的三维结构才可更加清楚明确的解释或推测 OBPs 的功能。目前在 NCBI 数据库中的 PBPs 序列已超过 2 000 条, 而 PDB 数据库中 OBPs 的晶体结构只有几十个, 这对 OBPs 的研究无疑是一种障碍。不过随着同源模建方法的提出, 这一问题在一定程度上被解决了。同源模建可比较准确的预测一个蛋白质的三维结构, 在序列一致性较高的情况下更是如此。笔者在文中即是通过同源模建方法, 预测并分析蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白的三维结构, 从而为 OBPs 的功能研究及蔷薇科斜条卷叶蛾的防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 模版的选择 根据蔷薇科斜条卷叶蛾 OBP 的一级序列 (GI:6272640), 用 BLAST 程序在 PDB 数据库中进行搜索, 寻找与其序列一致性较高的 X 射线衍射晶体结构。最终找到一系列 Evalue 值最趋近于 0, 且序列一致性较高的晶体结构。从中选出分辨率较高的 3 个晶体作为模版分子, 分别为: 2P71 (分辨率为 2.0, Evalue 值为 $3e-46$, A 链一致性为 62.12%)、1DQE (分辨率为 1.8, Evalue 值为 $6e-48$, B 链一致性为 62.04%) 和 2P70 (分辨率为 2.1, Evalue 值为 $3e-46$, A 链一致性为 62.12%)。这 3 个晶体均为家蚕的信息素结合蛋白晶体。

1.2 结构的模建 用 Modeller 程序将蔷薇科斜条卷叶蛾的一级序列与模版分子的序列进行比对 (图 1), 然后根据比对结果进行同源模建, 生成 1 000 个可能的结构。在这些结构

基金项目 西南林业大学重点科研基金项目 (110932)。

作者简介 孙浩 (1980-), 男, 河北沧州人, 讲师, 博士, 从事蛋白质的模拟计算研究, E-mail: sunhao@swfu.edu.cn。* 通讯作者, E-mail: gaohui_em@126.com。

收稿日期 2013-05-03

中选取最优的一个进行回折(loop)区域的优化,生成500个优化结构,从中选取最优的一个结构,用Chimera软件对该结构分配电荷,然后用最速下降法进行2000步能量最小化,最后再用共轭梯度法进行2000步能量最小化。通过对模型的评价发现,没有进行优化的最优结构比进行了一系列优化的结构更具合理性,这可能是loop区域构象的多变性造成的,

因此,文中直接采用未经优化的结构进行研究。

目标结构的序列比模版结构的序列长,长出的部分是结构C-端和N-端的loop区,长出的部分由于没有模版,所以它们的构象是随机产生的,其意义不大。为便于研究,将目标结构两端多出的残基删去,仅保留中间的24~155号残基。

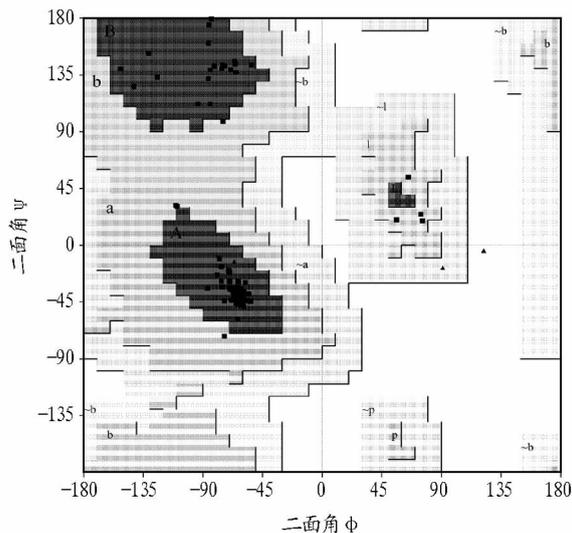
_aln. pos	10	20	30	40	50	60	
2P71A	-----	-----	SQEV	MKNLSL	NFGKAL	DECKKEM	
1DQEB	-----	-----	SQEV	MKNLSL	NFGKAL	DECKKEM	
2P70A	-----	-----	SQEV	MKNLSL	NFGKAL	DECKKEM	
GI6272640	MLQQK	ELLLFA	VVCLSL	TQMVEP	SADVVK	GMTLNF	
_consvrd				*	*	*	
_helix				9999999999999999	9999999999999999	9999999999999999	
_aln. pos	70	80	90	100	110	120	130
2P71A	NRETG	CAIMCL	STKLN	NMLDPE	GNLHHG	NAMEFA	KKHGADE
1DQEB	NRETG	CAIMCL	STKLN	NMLDPE	GNLHHG	NAMEFA	KKHGADE
2P70A	NRETG	CAIMCL	STKLN	NMLDPE	GNLHHG	NAMEFA	KKHGADE
GI6272640	NRDTG	CAIMCL	SCKLE	LVS-DG	KLHHG	NTLEYA	KQHGA
_consvrd	**	*	*	*	*	*	*
_helix	9999999999999999	9999999999999999	9999999999999999	9999999999999999	9999999999999999	9999999999999999	9999999999999999
_aln. pos	140	150	160				
2P71A	LGVAT	CFKAE	IHKLN				
1DQEB	LGVAT	CFKAE	IHKLN				
2P70A	LGVAT	CFKAE	IHKLN				
GI6272640	LEWAK	CFKIE	IHKLN				
_consvrd	*	*	*				
_helix	9999999999999999	9999999999999999	9999999999999999				

注:_aln. pos 表示氨基酸残基的序号;2P71A 表示 2P71 的 A 链,1DQEB 表示 1DQE 的 B 链,2P70A 表示 2P70 的 A 链;_consvrd 表示保守的残基,用“*”标注;_helix 表示 α -螺旋的位置和含量,用数字 1~9 表示,数字越大表示该位置 α -螺旋的平均含量越高。

图1 GI:6272642 与 2P71、1DQE、2P70 的序列比对

2 结果与分析

为确定模建结构的合理性,文中使用 UCLA 网站上的 Procheck、Verify3D 和 ERRAT 3 个程序及 ProSa2003 对模建结构进行评价。



注:A、B、L 3 个区域为合理区域;a、b、l、p 4 个区域为较合理区;~a、~b、~l、~p 为大体可以接受的区域;其余区域为不合理区域。

图2 模建结构的 Ramachandran 分析

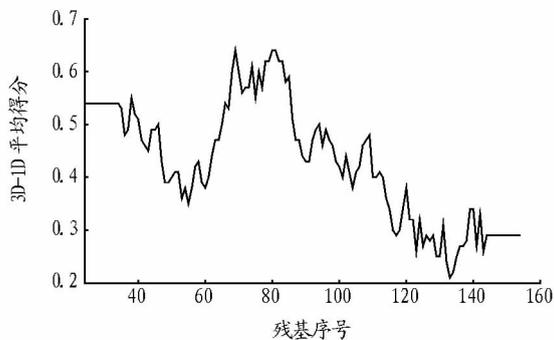


图3 Verify3D 打分

2.1 结构评价

2.1.1 Procheck 评价结果。Procheck 程序主要用于评价模型中残基与残基之间的立体化学性质,用 Ramachandran 图(拉氏构象图,图 2)表示。在 Ramachandran 图中,A、B、L 3 个区域为合理区域;a、b、l、p 4 个区域为较合理区;~a、~b、~l、~p 为大体可接受的区域;其余区域为不合理区域。

甘氨酸和脯氨酸在 Ramachandran 图中的允许存在范围较大,因此非甘氨酸、非脯氨酸残基处于合理范围内的比例成为判断结构合理性的主要依据。目标结构中共含 119 个非甘氨酸、非脯氨酸残基,其中 112 个处于合理区域内,约占总数的 94.1%;6 个处于比较合理的区域内,约占总数的

5.0% ; 1 个处于大体可以接受的范围内, 约占总数的 0.8% ; 没有非甘氨酸、非脯氨酸残基处于不合理的区域内。由此可看出, 目标结构总体上是合理的。

2.1.2 Verify3D 评价结果。Verify3D 用于分析三维结构(3D)与一级序列(1D)的兼容性。一个残基 3D-1D 的平均得分大于 0.2 时为合理。由图 3 可看出, 目标结构所有残基 3D-1D 的平均得分都大于 0.2, 所以目标结构所有残基都是合理的。

2.1.3 ERRAT 评价结果。ERRAT 通过统计目标结构中不同原子间非键相互作用, 并与高分辨率晶体结构的数据相比, 若其误差值在置信区间内的区域则被认为是合理的区域, 合理区域所占的百分比越高说明结构质量越高。对于那些高分辨率晶体结构, 这个百分比的平均值可达 95%。图 4 中显示文中目标结构的百分比为 100%, 说明目标结构的可靠性很高。

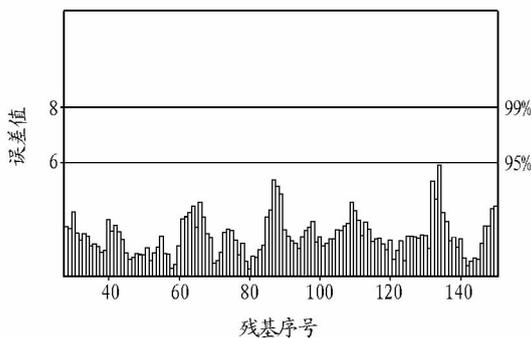


图 4 ERRAT 计算的建模结构残基误差值

2.1.4 ProSa2003 评价结果。ProSa2003 通过计算结构的能量和相应的标准分数 (z -score) 来判断其合理性。从计算得到的能量曲线(图 5)上看, 建模结构各残基的能量均为负值, 说明建模结构在能量方面是合理的。2P71、1DQE、2P70 和建模结构的 z -score 分别为 -10.17、-9.77、-9.82 和 -10.00。建模结构的 z -score 与模板结构的相近, 这同样说明了建模结构的合理性。建模结构的 z -score 小于模板结构的 z -score, 表明建模结构比模板结构更加稳定。

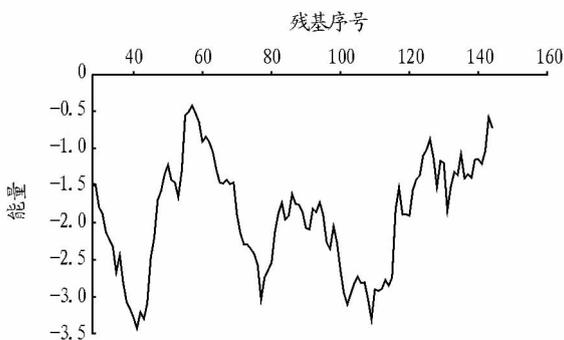
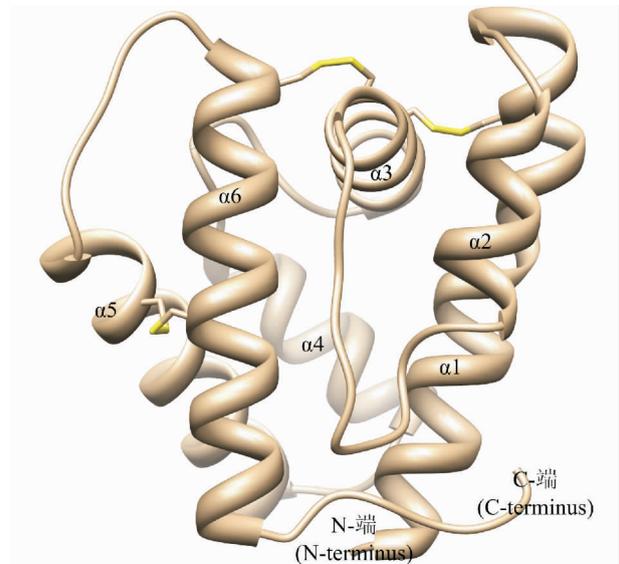


图 5 ProSa2003 计算的建模结构各残基的能量

2.2 结构分析 图 6 是同源建模所得到的结构, 从图中可看出, 蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白由 6 个 α -螺旋和连接这些螺旋的回折构成, 其中 5 个 α -螺旋 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$) 构成了锥形的疏水结合口袋的侧壁, 螺旋 $\alpha 3$ 处于锥形口

袋的开口的顶部。螺旋 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 间、 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 间及 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 间回折形成的边缘也位于锥形口袋开口的顶部。锥形口袋的窄端是由螺旋 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 之间的回折及螺旋 $\alpha 6$ 末端和 C-端的回折共同构成的。6 个保守半胱氨酸上硫原子之间的距离为 0.2 nm, 处在二硫键键长的范围内, 说明这 6 个半胱氨酸可以形成 3 个二硫键, 从而对结构起到稳定的作用。



注: 二级结构用条带状模型表示, 3 个二硫键用棍状模型表示。

图 6 蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白同源建模结构

3 结论与讨论

文中用同源建模方法构建了蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白的三维结构。从对结构的评价结果来看, 该结构具有很高的可靠性, 在没有晶体结构的情况下, 可代替晶体结构对蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白的性质进行分析, 也可作为分子对接和动力学模拟的基础。从结构上来看, 蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白的主要结构是 6 个 α -螺旋, 其中 5 个构成锥形的疏水口袋, 可结合信息素分子。6 个保守的半胱氨酸可形成 3 个二硫键, 从而对结构起到稳定的作用。这些信息为蔷薇科斜条卷叶蛾信息素结合蛋白的深入研究奠定了基础, 为相关农药的研究提供了有意义的借鉴, 最终为农林虫害的防治提供帮助。

参考文献

- [1] PELOSI P, MAIDA R. Odorant binding proteins in vertebrates and insects: Similarities and possible common function [J]. Chem Senses, 1990, 15: 205-215.
- [2] LI S, PICIMBON JEAN-FRANCOIS, JI S D, et al. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 372: 464-468.
- [3] JIANG Q Y, WANG W X, ZHANG Z D, et al. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39: 440-447.
- [4] LAGARDE AMANDINE, SPINELLI SILVIA, TEGONI MARIELLA, et al. The Crystal structure of odorant binding protein 7 from *Anopheles gambiae* exhibits an outstanding adaptability of its binding site [J]. J Mol Biol, 2011, 414: 401-412.
- [5] ZHANG T T, WANG W X, GU S H, et al. Structure, binding characteristics, and 3D model prediction of a newly identified odorant-binding protein from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(3): 430-438.

3 结论与讨论

D-GalN 作为肝细胞内尿苷二磷酸葡萄糖的干扰剂,是实验性肝损伤模型的常用诱导剂^[8]。Keppler 等通过注射氨基半乳糖建立大鼠肝损伤模型,该模型描述的实验性肝炎形态学特征与急性病毒性肝炎非常相似,如气球样变性、嗜酸性变性和坏死等^[9]。此后 D-GalN 被广泛用于建立急性肝炎和肝功能衰竭疾病模型,以进行药效评价^[10-12]。

启动凋亡的通路目前比较清楚的主要有 2 条:死亡受体介导和线粒体损伤介导。线粒体途径作为最重要的凋亡途径之一,主要由死亡受体非依赖的凋亡诱导信息启动,其可能机制是:当线粒体跨膜电位在各凋亡诱导因素作用下降低时,线粒体内、外膜之间的通透性转换孔(PTP)由关闭转换为开放,导致线粒体膜通透性增大,使细胞凋亡启动因子如 Cyt C、凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)和 AIF 等释放出来。其中 PTP 开放使 Cyt C 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤。Cyt C 与 Apaf-1 相互作用,激活 Caspases-9,触发 Caspases 级联反应,引起细胞凋亡。细胞凋亡时可出现内源性核酸内切酶激活、Caspases 激活及 DNA 片段化断裂等生化变化,其中 DNA 电泳呈特征性的片段化条带(DNA ladder)是细胞凋亡的主要特征和判断细胞凋亡的客观指标之一。AST 和 ALT 的活性高低能反映细胞膜结构完整性,肝细胞内自由基清除剂和抗氧化酶(如 GSH、SOD 等)的活性能反映肝脏抗氧化应激的水平,MDA 作为脂质过氧化反应的终产物,可反映组织由于自由基产生所导致的细胞膜损伤程度。

本研究选择 D-GalN 作为细胞凋亡诱导剂,通过对用不同浓度 D-GalN 处理 HL-7702 细胞不同时间后 ALT、AST、MDA、SOD、Caspase-3 水平和 DNA 电泳的综合分析,发现:HL-7702 细胞经 60 mmol/L D-GalN 处理 8 h 后,大部分细胞产生了明显的凋亡。同时,肝细胞由于 D-GalN 处理造成氧化性损伤,其细胞膜的完整性遭到了破坏,表明线粒体介导的凋亡信号转导途径可能参与了细胞凋亡的发生。

氧化苦参碱(Oxymatrine)是从中药苦豆子或苦参根中提取的一种生物碱,常被用于治疗各型肝炎,具有较好的治疗效果^[13-15]。该研究表明氧化苦参碱对肝细胞凋亡具有较强的抑制作用,其抗凋亡机制可能与抑制 Caspases-3、CytC、TNF- α 和 TGF- β 1 等凋亡因子和诱导抗凋亡因子 HO-1 表达有关。

参考文献

- [1] LOCKSHIN R A,ZAKERI Z F. Programed Cell Death:New Thoughts and Relevance to Aging [J]. J Gerontol,1990,45(5):135-140.
- [2] 吕鹏,罗和生,余保平. 细胞凋亡与肝脏疾病[J]. 世界华人消化杂志,2000,8(10):1157-1159.
- [3] 刘红云,覃彩芹,张静,等. 急性酒精性肝损伤与肝细胞凋亡关系的研究[J]. 江苏医药,2011(5):582-583.
- [4] 叶一农,高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击[J]. 传染病信息,2009,22(5):276-279.
- [5] 徐建玉,李昌平,陈枫,等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4B 对肝细胞凋亡的影响[J]. 华西医学,2009,24(5):1165-1167.
- [6] 赵国雄,刘丽娟,龚虹云,等. 乙型肝炎病毒诱导肝细胞癌发病机制的研究进展[J]. 中国药事,2009(10):1015-1020.
- [7] 冯春琼,马文丽,宋艳斌,等. 细胞凋亡的 MTT 染色法检测[J]. 第一军医大学学报,2002,22(3):262-266.
- [8] 李宏涛,陈国民. D-氨基半乳糖研究的回顾和展望[J]. 肝脏,2004,9(3):209-210.
- [9] KEPPLER D,LESCH R,REUTTER W, et al. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine [J]. Exp Mol Pathol,1968,9(2):279-290.
- [10] LEBDA F M,AHMED M A,ABD EL SAMAD A A, et al. Shawayk Protective Effect of Thymoquinone against D-Galactosamine - Induced Liver Injury in Rats [J]. Aust J Basic Appl Sci,2011,5(2):49-58.
- [11] 周明明,田莉,陈妍,等. 维药芹菜根醇提物对 D-氨基半乳糖所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(12):834-836,872.
- [12] 陈海鸡,谢玉桃,傅爱. 罗格列酮对 D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠急性肝衰竭的保护作用[J]. 肝脏,2009(6):458-461.
- [13] DING C B,ZHANG J P,ZHAO Y, et al. Zebrafish as a Potential Model Organism for Drug Test Against Hepatitis C Virus [J]. PLoS One,2011,6(8):22921.
- [14] WANG Y P,ZHAO W,XUE R, et al. Oxymatrine inhibits hepatitis B infection with an advantage of overcoming drug - resistance [J]. Antiviral Res,2011,89(3):227-231.
- [15] 梁建新,屈杏芬,曾文铤,等. 氧化苦参碱在治疗慢性乙型肝炎中抗肝纤维化的作用机制[J]. 南方医科大学学报,2011(8):1871-1873.

(上接第 6129 页)

- [6] VOGT R G,RYBCZYNSKI R,LERNER M R. Molecular cloning and sequencing of general odorant - binding proteins GOBPI and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*:Comparisons with other insect OBPs and their signal peptides[J]. J Neurosci,1991,11:2972-2984.
- [7] ZHOU J J,ROBERTSON GILES,HE X L, et al. Characterisation of *bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant - binding protein discriminates between sex pheromone components [J]. J Mol Biol,2009,389:529-545.
- [8] SPINELLI SILVIA,LAGARDE AMANDINE,IOVINELLA IMMACOLATA, et al. Crystal structure of *Apis mellifera* OBPI4, a C - minus odorant - binding protein, and its complexes with odorant molecules [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2012,42:41-50.

- [9] KLEIN U. Sensillum - lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antheraea polyphemus* (Saturniidae) [J]. J Insect Biochem,1987,17:1193-1204.
- [10] VOGT R G,RIDDIFORD L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae [J]. Nature,1981,293:161-163.
- [11] VOGT R G,KOEHN A C,DUBNAU J T, et al. Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the gypsy moth *Lymantria dispar* [J]. J Neurosci,1989,9:3332-3346.
- [12] MOHANTY S,ZUBKOV S,GRONENBORN A M. The solution NMR structure of *Antheraea polyphemus* PBP provides new insight into pheromone recognition by pheromone - binding proteins [J]. J Mol Biol,2004,337:443-451.