

重大林业害虫的监测研究专栏

锈色棕榈象气味结合蛋白的同源建模*

阎伟^{1,2**} 骆有庆^{1***} 李朝绪² 刘丽² 覃伟权² 彭正强³

(1. 北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083; 2. 中国热带农业科学院椰子研究所, 文昌 571339; 3. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘要 【目的】锈色棕榈象 *Rhynchophorus ferrugineus* 为危害棕榈科植物的重要入侵害虫, 为获得该害虫气味结合蛋白 (Odorant binding protein, OBP) 的三维结构, 从而基于计算反向化学生态学方法筛选潜在对该害虫行为具有调控作用的挥发物用于防控奠定基础。【方法】以蛋白质数据库中已经报道的昆虫 OBP 晶体结构为模板, 采用同源建模方法构建获得了该害虫 2 个 OBP 的三维结构。模建结构通过 Procheck、Verify_3D 和 ERRAT 进行评价, 得到的评估分值均表明模建结构质量高。【结果】三维模建结构显示, 这 2 个锈色棕榈象 OBP 由 6 个 α -螺旋和连接这些螺旋的回折构成, 6 个半胱氨酸形成的 3 对二硫键起到了稳定结构的作用。【结论】模建结构的获得, 为今后通过分子对接筛选潜在的活性挥发物用于防控锈色棕榈象奠定了基础。

关键词 气味结合蛋白, 同源建模, 三维结构, 锈色棕榈象

Modeling the odorant binding protein of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*

YAN Wei^{1,2**} LUO You-Qing^{1***} LI Chao-Xu² LIU Li² QIN Wei-Quan² PENG Zheng-Qiang³

(1. The Key Laboratory of Beijing for Control to Forest Pest, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang 571339, China; 3. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract [Objectives] To obtain the three-dimensional structure of the odorant binding protein (OBP) of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, a notorious invasive pest, in order to develop potential volatile compounds to control this weevil based on the computational reverse chemical ecology approach. [Methods] Two, three dimensional structures of *R. ferrugineus* were homologically modeled based on crystal structures of OBPs from other insects that have been deposited in the Protein Data Bank (PDB). The modeled structures were evaluated by Procheck, VERIFY_3D and ERRAT and their evaluation scores indicate that model quality is high. [Results] The two, modeled, putative, three-dimensional, *R. ferrugineus* OBPs were composed of 6 α helixes and rebounds connecting the helixes. Three pairs of disulfide bonds formed by 6 cysteines were the key to their structural stability. [Conclusion] These modeled OBP structures lay a foundation for the future screening of potential active volatiles to control *R. ferrugineus* by molecular docking.

Key words odorant binding protein, homology modeling, three dimensional structure, *Rhynchophorus ferrugineus*

气味结合蛋白 (Odorant binding protein, OBP) 是一类小分子 (14~17 ku) 水溶性酸性蛋白 (pH 5.0 左右), 其通常由 135~220 个氨基酸组成, 不

同或同种昆虫间 OBP 的氨基酸序列相似性较低, 但均存在 6 个保守的半胱氨酸残基, 通过 3 个相互交联的二硫键连接在一起 (Pelosi *et al.*,

*资助项目 Supported projects: 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (1630152016004); 热科院创新团队项目 (1630152017010)

**第一作者 First author, E-mail: andy206@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: youqingluo@126.com

收稿日期 Received: 2017-09-28, 接受日期 Accepted: 2017-11-01

2014)。依据 OBP 的序列结构特征、功能和进化地位,OBP 基因家族可分为 PBP/GPBP(Pheromone binding protein/General odorant binding protein)、ABP(Antenna binding protein)、Classic、Minus-C、Plus-C、Dimer、CRLBP 和 D7 等亚家族(Vieira and Rozas, 2011)。其中,GOBP 又分为 GOBP 和 GOBP, ABP 又分为 ABP 和 ABP。一般,PBP 存在于专一性识别性信息素的感受器中,GOBP 存在于对普通气味分子发生反应的感受器中,而 ABP 则特异性的在触角中高表达(王桂荣等,2004;张治科等,2017)。在昆虫中,OBP 的主要功能通常认为是作为脂溶性气味分子的载体存在于多种化学感受器淋巴液中,起到运载气味分子通过化学感受器淋巴液,到达神经树突膜上的受体,从而使昆虫产生嗅觉反应(Zhu *et al.*, 2013;赵红霞等,2015; Brito *et al.*, 2016)。正因为 OBP 所具有的重要功能,其在昆虫与外界进行信息交流中起到重要作用,是昆虫选择寄主、觅食、寻找配偶等行为赖以发生的嗅觉相关蛋白。开展 OBP 基因的克隆鉴定、功能和空间结构及其与气味分子结合机理的研究有助于揭示昆虫对环境复杂化学信号的识别机制,从而为害虫防治提供新的思路和途径,而且可基于计算反向化学生态学(Computational reverse chemical ecology)筛选对害虫行为具有调控作用的活性挥发物用于害虫的绿色防控(Jayanthi *et al.*, 2014)。

锈色棕榈象 *Rhynchophorus ferrugineus* 作为我国重要的检疫性入侵害虫,自 1997 年在广东的中山市发现以来,已经在海南、广东、广西等长江以南广大地区分布,且有进一步随棕榈科观赏植物调运而扩散蔓延的趋势,其发生危害严重威胁和制约了我国棕榈(椰子、油棕、海枣等)产业的健康发展(阎伟等,2014)。由于该害虫环境适应能力强,危害隐蔽不容易被发现,危害寄主植物高大不利于防治操作,导致很难对其进行有效的防治(刘丽等,2011)。目前,虽然已经研发出了利用聚集信息素进行诱捕这种较为有效的绿色防治措施(阎伟等,2015),但是化学防治仍然是治理锈色棕榈象危害的应急防控

措施,且很难达到理想的防治效果(李朝绪等,2013;Yan *et al.*, 2015)。为此,急需寻找新的防治途径和措施对锈色棕榈象进行经济有效和绿色环保的防治。鉴于此,本文拟在前期克隆鉴定获得的锈色棕榈象 OBP 基因的基础上(Yan *et al.*, 2016),对该害虫的 OBP 进行同源建模以期获得相应的三维结构,为后续借助计算反向化学生态学技术手段,以构建获得的 OBP 三维结构为基础,通过分子对接方法筛选获得潜在有望开发用于防治锈色棕榈象的活性挥发物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 序列来源

锈色棕榈象 OBP 氨基酸序列为本实验室前期研究所获得,已登录于 NCBI 数据库,基因登录号为 KR780571~KR780581,分别被命名为 RferOBP1~RferOBP11(Yan *et al.*, 2016)。

1.2 模板选择

基于锈色棕榈象 OBP 氨基酸序列,利用 Blast 程序在蛋白质结构数据库(Protein data bank, PDB)中搜寻与其氨基酸序列一致性大于或等于 30%的 X 射线衍射晶体结构。然后,选择至少 3 个符合该条件的高分辨率晶体作为模板分子用于三维结构的建模。

1.3 结构建模

参照汪宇等(2015)的方法,使用 MODELLER9.15 将锈色棕榈象 OBP 的氨基酸序列与模板的氨基酸序列进行比对。然后,利用该软件生成 1 000 个模建结构,从中选择分值最接近 1 的一个结果,采用 Chimera 软件来评估电荷在该结构中的分配情况,并基于最速下降和共轭梯度法进行能量最小化优化。

1.4 模型评价

为确保同源建模所获得模型的质量,针对建模获得的最佳结构,使用 UCLA 网站(<http://services.mbi.ucla.edu/>)上的 Procheck(<http://services.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>)、Verify_3D

(http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) 和 ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) 程序分别对模型的几何结构、三维结构模型与一级结构之间的关系以及三维结构中不同原子间非键相互作用与高分辨率晶体结构间的差异情况进行分析(Lüthy *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1992; MacArthur *et al.*, 1994), 最终评价确定构建获得的模型是否合理。同时, 对评估得到的合理建模模型, 在 MODELLER 中评估保守的 6 个半胱氨酸残基上的硫原子之间的距离以及它们之间形成二硫二硫键的情况。

2 结果与分析

2.1 模板选择

通过在 PDB 数据库中搜寻发现, 在下载的 11 个锈色棕榈象 OBP 氨基酸序列中, 仅 RferOBP10 和 RferOBP11 能获得一致性大于或等于 30% 的晶体模板, 也即仅这 2 个气味结合蛋白可以进行同源建模。RferOBP10 搜索获得的模板分别来自冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 OBP 2ERB (GI: 85544531, E-value 值 $4e-16$, 同源性 30%) 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 OBP 3OGN (GI: 310942885, E-value 值 $2e-13$, 同源性 30%) 和 2L2C (GI: 6039292, E-value 值 $2e-13$, 同源性 30%)。RferOBP11 搜索获得的模板分别来自埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 OBP 3K1E (GI: 3K1E, E-value 值 $1e-15$, 同源性 32%) 致倦库蚊的 OBP 3OGN (GI: 310942885, E-value 值 $5e-23$, 同源性 38%) 和冈比亚按蚊的 OBP 3R1O (GI: 353251761, E-value 值 $5e-22$, 同源性 36%)。基于搜索获得的晶体结构, 分别利用获得的 3 个模板信息对 RferOBP10 和 RferOBP11 进行同源建模。

2.2 模型评价

Procheck 程序评价结果通过生成的拉式构象图 (Ramachandran) 来表示, 即依据建模蛋白的氨基酸在最佳合理区、较合适区、勉强接受区以及不合理区中的分布情况来评价模型质量的高低。因为甘氨酸和脯氨酸在拉式构象图中允许

存在的范围比较大, 所以非甘氨酸和脯氨酸处于合理范围的比例为判断结构合理性的主要依据。就 Procheck 程序评价结果而言, 90% 以上的非氨基酸和非脯氨酸残基位于合理区则认为建模结构共价键及键角构象是合理的。由拉式构象图可知, 就非氨基酸和非脯氨酸残基而言, RferOBP10 分别有 92.1%、5.0%、2.2% 和 0.7% 的氨基酸位于合理区、比较合适区、勉强接受区和不合理区, 而 RferOBP11 分别有 93.1%、6.9%、0% 和 0% 的氨基酸位于合理区、比较合适区、勉强接受区和不合理区 (图 1)。由此可见, 本研究构建的 RferOBP10 和 RferOBP11 建模蛋白的共价键及键角构象是合理的。

Verify_3D 用于比较分析三维模型 (3D) 与一级结构 (1D) 的兼容性关系, 通常认为当有一个氨基酸三维结构与一级结构之间关系的得分大于 0.2 时即为合理。经 Verify_3D 分析发现, 去除信号肽序列外, RferOBP10 和 RferOBP11 中绝大部分的氨基酸三维结构与一级结构的兼容性评分大于 0.2, 表明构建的三维结构中残基是合理的 (图 2)。

ERRAT 用于评估原子之间的非键相互作用的整体性能, 通常值大于 50% 时就表明模型原子之间的非键相互作用与碳骨架的结构均具有较高的合理性, 构建的三维结构质量高。RferOBP10 和 RferOBP11 的 ERRAT 值分别为 91.935% 和 78.400%, 均远大于 50% 这一阈值, 表明构建获得的建模蛋白不同原子之间的非键相互作用的整体性能是合理的 (图 3)。

综合以上评价结果, 认为同源建模所得 RferOBP10 和 RferOBP11 蛋白的三维模型是合理的。

2.3 三维结构分析

由构建获得的 RferOBP10 和 RferOBP11 三维结构图 (图 4) 可看出, 它们由 6 个 α -螺旋和连接这些螺旋的回折构成。从建模的模型结构可看出, 在这些螺旋中, 其中 5 个 α -螺旋共同以侧壁构成疏水的锥形口袋, 另外一个 α -螺旋处于口袋开口的顶部 (图 4)。保守的 6 个半胱氨酸残

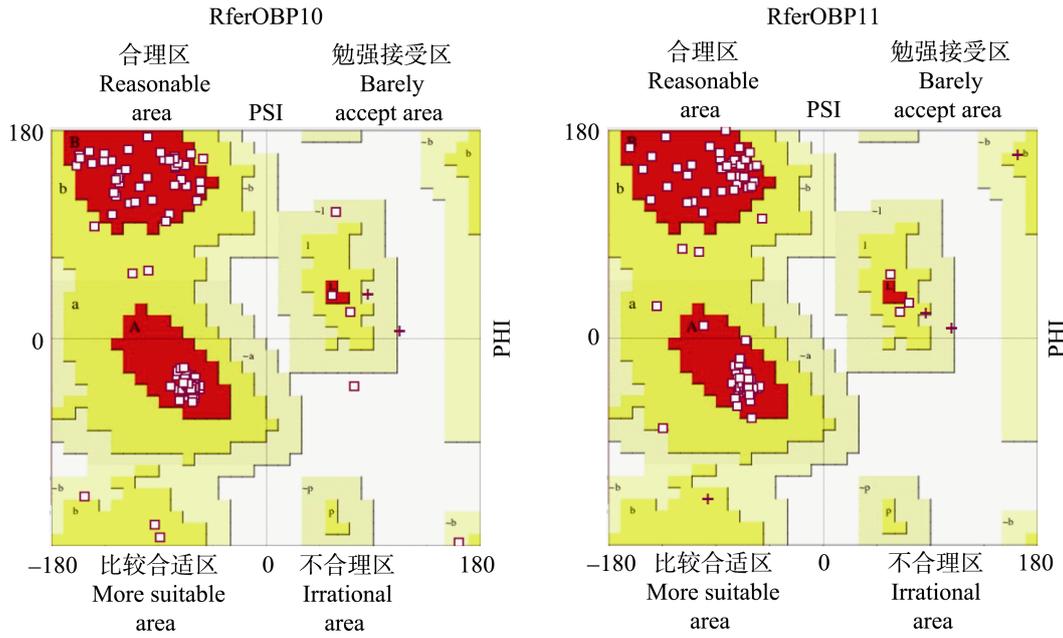


图 1 RferOBP10 和 RferOBP11 模建结构的拉式构象图
Fig. 1 Ramachandran graph of modeled RferOBP10 and RferOBP11

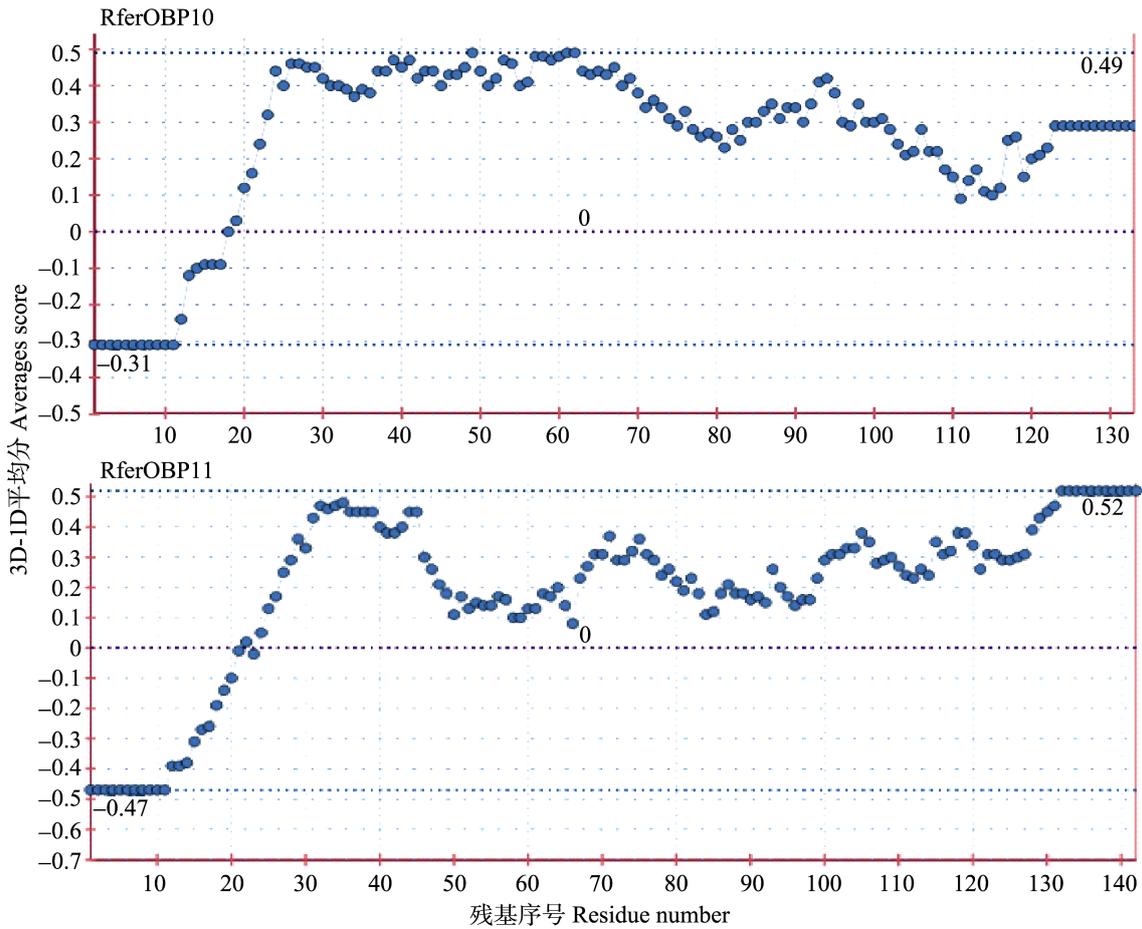


图 2 RferOBP10 和 RferOBP11 模建结构的 Verify_3D 打分结果
Fig. 2 Verify_3D scores of modeled RferOBP10 and RferOBP11

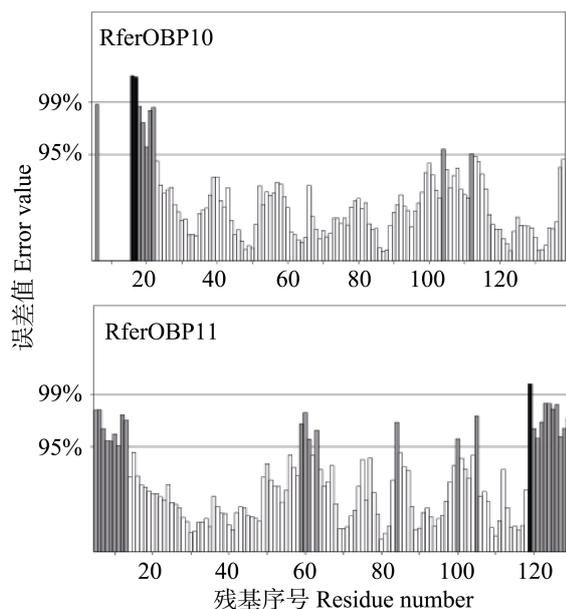


图 3 ERRAT 计算的 RferOBP10 和 RferOBP11 模建结构残基误差值

Fig. 3 Error value of ERRAT calculation of modeled RferOBP10 and RferOBP11

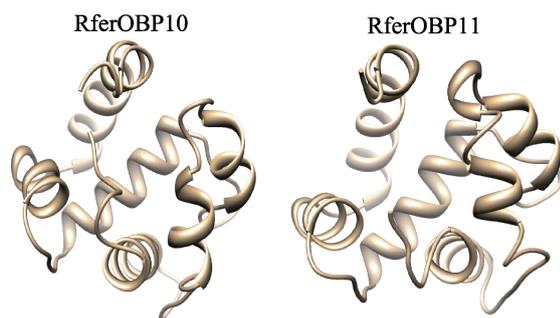


图 4 RferOBP10 和 RferOBP11 模建的三维结构

Fig. 4 Three dimensional structure of modeled RferOBP10 and RferOBP11

基上的硫原子之间的距离小于 0.2 nm, 为能构成 3 个二硫键所允许的距离范围内, 说明 6 个保守的半胱氨酸残基可形成二硫键起到稳定三维结构的作用。

3 结论与讨论

OBP 晶体结构的解析有助于揭示其生理功能与结构的关系, 并且可为基于计算反向化学生态学的分子对接手段来筛选获得潜在对昆虫行为具有调控作用的活性挥发物 (Leal *et al.*, 2008)。但是, 晶体结构的获得需要对 OBP 基因

进行表达, 纯化得到高纯度 OBP 基因表达活性产物后, 在合适的条件下使表达产物结晶, 然后借助 X 射线晶体衍射仪、核磁共振波谱仪、冷冻电镜等仪器设备来进行结构解析 (Lagarde *et al.*, 2011)。此外, 一般每个昆虫基因组中的 OBP 基因家族的数目较多。这些原因导致如果要对每个昆虫的 OBP 成员都进行晶体解析成本会很高, 且非常耗时。虽然各物种间或者同物种的不同 OBP 家族成员之间序列相似性较低, 但是其具有 6 个半胱氨酸残基的保守结构域 (Vieira and Rozas, 2011; Pelosi *et al.*, 2014)。正是由于 OBP 家族成员间存在保守的半胱氨酸残基, 使得可借助已经报道的该家族其他成员的蛋白晶体对其三维结构进行建模, 然后基于建模结构来解析结构与功能之间的关系以及用于通过分子对接筛选潜在对昆虫行为具有调控作用的化合物 (Tsitsanou *et al.*, 2012; Jayanthi *et al.*, 2014)。

本文利用 PDB 数据库中的其他昆虫 OBP 晶体作为模板, 构建获得了 RferOBP10 和 RferOBP11 的三维结构。采用 Procheck 和 ERRAT 对模建的结构进行评价得到的分值与其他昆虫 OBP 模建的评分相当 (汪宇等, 2015)。基于 Procheck、ERRAT 和 ERRAT 的评价结果认为, 构建获得的 RferOBP10 和 RferOBP11 三维结构质量高, 可用于后续分子对接研究。从结构看, 在 6 个 α -螺旋中, 其中的 5 个形成的疏水口袋为与气味分子结合的功能结构域, 该结构的形状决定能与什么样的气味分子结合以及结合的稳定性。保守的 6 个半胱氨酸残基上的硫原子之间的距离处在合理范围内, 表明它们之间形成的二硫键可以起到稳定结构的有效作用。构建获得 RferOBP10 和 RferOBP11 三维结构以及从结构获得的初步信息, 有助于后续研究这两个 OBP 在锈色棕榈象与外界环境信息交流中的作用, 并为基于构建的结构通过计算反向化学生态学手段筛选活性挥发物用于锈色棕榈象的控制奠定了基础。

参考文献 (References)

Brito NF, Moreira MF, Melo AC, 2016. A look inside odorant-

- binding proteins in insect chemoreception. *J. Insect Physiol.*, 95: 51–65.
- Jayanthi KP, Kempraj V, Aurade RM, Roy TK, Shivashankara KS, Verghese A, 2014. Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. *BMC Genomics*, 15(1): 209.
- Lagarde A, Spinelli S, Qiao H, Tegoni M, Pelosi P, Cambillau C, 2011. Crystal structure of a novel type of odorant-binding protein from *Anopheles gambiae*, belonging to the C-plus class. *Biochem. J.*, 437(3): 423–430.
- Leal WS, Barbosa RM, Xu W, Ishida Y, Syed Z, Latte N, Chen AM, Morgan TI, Cornel AJ, Furtado A, 2008. Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex mosquitoes*. *PLoS ONE*, 3(8): e3045.
- Li CX, Yan W, Huang SC, Liu L, Qin WQ, Wei J, 2013. The efficacy of 10 pesticides against red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver). *Forestry Science and Technology Development*, 27(5): 72–74. [李朝绪, 阎伟, 黄山春, 刘丽, 覃伟权, 魏娟, 2013. 10 种杀虫剂对红棕象甲高龄幼虫的毒力测定. 林业科技开发, 27(5): 72–74.]
- Liu L, Yan W, Wei J, Huang SC, Zhang J, Qin WQ, Cao JH, Peng ZQ, 2011. Chemical control of *Rhynchophorus ferrugineus* larvae. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32(8): 1545–1548. [刘丽, 阎伟, 魏娟, 黄山春, 张晶, 覃伟权, 曹建华, 彭正强, 2011. 红棕象甲幼虫化学防治研究. 热带作物学报, 32(8): 1545–1548.]
- Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D, 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364): 83–85.
- MacArthur MW, Laskowski RA, Thornton JM, 1994. Knowledge-based validation of protein-structure coordinates derived by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4(4): 731–737.
- Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM, 1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 12(4): 345–364.
- Pelosi P, Mastrogiacomo R, Iovinella I, Tuccori E, Persaud KC, 2014. Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. *Appl. Microbiol. Biot.*, 98(1): 61–70.
- Tsitanou KE, Thireou T, Drakou CE, Koussis K, Keramioti MV, Leonidas DD, Eliopoulos E, Latrou K, Zographos SE, 2012. Anopheles gambiae odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69(2): 283–297.
- 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 Biol. Evol.*, 3(1): 476–490.
- Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Research advance on molecular mechanism of odors perception in Insects. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 12(6): 720–726. [王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 2004. 昆虫感受气味物质的分子机制研究进展. 农业生物技术学报, 12(6): 720–726.]
- Wang Y, Sun H, Zhu JY, Zhao N, Yang B, 2015. Homology modeling of the odorant binding protein of the pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(5): 1223–1228. [汪宇, 孙浩, 朱家颖, 赵宁, 杨斌, 2015. 云南切梢小蠹气味结合蛋白的同源建模. 应用昆虫学报, 52(5): 1223–1228.]
- Yan W, Li L, Li CX, Huang SC, Liu Li, Qin WQ, Peng ZQ, Luo YQ, 2014. An artificial diet for the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(5): 1387–1392. [阎伟, 李磊, 李朝绪, 黄山春, 刘丽, 覃伟权, 彭正强, 骆有庆, 2014. 一种红棕象甲人工饲料及其效果. 应用昆虫学报, 51(5): 1387–1392.]
- Yan W, Liu L, Qin WQ, Li CX, Peng ZQ, 2015. Transcriptomic identification of chemoreceptor genes in the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Genet. Mol. Res.*, 14(3): 7469–7480.
- Yan W, Liu L, Qin WQ, Luo YQ, Ma XZ, Haider N, Inayeh M, 2016. Identification and tissue expression profiling of odorant binding protein genes in the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *SpringerPlus*, 5(1): 1542.
- Yan W, Liu Li, Li CX, Huang SC, Qin WQ, Peng ZQ, 2015. Affecting factors on capture efficacy of aggregation pheromone traps for *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver. *Journal of Environmental Entomology*, 37(5): 1003–1007. [阎伟, 刘丽, 李朝绪, 黄山春, 覃伟权, 彭正强, 2015. 诱捕条件对红棕象甲聚集信息素田间效果的影响. 环境昆虫学报, 37(5): 1003–1007.]
- Zhang ZK, Zhang Y, Wu SY, Lei ZR, 2017. Recent advances in odorant binding proteins of insects. *Journal of Environmental Entomology*, 39(3): 713–720. [张治科, 张焱, 吴圣勇, 雷仲仁, 2017. 昆虫气味结合蛋白研究进展. 环境昆虫学报, 39(3): 713–720.]
- Zhao HX, Zeng XN, Liang Q, Zhang XF, Huang WZ, Chen HS, Luo YX, 2015. Research on honeybee odorant-binding proteins biochemical characteristics, phyletic evolution, expression location and physiological function. *Journal of Environmental Entomology*, 37(2): 420–425. [赵红霞, 曾鑫年, 梁勤, 张学锋, 黄文忠, 陈华生, 罗岳雄, 2015. 蜜蜂气味结合蛋白的生化特性、系统进化、表达部位和生理功能的研究. 环境昆虫学报, 37(2): 420–425.]
- Zhu JY, Zhang LF, Ze SZ, Wang DW, Yang B, 2013. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 59(7): 722–728.