

云南切梢小蠹气味结合蛋白的同源建模*

汪 宇^{1**} 孙 浩² 朱家颖¹ 赵 宁¹ 杨 斌^{1***}

(1. 西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224; 2. 西南林业大学理学院, 昆明 650224)

摘 要 【目的】为了研究云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* 气味结合蛋白 (Odorant binding proteins, OBPs) 参与其嗅觉识别过程的机理奠定基础, 本文对云南切梢小蠹 OBP 进行了同源建模及评价分析。

【方法】采用同源建模方法构建了云南切梢小蠹 OBP 的三维结构, 并利用 Procheck、Verify_3D 和 ERRAT 等方法评估了构建模型的可靠性。【结果】对优化后的建模蛋白的结果分析发现, 序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点, 具有气味结合蛋白的典型特征, 并且 Procheck、Verify_3D 和 ERRAT 对模型的评价分数较高, 结构具有很高的可能性。【结论】基于已知的同源蛋白结构信息和建模蛋白的一级序列信息, 预测序列已知但结构未知的蛋白空间结构, 为今后研究该云南切梢小蠹气味结合蛋白的功能结构域奠定基础。

关键词 气味结合蛋白, 同源建模, 三维结构, 云南切梢小蠹

Homology modeling of the odorant binding protein of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis*

WANG Yu^{1**} SUN Hao² ZHU Jia-Ying¹ ZHAO Ning¹ YANG Bin^{1***}

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. College of Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract [Objectives] This study aims to provide the basis for revealing the mechanism of the odorant binding protein of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis* involved in olfactory reorganization [Methods] The three dimensional structure of *T. yunnanensis*'s OBP was constructed using the homology modeling method and the reliability of the model was evaluated by Procheck, Verify_3D and ERRATERRAT. [Results] Analysis of the optimized structure found that the OBP of *T. yunnanensis* contains 6 conservative cysteine residues in its sequence. Evaluation of the model by Procheck, Verify_3D and ERRATERRAT indicated that it is reasonable and reliable. [Conclusion] The results showed that it is possible to predict the structure of a protein that has a known sequence with unknown spatial structure based on known structural information of its homologous proteins. The results provide a foundation for further research on the functional structure domain of *T. yunnanensis* OBP.

Key words odorant binding protein, homology modeling, three-dimensional structure, *Tomicus yunnanensis*

在长期的进化过程中, 昆虫灵敏的嗅觉对于其适应环境和种群繁衍具有重要的生物意义。昆虫的嗅觉系统通过气味结合蛋白 (Odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 和嗅觉受体 (Olfactory receptors, ORs) 等来识别外界的特异性化学气味分子, 最终实现寻找食物、配偶和

产卵场所等行为 (Larsson *et al.*, 2004; Gotzek *et al.*, 2011)。昆虫头部前端的触角是其嗅觉系统的重要器官, 上面分布着数量和种类众多的感受器, 而感受器中则遍布着各种嗅觉相关功能蛋白。昆虫 OBP 是一类低分子量的水溶性酸性蛋白 (Vogt *et al.*, 1981; 王睿等, 1999), 主要存在于感觉树突周围的液体中, 而昆虫 OBP 与特

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31260179); 国家林业局林业公益行业科研专项 (201004067)

**第一作者 First author, E-mail: feihanhai@sina.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yangbin48053@163.com

收稿日期 Received: 2014-10-22, 接受日期 Accepted: 2015-03-18

异性化学气味物质发生的作用,是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步生化反应 (Vogt *et al.*, 1981),对昆虫与外界环境进行信息交流具有重要意义。根据氨基酸序列的同源性和可识别气味分子的不同,可将昆虫 OBP 分为 Classic、Minus-C、Plus-C、Dimer、PBP/GOBP、ABPI、ABPII、CRLBP 以及 D7 家族 (Daria *et al.*, 2002; Vieira and Rozas, 2011)。深入研究 OBP 识别气味物质的机理,不仅有助于揭示昆虫与环境的信息交流机制,而且对于以 OBP 为靶标来研发新的害虫防治途径具有重要意义。

三维结构在研究蛋白质的功能方面起着至关重要的作用,可以清楚明确地解释或推测蛋白质的功能,例如受体与配体相互作用的机制,生化反应过程以及其复合物结构的研究等都可以借助于受体的三维结构进行解释。对于受体结构未知的蛋白结构,同源模建法是最为成熟、最实用的搭建未知蛋白质骨架的结构预测方法(赵鑫等, 2011)。本文以云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* 为研究对象,对其 OBP 利用结构已知的同源蛋白质建立气味结合蛋白的结构模型,然后用理论计算方法进行优化,构建出一个合理的气味结合蛋白的三维空间结构,以为今后研究该蛋白与活性挥发物的对接及其嗅觉机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

云南切梢小蠹 OBP 基因序列为本实验室克隆获得,其他用于同源模建的 OBP 序列均下载于 PDB 数据库。

1.2 模板的选择

根据云南切梢小蠹 OBP 的一级序列,用 Blast 程序在 NCBI 数据库中进行搜索,寻找与其序列一致性较高的结构(同源性不得小于 30%)或者利用 Modeller 程序选取一系列 E-value 值最趋近于 0 且序列一致性较高的蛋白质结构,从中选取 3 个蛋白质结构作为模板分子,然后在

PDB 数据库中进行相应下载 (Tang *et al.*, 1996), PDB 数据库的编号分别为 3R7X (GI: 383280140, 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* OBP, 分辨率 1.1, E-value 值为 $5e-14$)、3B6X (GI: 167013403, 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* OBP, 分辨率 2.0, E-value 值为 $3e-10$) 和 1OOF (GI: 34810058, 黑腹果蝇 OBP, 分辨率 1.5, E-value 值为 $4e-10$)。

1.3 结构的同源模建与优化

运用 Modeller 程序将云南切梢小蠹 OBP 的一级序列与所各自选取的 3 个最佳模板分子的序列进行比对,然后根据比对结果进行同源模建,设置生成 1 000 个可能的结构。在这些结构中选取 Score 值为 1 或无限接近于 1 且 PODE Score 值最小的一个结构,用 Chimera 软件对该结构进行分配电荷 (Boeckler *et al.*, 2005),首先采用最速下降法 (Steepest descents) 进行 100~200 步能量最小化,再采用共轭梯度法 (Conjugate gradient) 进行 100~200 步能量最小化,来修正不利的非共价接触、肽键几何构型和能量最低状态等。

1.4 模型的合理性评估

采用 Procheck 对主链键长、键角及二面角的合理性、侧链的立体化学稳定性等特征进行评估来评价优化后模型的立体化学特性 (Laskowski *et al.*, 1993, 1996),采用 Verify_3D 分析三维结构模型与一级结构之间的关系,采用 ERRAT 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。

2 结果与分析

2.1 序列的比对

云南切梢小蠹 OBP 和意大利蜜蜂 OBP (3R72)、黑腹果蝇 OBP (3B6X, 1OOF) 的序列对比结果表明,云南切梢小蠹 OBP 的序列 TyunOBP 与选定模板 3R72、3B6X、1OOF 的一致性 (Identity) 达到 30% 以上,符合同源模建的基本要求 (图 1)。

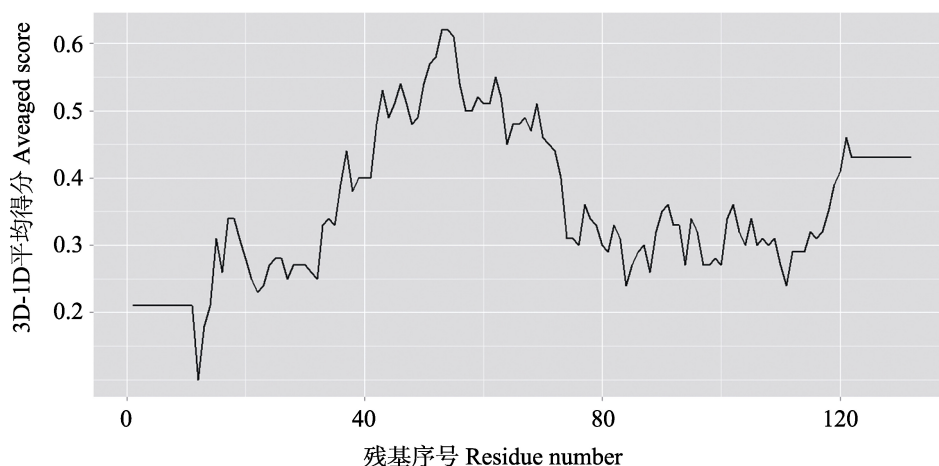


图3 云南切梢小蠹气味结合蛋白模建结构的 Verify_3D 打分结果

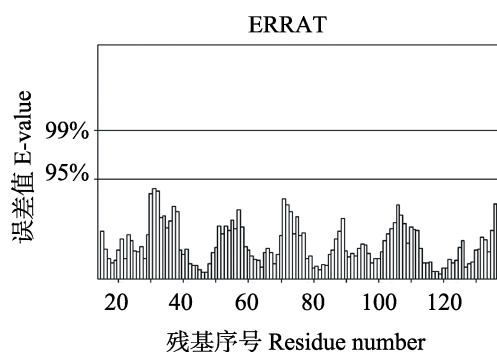
Fig. 3 Scoring of modeled *Tomicus yunnanensis* OBP structure by Verify_3D

图4 ERRAT 计算的云南切梢小蠹气味结合蛋白模建结构残基误差值

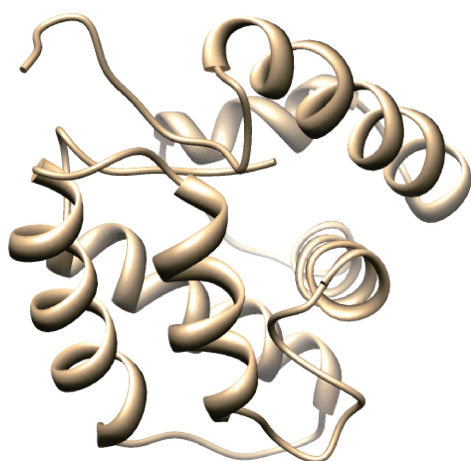
Fig. 4 Error value of ERRAT calculation of modeled *Tomicus yunnanensis* OBP structure

图5 云南切梢小蠹气味结合蛋白模建的三维结构

Fig. 5 Three dimensional structure of modeled *Tomicus yunnanensis* OBP

结构起支撑作用, 从而对结构起到稳定的作用。

3 讨论

蛋白质三维结构在很大的程度上决定了蛋白质的功能, 使人们能够利用已有的生物大分子靶标的知识, 以计算机为工具, 通过理论模拟来指导和辅助新型干扰剂分子的设计, 可以避免研发干扰剂的盲目性和缩短干扰剂开发的周期(贲亚琰等, 2010)。对云南切梢小蠹气味结合蛋白三维结构的充分了解是其中的关键。同源蛋白模型构建方法是基于知识的蛋白质三维结构预测的途径之一, 能够充分利用已知的同源蛋白结构信息和模建蛋白的一级序列信息, 预测序列已知但结构未知的蛋白空间结构, 其优点是预测准确, 精度高(彭晖等, 2001), 对以 OBP 为靶标来研发新的害虫防治途径具有重要意义。

本文以云南切梢小蠹 OBP 为模板, 采用同源模建的方法来构建其三维结构。通过对结构的评价结果分析发现, 序列中有 6 个保守的半胱氨酸交叉形成 3 个起支撑作用的二硫键(候廷军等, 2002; Pelosi *et al.*, 2006), 具有气味结合蛋白的典型特征与 Pelosi 等(2005) 报道的昆虫气味结合蛋白基本特征一致。且本实验中对模型评价的分数, Procheck 的分布值为 99.2% 均比孟戎茜等(2013) 报道的同源模建评价值 98.3% 和

99%要高,因此从整体上来说模型的立体化学结构是合理的(吕加国等,2006);孟戎茜等(2013)的研究表明,当 ERRAT-score>50%时,表明模型原子之间的非键相互作用和构象都是合理的,意味着属高质量的模型,其构建模型的 ERRAT 值为 81.912% 和 80.902%,而本实验中的 ERRAT-score 值为 100%,证明模型在构象上合理可靠;最后的 Verify_3D 检测模型氨基酸序列与其三维结构的兼容性,有 98.5%的残基得分大于 0.2,其评价分数高于赵勇山等(2009)研究中的建模结构评价,只有一个 Loop 区处于不合理范围之内,但它远离活性位点,对后续研究没有不良影响。通过这些评价指标对建模结构进行评价,结果表明构建的模型具有很高的可能性,与文献(陈玲等,2013;季萍等,2013)做比较,定性地证明了构建的云南切梢小蠹 OBP 模型的正确性和合理性。在没有晶体结构的情况下,可代替晶体结构对云南切梢小蠹气味结合蛋白的性质进行分析,也可以作为分子对接和动力学模拟的基础,深入了解云南切梢小蠹 OBP 的生物学功能、受体配体的相互作用机制,为设计与气味有关农药研究提供有意义的借鉴,最终为农林虫害的防治提供帮助。

参考文献 (References)

- Ben YL, Cui GZ, Zhang QY, Liu DL, 2010. The gene cloning and homology modeling of the *Streptococcus pneumoniae* HMGS. *Shandong Medical Journal*, 50(1): 82–83. [贲亚琰, 崔加贞, 张青叶, 刘德立, 2010. 肺炎链球菌 HMGS 基因克隆及同源建模. *山东医药*, 50(1): 82–83.]
- Boeckler F, Lanig H, Gmeiner P, 2005. Modeling the similarity and divergence of dopamine D2-like receptors and identification of validated ligand-receptor complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(3): 694–709.
- Chen L, Li HL, Zhou YX, Zhao L, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2013. cDNA cloning, tissue expression and ligand binding characteristics of odorant-binding protein 2 from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 612–621. [陈玲, 李红亮, 周宇翔, 赵磊, 张林雅, 倪翠侠, 商晗武, 2013. 桔小实蝇气味结合蛋白 BdorOBP2 的 cDNA 克隆、组织表达及配基结合特性. *昆虫学报*, 56(6): 612–621.]
- Daria SH, Charles RS, Aimee JM, Mark AT, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 12(9): 1357–1369.
- Gotzek D, Robertson HM, Wurm Y, Shoemaker D, 2011. Odorant binding proteins of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*: an example of the problems facing the analysis of widely divergent proteins. *PLoS ONE*, 6(1): 1–9.
- Hou TJ, An Y, Ru BG, Xu XJ, 2002. Theoretical studies on the crystal packing form of MT- from rat liver. *Chemical Research in Chinese Universities*, 23(2): 271–274. [侯廷军, 安钰, 茹炳根, 徐筱杰, 2002. 大鼠金属硫蛋白晶体堆积形式的理论研究. *高等学校化学学报*, 23(2): 271–274.]
- Ji P, Liu JT, Gu SH, Zhu XQ, Zhang YJ, Guo YY, 2013. Expression and binding specificity analysis of odorant binding protein AlucOBP7 from *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 575–583. [季萍, 刘靖涛, 谷少华, 朱晓强, 张永军, 郭予元, 2013. 绿盲椿象气味结合蛋白 AlucOBP7 的表达及气味结合特性. *昆虫学报*, 56(6): 575–583.]
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703–714.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM, 1993. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2): 283–291.
- Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM, 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 8(4): 477–486.
- Lv JG, Sheng CQ, Zhang M, Ji HT, Zhang WN, Zhou YJ, Zhu J, Jiang JK, 2006. Homology modeling of human acrosin and its molecular docking study with KF950. *Acta Chimica Sinica*, 64(10): 1073–1078. [吕加国, 盛春泉, 张珉, 季海涛, 张万年, 周有骏, 朱驹, 蒋俊航, 2006. 人顶体酶三维结构的同源建模及其与 KF950 的分子对接研究. *化学学报*, 64(10): 1073–1078.]

- Meng RQ, Li K, Huang WC, Li YN, 2013. Homology modeling of $\alpha 7$ -nAChR and $\alpha 9\alpha 10$ -nAChR. *Computers and Applied Chemistry*, 30(3): 261–266. [孟戎茜, 李奎, 黄文灿, 李艳妮, 2013. $\alpha 7$ -nAChR 和 $\alpha 9\alpha 10$ -nAChR 的同源模建. 计算机与应用化学, 30(3): 261–266.]
- Pelosi P, Calvello M, Ban L, 2005. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chemical Senses*, 30(1): 291–292.
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(4): 1658–1676.
- Peng H, Yang CZ, Fan DM, Zheng MJ, Lai ZZ, Xiong DS, Zhu ZP, 2001. Homology modeling of anti-CD20 chimeric fab' fragment. *High Technology Letters*, 11(12): 4–8. [彭晖, 杨纯正, 范冬梅, 郑梦杰, 赖增祖, 熊冬生, 朱祯平, 2001. 嵌合抗 CD20 抗体 Fab' 片段三维结果的同源模建. 高技术通讯, 11(12): 4–8.]
- Tang Y, Chen KX, Jiang HL, Jin GZ, Ji RY, 1996. Molecular modeling of interactions between tetrahydroprotoberberines and dopamine receptor. *Acta Pharmacologica Sinica*, 17(1): 8–12.
- Vieira FG, Rozas J, 2011. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the *Arthropoda*: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome Biology and Evolution*, 3(1): 476–490.
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161–163.
- Wang R, Zhang W, Tian Y, Zhang SG, 1999. The identification of the antennae odorants binding protein from the *Helicoverpa armigera*. *Entomological Knowledge*, 36(5): 297–298. [王睿, 张薇, 田雨, 张善干, 1999. 棉铃虫触角气味物质结合蛋白的鉴别. 昆虫知识, 36(5): 297–298.]
- Zhao X, Huang BY, Yuan M, Ji H, Zhu L, 2011. Homology modeling and docking research of human $\alpha 1A$ -adrenoceptors. *Journal of Molecular Science*, 27(6): 431–434. [赵鑫, 黄碧云, 袁牧, 季红, 朱柳, 2011. $\alpha 1A$ -肾上腺素受体的同源模建及其对接研究. 分子科学学报, 27(6): 431–434.]
- Zhao YS, Zheng QC, Zhang HX, Chu HY, Sun JZ, 2009. Homology modeling of human serine racemase and its molecular docking with peptide inhibitors. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 25(3): 417–422. [赵勇山, 郑清川, 张红星, 楚慧郢, 孙家钟, 2009. 人类丝氨酸消旋酶的同源模建及其与多肽类抑制剂的分子对接. 物理化学学报, 25(3): 417–422.]