

褐虾过敏原 Cra c 8 蛋白的结构分析和同源建模

陆宗超, 王邦平, 李振兴*

(中国海洋大学食品安全实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了进一步认识褐虾中的一种过敏原——磷酸丙糖异构酶过敏原(Cra c 8)的结构与功能关系, 理解食物过敏原之间产生交叉反应的分子基础, 采用生物信息学方法分析 Cra c 8 蛋白的理化性质和各级结构, 探讨其与食物中该蛋白质在分子水平上的异同。结果表明: 褐虾 Cra c 8 蛋白是由 249 个氨基酸组成的酸性蛋白质, 与螯虾、对虾、三文鱼、小麦、蟑螂中的磷酸丙糖异构酶蛋白具有较高的同源性, 亲疏水性区域相似; 二级结构预测结果显示其以 α -螺旋和不规则折叠为主, 均没有 β -折叠及 β -转角区域; 利用同源建模的方式成功的构建褐虾 Cra c 8 蛋白的空间结构。

关键词: 生物信息学; 磷酸丙糖异构酶; 过敏原; 同源建模

Structure Analysis and Homology Modeling of Cra c 8 Protein from *Crangon crangon*

LU Zong-chao, WANG Bang-ping, LI Zhen-xing*

(Food Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To further understand the structure-function relationship of the allergen Cra c 8 of triosephosphate isomerase (TPI) from brown shrimps (*Crangon crangon*) and the molecular basis of cross reaction among food allergens, physical and chemical properties as well as the difference and similarity between Cra c 8 and other triosephosphate isomerases at molecular level were analyzed by a series of bioinformatics softwares. The results showed that Cra c 8 protein was an acidic protein composed of 249 amino acids. The homology of similar proteins was relatively high and hydrophobic and hydrophilic areas had great similarity in *Archaeopotamobius sibiricus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Salmo salar*, *Triticum aestivum* and *Blattella germanica*. The prediction results of secondary structure showed that α -helix and irregular folds were the major structures of Cra c 8 protein, while β -sheet and β -corner regions were absent. The spatial structure of Cra c 8 protein was successfully built by homology modeling. This study will provide a theoretical reference for exploring the activity and cross-reactivity properties of brown shrimp Cra c 8 protein.

Key words: bioinformatics; triosephosphate isomerase; allergen; homology modeling

中图分类号: TS254.1; Q617

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)09-0177-05

磷酸丙糖异构酶蛋白(triosephosphate isomerase, TPI, EC 5.3.1.1)是广泛存在于甲壳类(螯虾、褐虾、对虾)、鱼类(三文鱼等)、小麦、荔枝、乳胶等多种物种中的一种糖酵解酶, 催化二羟丙酮磷酸与 3-磷酸甘油醛之间的可逆反应^[1], 几乎所有包括三糖磷酸脂代谢的途径都包含这一转化过程, 如糖酵解、糖异生、磷酸戊糖途径及脂肪酸的生物合成等^[2-3]。近年来, 有研究发现部分物种如小麦、荔枝、鲑鱼、褐虾等食物中的 TPI 蛋白能够导致人体产生过敏反应, 是一种食物过敏

原^[4]。有研究表明, 褐虾中的 TPI 能够与 44% 过敏患者血清中的 IgE 有特异性反应, 被认为是一种食物过敏原(Cra c 8), 但对于该酶的结构及其过敏活性之间关系的研究相对较少^[5]。

生物信息学是一种建立在计算机模拟上的一门科学, 广泛运用于蛋白质结构的分析与预测。常用的软件包括 ProtParam、SWISS-MODEL^[6]、Swiss Pdb-Viewer、Protscale^[7]和 HNN 等, 曾被运用于对花生^[8-9]、牛奶过敏原^[10-13]结构的分析当中。本实验拟使用 SWISS-

收稿日期: 2011-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800859); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-50)

作者简介: 陆宗超(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食物过敏。E-mail: luzongchao_1002@163.com

* 通信作者: 李振兴(1978—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食物过敏。E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

MODEL、Swiss Pdb-Viewer 等软件分析 TPI 蛋白的理化性质、二级结构和三级结构,并在三级结构的基础上进行同源建模,为进一步研究褐虾过敏原的性质及不同来源过敏原之间的交叉反应提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试蛋白质序列来自 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),蛋白质序列登录号分别为褐虾 Cra c 8 (ACR43476.1)、中国明对虾 TPI(ABB81879.1)、小麦 TPI (CAC14917.1)、三文鱼 TPI(ACI68030.1)、蟑螂 TPI (ABI63547.1)、螯虾 Arc s 8.0101(CAD29196.1)。

1.2 方法

1.2.1 褐虾 Cra c 8 蛋白一级结构分析

利用 Expert Protein Analysis System (ExPASy) Proteomics tools (<http://www.expasy.ch/tools/>)所提供的 ProtParam 和 ProtScale 软件分别进行氨基酸残基数目、组成、蛋白质分子质量和亲/疏水性的在线分析^[14] 褐虾 Cra c 8 蛋白性质。最后运用 ClustalW 软件对褐虾 Cra c 8 蛋白、螯虾类、中国明对虾、三文鱼、小麦和蟑螂的磷酸丙糖异构酶蛋白进行多序列比对,使用邻近法(Neighbour joining)绘制系统发育树。

1.2.2 褐虾 Cra c 8 蛋白二级结构分析

利用 PredictProtein 软件、HNN 软件等在线分析褐虾 Cra c 8 蛋白的 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲以及延伸链等,并与螯虾类、中国明对虾、三文鱼、小麦和蟑螂的磷酸丙糖异构酶蛋白进行比较。

1.2.3 褐虾 Cra c 8 蛋白三级结构分析及同源建模

三级结构的预测是蛋白质结构预测的重点,主要有以下几种方法:同源模建、折叠识别和从头预测法^[15]。利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)程序进行同源建模,它运用结构仿真模拟(ProMod II 程序)和能量最小化分析(GROMOS96 程序)构建目标序列的结构。

利用检测蛋白质质量结构的软件对预测的蛋白三维结构进行分析。

2 结果与分析

2.1 褐虾 Cra c 8 蛋白的氨基酸组成特性

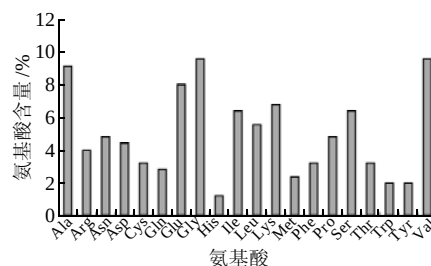


图1 褐虾 Cra c 8 蛋白的氨基酸组成
Fig.1 Amino acid composition of Cra c 8 protein

由图1可知,褐虾 Cra c 8 蛋白由 249 个氨基酸组成,在所有编码氨基酸中,甘氨酸(Gly)和缬氨酸(Val)含量最高为 9.6%,组氨酸(His)只占 1.2%。其中碱性氨基酸 30 个,酸性氨基酸 31 个,疏水性氨基酸 101 个,亲水性氨基酸 138 个。

由表1可知,褐虾 Cra c 8 蛋白的碱性氨基酸数目比螯虾 Arc s 8.0101 蛋白多 3 个,比中国明对虾的 TPI 蛋白少 3 个,比三文鱼的 TPI 蛋白多 2 个;酸性氨基酸比螯虾 Arc s 8.0101 蛋白多 2 个,比中国明对虾的 TPI 蛋白少 3 个,比三文鱼的 TPI 蛋白少 4 个;疏水性氨基酸比螯虾 Arc s 8.0101 蛋白多 15 个,比中国明对虾的 TPI 蛋白多 1 个,比三文鱼的 TPI 蛋白少 2 个;亲水性氨基酸比螯虾 Arc s 8.0101 蛋白多 5 个,比中国明对虾的 TPI 蛋白少 3 个,比三文鱼的 TPI 蛋白少 7 个。通过对以上 6 种物种的 TPI 蛋白的氨基酸序列进行比对,结果显示:褐虾 Cra c 8 蛋白与螯虾 Arc s 8.0101 蛋白的同源性为 87%,与中国明对虾的 TPI 蛋白的同源性为 83%,与三

表1 褐虾 Cra c 8 蛋白与其他 5 种物种 TPI 蛋白氨基酸组成的比较

Table 1 Comparison of amino acid compositions of Cra c 8 protein from brown shrimp and TPI proteins from other five species

比较项目	褐虾 (<i>Crangon crangon</i>)	螯虾(<i>Archaeopotamobius sibiriensis</i>)	中国明对虾 (<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	三文鱼 (<i>Salmo salar</i>)	小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	蟑螂 (<i>Blattella germanica</i>)
氨基酸残基总数	249	224	248	248	253	247
原子总数	3774	3401	3851	3724	3793	3800
分子式	C ₁₁₉₀ H ₁₈₈₄ N ₃₂₆ O ₃₆₀ S ₁₄	C ₁₀₆₉ H ₁₆₉₃ N ₂₉₇ O ₃₃₀ S ₁₂	C ₁₂₁₀ H ₁₉₂₂ N ₃₄₂ O ₃₆₄ S ₁₃	C ₁₁₇₀ H ₁₈₅₃ N ₃₂₁ O ₃₇₁ S ₉	C ₁₁₉₆ H ₁₉₀₈ N ₃₂₀ O ₃₆₁ S ₈	C ₁₁₉₉ H ₁₉₀₉ N ₃₂₅ O ₃₆₁ S ₆
分子量/u	26966.86	24370.7	27501.4	26641	26802.7	26845.6
碱性氨基酸	30	27	33	28	25	29
酸性氨基酸	31	29	34	35	27	33
疏水性氨基酸	101	86	100	103	114	112
亲水性氨基酸	138	133	141	145	133	143

文鱼的 TPI 蛋白的同源性为 68%，与小麦 TPI 蛋白的同源性为 56%，与蟑螂 TPI 蛋白的同源性为 69%，其中褐虾 Cra c 8 蛋白与螯虾 Arc s 8.0101 蛋白的同源性最高。进一步构建磷酸丙糖异构酶蛋白序列构建的系统发育树，由图 2 可知，褐虾 Cra c 8 蛋白与螯虾 Arc s 8.0101 蛋白、中国明对虾的 TPI 蛋白的亲缘关系最相近，与三文鱼的 TPI 蛋白的亲缘关系较近，与蟑螂和小麦的 TPI 蛋白的亲缘差异较大。

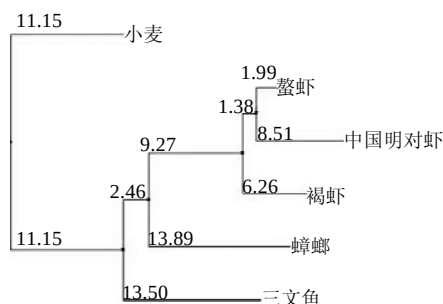
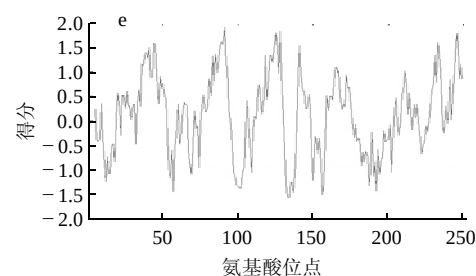
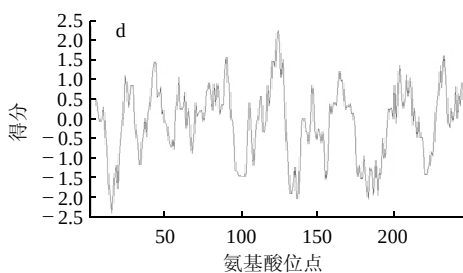
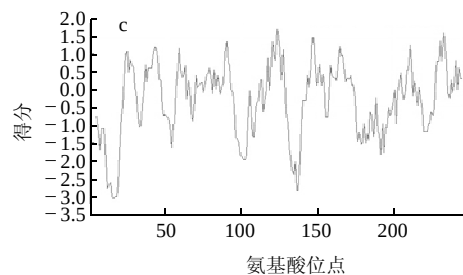
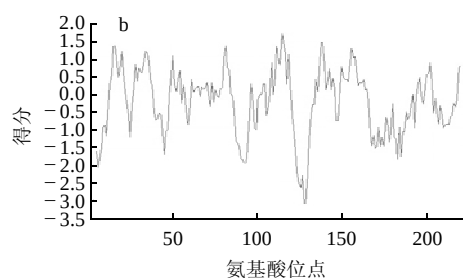
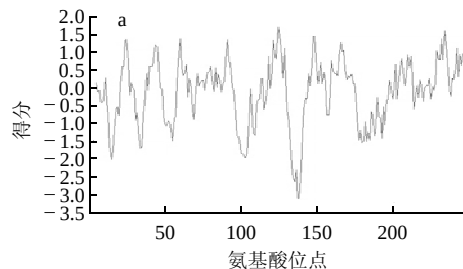


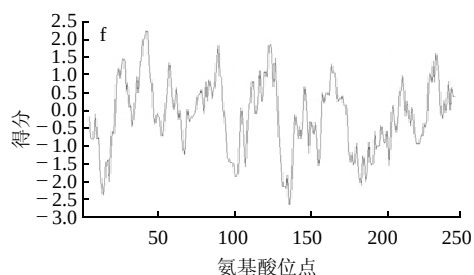
图 2 根据 6 种物种过敏原蛋白的氨基酸序列构建的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of allergen proteins from six species

2.2 褐虾 Cra c 8 蛋白亲疏水性分析

过敏原的表位一般都具有较高的亲水性，这是该表位与靶点结合的基础。利用 ProtScale 软件的 Kyte and Doolittle 算法对褐虾 Cra c 8 蛋白、螯虾 Arc s 8.0101 蛋白、中国明对虾 TPI 蛋白、三文鱼 TPI 蛋白、小麦 TPI 蛋白、蟑螂 TPI 蛋白进行亲水 / 疏水性分析(图 3)。正值大表示疏水性强，负值大表示亲水性强，介于 +0.5 ~ -0.5 之间的主要为两性氨基酸，结果表明大约在褐虾 Cra c 8 蛋白存在 8 个高疏水区分别分布在 25~27 区域、46~49 区域、61~63 区域、88~90 区域、123~127 区域、147~149 区域、163~165 区域和 231~233 区域，6 个主要的最小分值区域则分布于 15、35、52、100、140、180 氨基酸位点附近，显示这些区域为高亲水性(图 3a)。褐虾 Cra c 8 蛋白的亲水区和疏水区与中国明对虾 TPI 蛋白、螯虾 Arc s 8.0101 蛋白的基本一致，与三文鱼 TPI 蛋白、小麦 TPI 蛋白和蟑螂 TPI 蛋白的有一定差异。褐虾 Cra c 8 蛋白的疏水性氨基酸总数与中国明对虾的 TPI 蛋白的疏水性氨基酸总数几乎相等，并且它们的疏水性氨基酸所处的位置也大体一致。而褐虾 Cra c 8 蛋白的疏水性氨基酸总数与螯虾 Arc s 8.0101 蛋白、三文鱼 TPI 蛋白、小麦 TPI 蛋白、蟑螂 TPI 蛋白的疏水性氨基酸总数有一定的差异，所处位置也有所不同，因此褐虾 Cra c 8 蛋白的亲水区和疏水区与中国明对虾的 TPI

蛋白的基本一致，与螯虾 Arc s 8.0101 蛋白的亲 / 疏水区相似性较高。



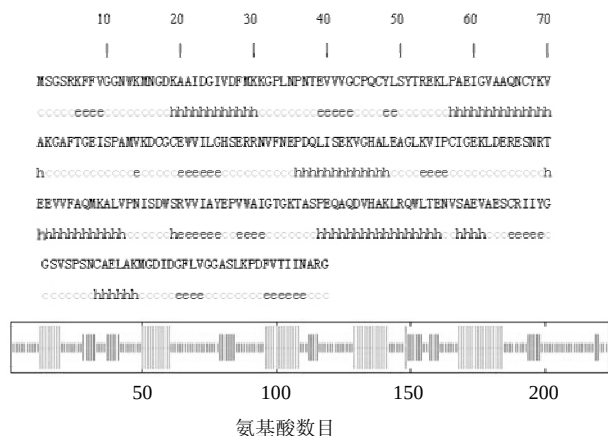


a.褐虾 Cra c 8 蛋白; b.螯虾 Arc s 8.0101 蛋白; c.中国明对虾 TPI 蛋白; d.三文鱼 TPI 蛋白; e.小麦 TPI 蛋白; f.蟑螂 TPI 蛋白。

图3 6种物种过敏蛋白的亲/疏性法分析

Fig.3 Hydrophobicity or hydrophilicity of Cra c 8 protein, Arc s 8.0101 protein, TPI proteins from *Fenneropenaeus chinensis*, *Salmo salar*, *Triticum aestivum* and *Blattella germanica*

2.3 褐虾 Cra c 8 蛋白的二级结构分析



α -螺旋(h), 图中最长部分; 延伸(e), 图中最短部分; 无规则卷曲(c), 图中中长部分。

图4 Cra c 8 蛋白的二级结构分析

Fig.4 Secondary structure analysis of Cra c 8 protein

由图4 HNN 软件分析结果可知, 组成褐虾 Cra c 8 蛋白的249个氨基酸中, 81个氨基酸可以形成 α -螺旋(占总量的32.53%), 47个氨基酸可能形成延伸(占总量的18.88%), 121个氨基酸可能形成无规则卷曲(占总量的48.59%), 而 β -折叠则可能不形成。从上述预测结果可以看出在第30、71、118、152、195个氨基酸处可能存在 α -螺旋结构; 19、83、139等处可能存在无规则卷曲; 95、165、246等处可能存在延伸。

由表2可知, 褐虾 Cra c 8 蛋白与其他5种 TPI 蛋白

的二级结构相似性较高。但 α -螺旋区域内的氨基酸比螯虾 Arc s 8.0101 蛋白中的多18个, 比中国明对虾的 TPI 蛋白少8个, 比三文鱼的 TPI 蛋白多1个, 比小麦的 TPI 蛋白少9个, 比蟑螂的 TPI 蛋白少23个; 延伸区域内的氨基酸比螯虾 Arc s 8.0101 蛋白中的多10个, 比中国明对虾的 TPI 蛋白多4个, 比三文鱼的 TPI 蛋白少13个, 比小麦的 TPI 蛋白少3个, 比蟑螂的 TPI 蛋白少2个; 无规卷曲区域中的氨基酸比螯虾 Arc s 8.0101 蛋白少3个, 比中国明对虾的 TPI 蛋白多5个, 比三文鱼的 TPI 蛋白多13个, 比小麦的 TPI 蛋白多8个, 比蟑螂的 TPI 蛋白多14个。6种 TPI 蛋白均都没有 β -折叠及 β -转角区域。说明褐虾 Cra c 8 蛋白在二级结构上与螯虾 Arc s 8.0101 蛋白、中国明对虾的 TPI 蛋白、三文鱼的 TPI 蛋白、小麦的 TPI 蛋白、蟑螂的 TPI 蛋白的相似度较高, 但也存在一定的差异性。

2.4 褐虾 Cra c 8 蛋白的三级结构预测

采用同源建模法^[16-17]对褐虾 Cra c 8 蛋白三级结构进行预测。使用 SWISS-MODEL 服务器(<http://www.Expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>)自动选取登录号为2i9e的蛋白的B链作为最佳模板(其与褐虾 Cra c 8 蛋白的同源性可达70.612%), 并由此构建了褐虾 Cra c 8 蛋白的三维模型, 建模结果见图5~6。并使用程序 DeepView(Swiss Pdb-Viewer), Anolea 对构建的模型进行评估。通过程序 DeepView(Swiss Pdb-Viewer)访问, DeepView 是一个整合工具, 用于观察和分析蛋白质结构和模型, 计算得出 Ramachandran 图, 由图7可知, 模拟得到的褐虾 Cra c 8 蛋白结三维结构的 ϕ 角和 ψ 角有91.2%位于 Ramachandran 图中合理区域(白色区域), 符合立体化学规则, 从理论上表明模拟得到的褐虾 Cra c 8 蛋白的三维结构是可靠的。Anolea 是以原子经验平均力势计算每个氨基酸和周围环境的相互作用能量, 能量越高越不稳定(为正值, 以黑色表示), 反之亦然(为负值, 以灰色表示), 褐虾 Cra c 8 蛋白能量分布情况如图8所示, 这说明本研究构建的磷酸丙糖异构酶的三维结构有较高的可靠性。通过对褐虾 Cra c 8 蛋白质的高级结构预测, 有助于研究褐虾 Cra c 8 过敏蛋白的构效关系, 对于明确影响蛋白功能发挥关键的结构域、功能活性保守位点、邻近氨基酸残基对功能发挥潜在的影响及可能的突变机制, 具有积极的作用。

表2 二级结构的比较分析

Table 2 Comparison of secondary structures between Cra c 8 protein from brown shrimp and TPI proteins from other five species

氨基酸数目	褐虾(<i>Crangon crangon</i>)	螯虾(<i>Archaeopotamobius sibiricus</i>)	中国明对虾(<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	三文鱼(<i>Salmo salar</i>)	小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	蟑螂(<i>Blattella germanica</i>)
α -螺旋	81	63	89	80	90	104
延伸	47	37	43	60	50	49
无规则卷曲	121	124	116	108	113	107



图5 模板 2i9eB 蛋白的空间结构
Fig.5 Steric structure of 2i9eB protein



图6 Cra c 8 蛋白的空间结构
Fig.6 Steric structure of Cra c 8 protein

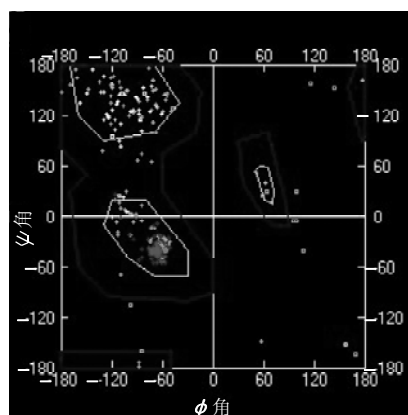
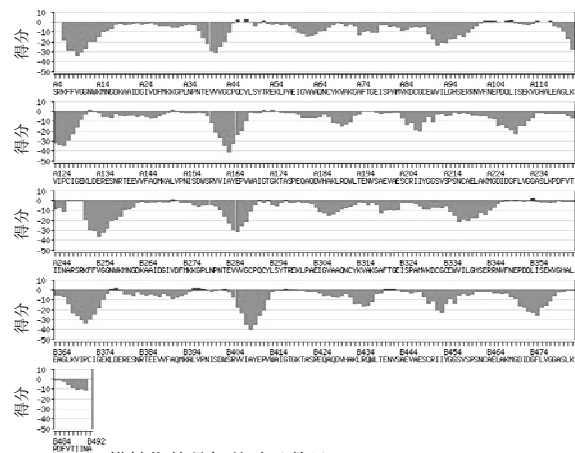


图7 Cra c 8 蛋白三维结构的 Ramachandran 图
Fig.7 Ramachandran plot for the three dimensional structure of Cra c 8 protein



横轴指的是氨基酸及数目。A4~A248、B249~B492.对同一段氨基酸进行的两次评估。

图8 Cra c 8 蛋白结构模型的势能分析

Fig.8 Anolea analysis of the three dimensional structure of Cra c 8

3 结 论

褐虾 Cra c 8 蛋白同螯虾 Arc s 8.0101、中国明对虾 TPI 蛋白亲缘关系较近,褐虾 Cra c 8 蛋白的氨基酸序列与螯虾 Arc s 8.0101 蛋白、中国明对虾 TPI 蛋白的氨基酸序列同源性分别为 87%、83%,而且不同物种的 TPI 蛋白的理化性质和二级结构相似性较高。构建了较为稳定的褐虾 Cra c 8 蛋白的立体结构,为进一步研究该过敏原的三维构象提供了基础数据。本研究为进一步理解不同食物之间的交叉反应提供了基础数据,实际交叉反应的情况有待进一步的实验验证。

参考文献:

- [1] ALBER T, BANNER D W, BLOOMER A C, et al. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triosephosphate isomerase[J]. Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-biological Sciences, 1981, 293: 159-171.
- [2] XU Yang, YU Hong, HALL T C. Rice triosephosphate isomerase gene 5 [prime] sequence directs [beta]-glucuronidase activity in transgenic tobacco but requires an intron for expression in rice[J]. Plant Physiology, 1994, 106(2): 459-467.
- [3] ZHANG Xinghai, CHINNAPPA C C. Triosephosphate isomerase of *Stellaria longipes*(Caryophyllaceae)[J]. Genome, 1994, 37(1): 148-156.
- [4] WANG Bangping, LI Zhenxing, LIN Hong, et al. Identification and characterization of a new IgE-binding protein in mackerel (*Scomber japonicus*) by MALDI-TOF-MS[J]. Journal of Ocean University of China (English Edition), 2011, 10(1): 93-98.
- [5] HOPPE S, STEIN H, PASCHKE A. Identification of a 28 kDa lychee allergen as a triosephosphate isomerase[J]. Food and Agricultural Immunology, 2006, 17(1): 9-19.
- [6] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [7] JOHN M W. The proteomics protocols handbook[M]. New York : Humana Press, 2005: 571-607.
- [8] 夏利新, 闫浩, 汤慕瑾, 等. 花生过敏原 Ara h 2 与 Ara h 6 的生物信息学比较研究[J]. 深圳大学学报: 理工版, 2010, 27(2): 241-246.
- [9] 吉坤美, 陈家杰, 汤慕瑾, 等. 双抗体夹心 ELISA 法测定食物中花生过敏原蛋白成分[J]. 食品科技与开发, 2009, 30(6): 110-114.
- [10] 韩婷, 高金燕, 李欣, 等. 牛乳 β -乳球蛋白过敏原线性表位串联体的分子设计[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 465-468.
- [11] SELO I, CLEMENT G, BERNARD H, et al. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides[J]. Clinical Experimental Allergy, 1999, 29(8): 1055-1063.
- [12] JARVINEN K M, CHATCHATEE P, BARDINA L, et al. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2001, 126(2): 111-118.
- [13] AOKI T, ISKANDAR S, YOSHIDA T, et al. Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugating with chitosan[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2006, 70(10): 2349-2356.
- [14] CHIEN P C, BURKHARD R. State-of-the-art in membrane protein prediction[J]. Applied Bioinformatics, 2002, 1(1): 21-35.
- [15] Biocarta. Charting pathways of life[EB/OL]. (2003-12-01)[2011-01-23]. <http://www.biocarta.com/genes/index.asp>.
- [16] SCHWEDE T, KOPP J, GUEN N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [17] GUEN N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling[J]. Electrophoresis, 1997, 18(15): 2714-2723.