利用SPDBV软件分析 OPHC2蛋白

组员：李燕　　张小芸　　吕红　　孟红岩

2008-6-21

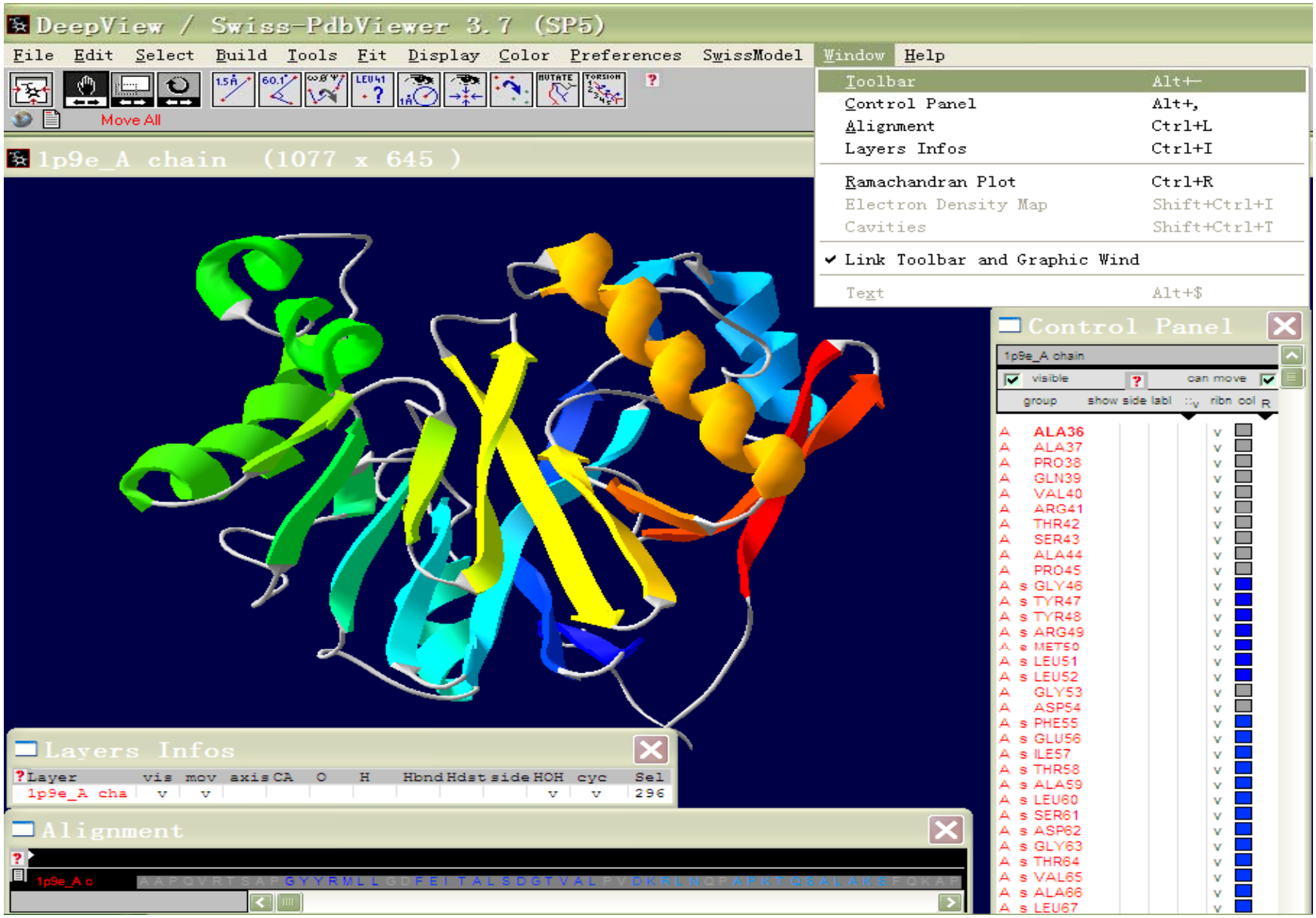
主要内容：

- SPDBV软件简介
- OPHC2蛋白介绍
- 蛋白分析
- 结果与讨论
- 参考文献
- 致谢

一、SPDBV软件的特点

- Spdbv 即Swiss-PdbViewer，界面非常适用,能同时分析几个蛋白PDB文件。
- 分析几个蛋白结构类似性，比较活性位点或其它有关位点。
- 通过菜单操作与直观的图形，获得氢键、角度、原子距离、氨基酸突变等数据。
- 与Swiss-Model服务器紧密关联，可直接构建理论蛋白结构。

界面


DeepView / Swiss-PdbViewer 3.7 (SP5)
File Edit Select Build Tools Fit Display Color Preferences SwissModel Window Help
Move All
1p9e_A chain (1077 x 645)
Toolbar Alt+-
Control Panel Alt+,
Alignment Ctrl+L
Layers Infos Ctrl+I
Ramachandran Plot Ctrl+R
Electron Density Map Shift+Ctrl+I
Cavities Shift+Ctrl+T
Link Toolbar and Graphic Wind
Text Alt+$
Control Panel
1p9e_A chain
visible
can move
group show side labl ribn col
Layers Infos
Layer vis mov axis CA O H Hbnd Hdst side HOH cyc Sel
1p9e_A cha v v v 296
Alignment

1. 菜单栏

File Edit Select Build Tools Fit Display Color Preferences SwissModel Window Help

File—open PDB file 打开一个新的PDB格式文件。

File---save---save selected residues 把文件保存在指定的文件夹。

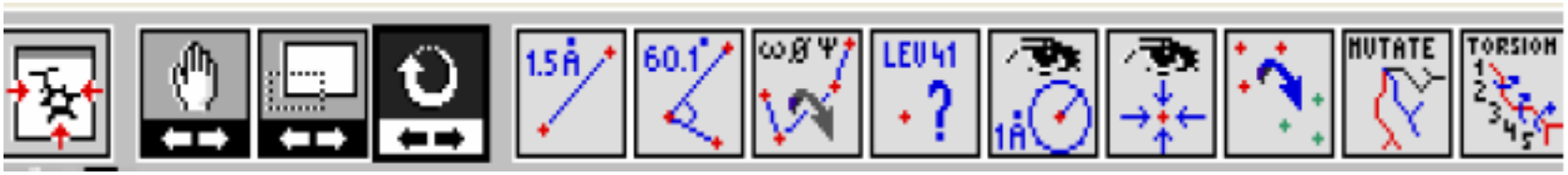
Select---group kind 寻找特定的氨基酸并在控制面板中标识出来。

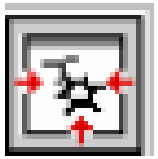
Fit---magic fit 两个蛋白的三维结构进行重叠。

Color---by chain 将不同的链用不同的颜色加以区分。

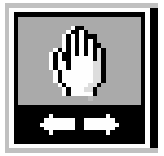
Windows---alignment 进行序列比对。

2. 工具栏

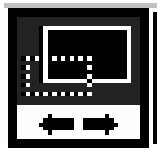




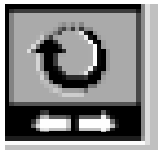
将图形在窗口中的适当位置呈现适中的大小。



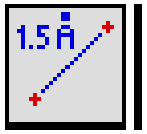
可以将图形自由的移动了



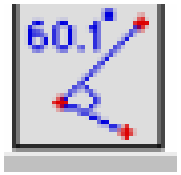
将图形自由的扩大或者缩小



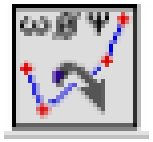
将图形进行旋转



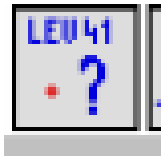
测量两个原子间的距离。



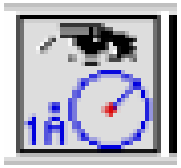
测量三个原子间夹角的度数。



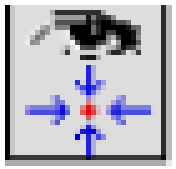
测量二面角。



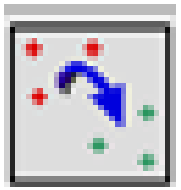
显示该点的氨基酸名称。



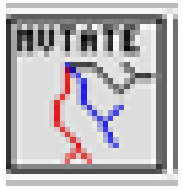
得到距离中心原子几埃之内其它残基或原子。



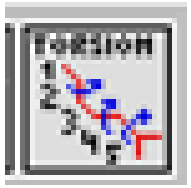
将所选原子处于窗口的中心位置。



将一个分子叠加到另一个分子上。

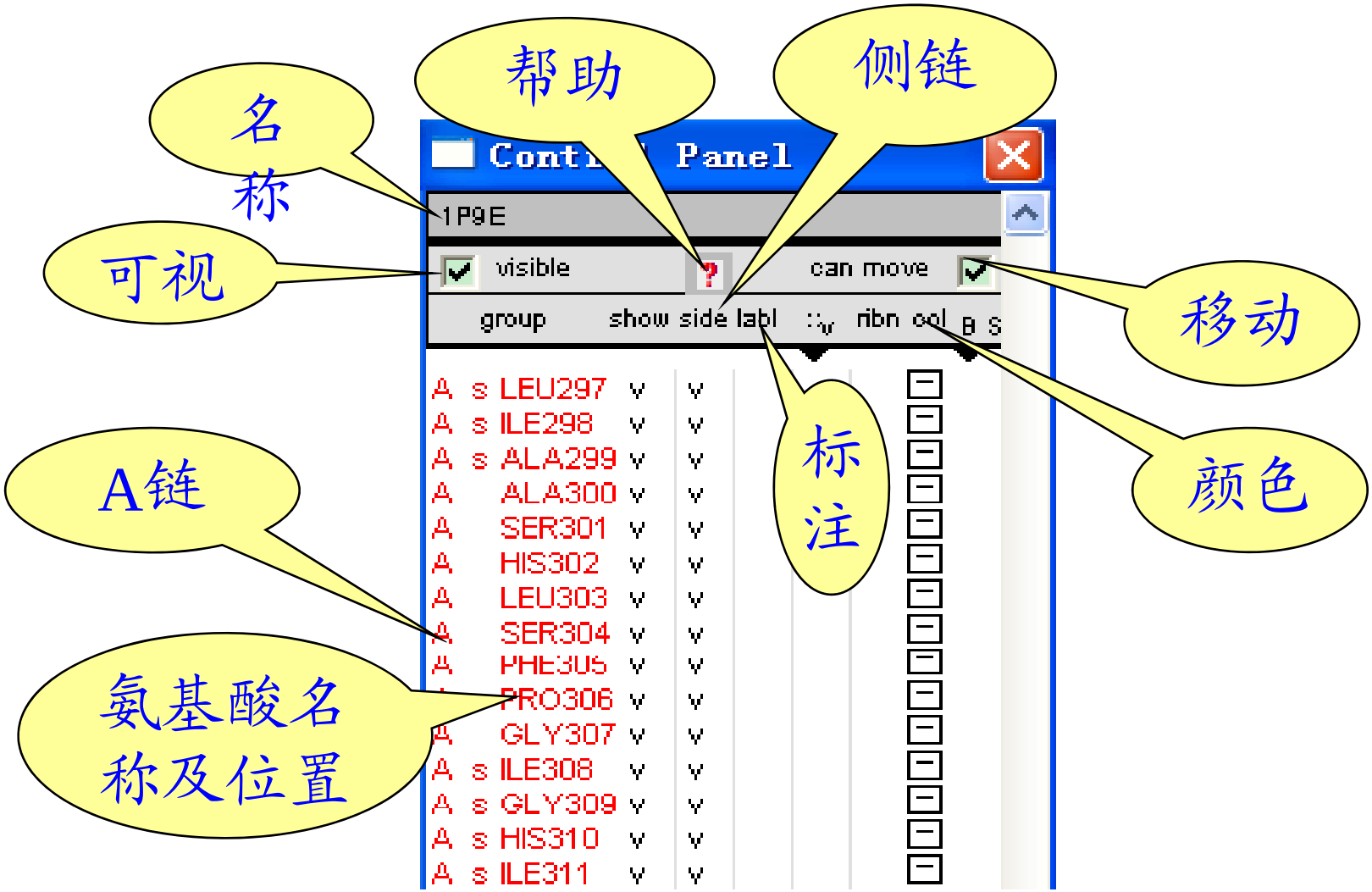


突变工具，可将该点处的氨基酸突变为其他氨基酸。

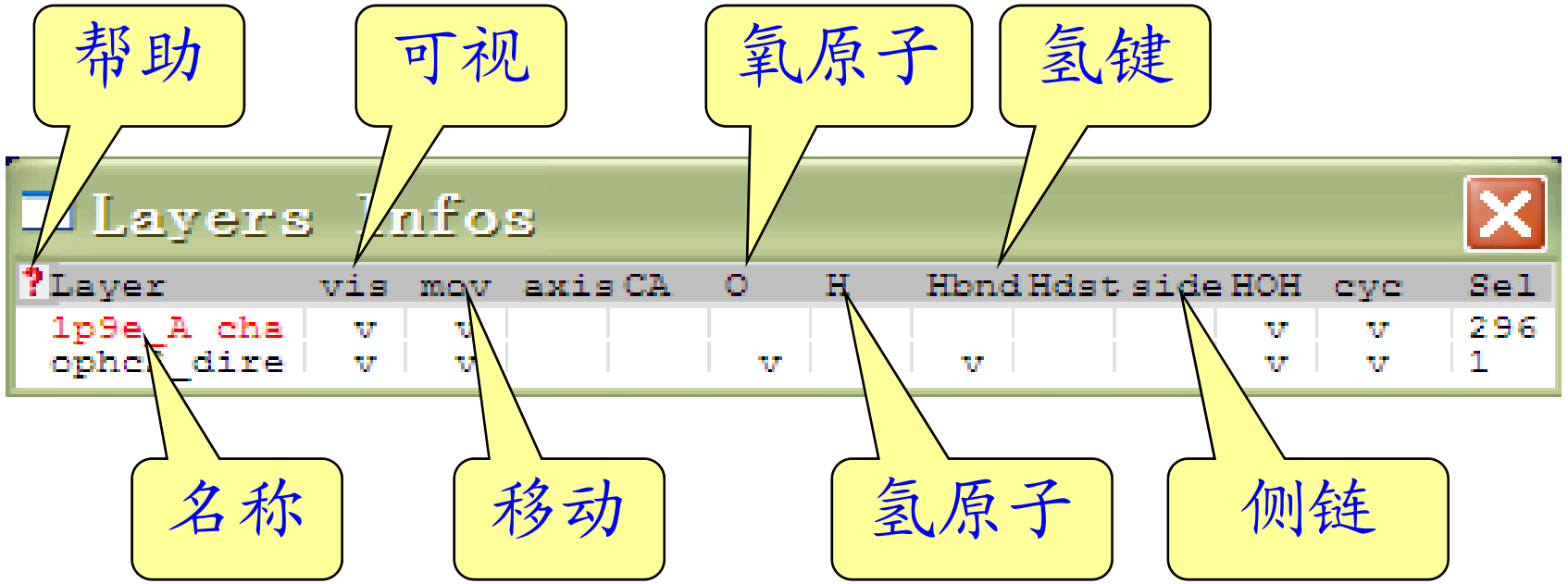


扭转工具，可以通过左右点击和移动鼠标旋转侧链原子。

3.控制面板


名称
帮助
侧链
可视
移动
标注
颜色
A链
氨基酸名称及位置
Panel
1P9E
visible
can move
group
show side labl
ribn col
A s LEU297
A s ILE298
A s ALA299
A ALA300
A SER301
A HIS302
A LEU303
A SER304
A PRO306
A GLY307
A s ILE308
A s GLY309
A s HIS310
A s ILE311

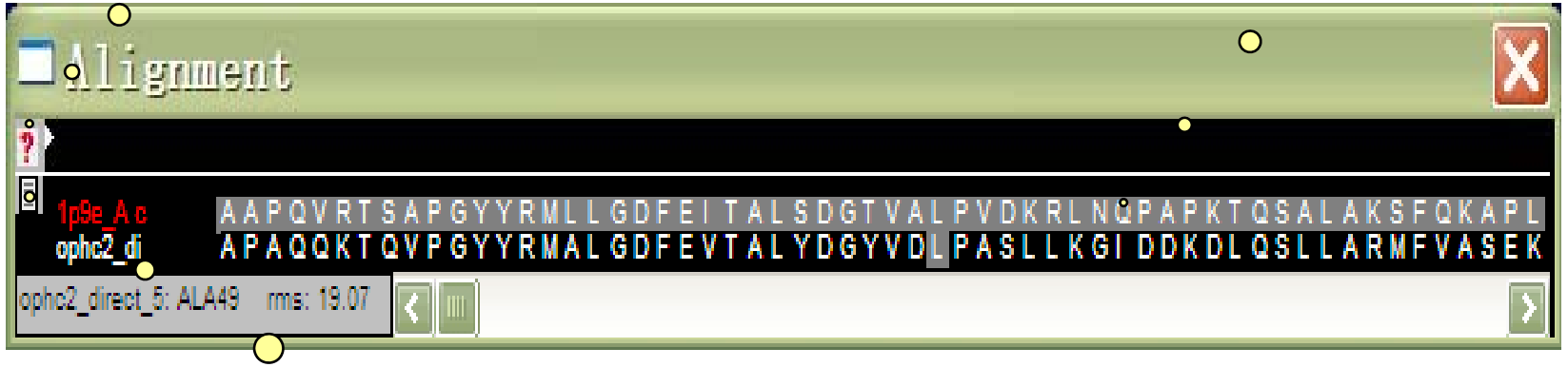
4. 图层窗口


帮助
可视
氧原子
氢键
Layers Infos
?Layer vis mov axis CA O H Hbnd Hdst side HOH cyc Sel
1p9e_A cha v v v 296
ophc_dire v v v v v 1
名称
移动
氢原子
侧链

4. 比对窗口

帮助

比对



比对的文本

二、OPHC2蛋白介绍

- OPHC2是一种有机磷降解酶,能够高效降解有机磷农药。
- 有机磷降解酶基因*ophc2*编码的蛋白，该基因是从*Pseudomonas pseudoalcaligenes*中克隆出的。
- 基因全长975 bp,（G+C）含量为63%，共324个氨基酸残基，前24个氨基酸残基为信号肽序列。
- OPHC2以甲基对硫磷为最适底物。

1. 研究现状

- *Ophc2*基因在GenBank中的登录号为：AJ605330。
- 该蛋白的序列在NCBI网站上的登录号是：CAE53631。
- 目前还没有测定OPHC2蛋白质三维结构。

2. 课题目的

对OPHC2的同源蛋白质1P9E进行分析，包括对其原蛋白质的三维结构及其突变体的分析，从而帮助分析OPHC2蛋白质的三维结构及功能。

3. 分析方法

- 获得OPHC2蛋白质的氨基酸序列。
- 用Weblab分析OPHC2蛋白质的各类氨基酸含量。
- 寻找与OPHC2蛋白质同源的三维结构已知的蛋白质。
- OPHC2蛋白与同源蛋白比较分析。
- 预测OPHC2蛋白质的三维结构。
- 分析该同源蛋白质来选定要进行突变氨基酸残基位点。
- 通过文献中的突变体的信息来对OPHC2进行突变。

三、蛋白质分析

1. 获得OPHC2的氨基酸序列

>OPHC2

MRLFSLSTALSSAMIALVSLPLQAAAPAQQKTQVPGY
YRMALGDFEVTALYDGYVDLPASLLKGIDDKDLQSLL
ARMFVASEKGVQTAVNAYLINTGDNLVLIDTGAAQCF
GPTLGVVQTNLKASGYQPEQVDTVLLTHLHPDHACGL
VNADGSPAYPNATVEVPQAEAEFWLDEATMAKAPEGM
QGMFKMAQQAVAPYAKMNKLKPYKTEGELLPGVSLVA
SPGHTPGHTSYLFKSGGQSLLVWGDILLNHAVQFAKP
EVVFEFDVDSDQARQSRQRILAEAATDKLWVAGAHLP
FPGLGHVRKEAQGYAWVPVEFSPIRSDR

2.Pepstats:各种氨基酸含量

PEPSTATS of ophc2 from 1 to 324

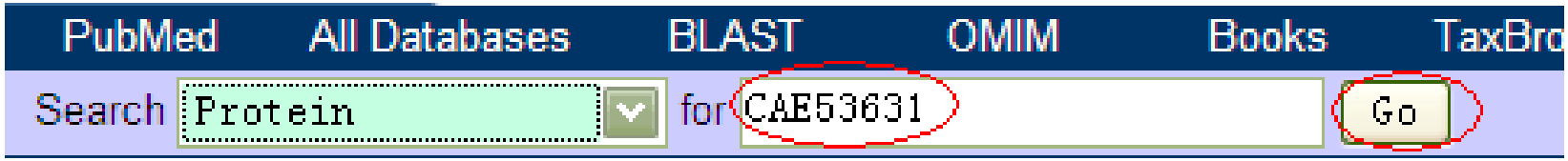
Molecular weight = 34927.77 Residues = 324
Average Residue Weight = 107.802 Charge = -5.0
Isoelectric Point = 5.3273
A280 Molar Extinction Coefficient = 36840
A280 Extinction Coefficient 1mg/ml = 1.05
Improbability of expression in inclusion bodies = 0.509

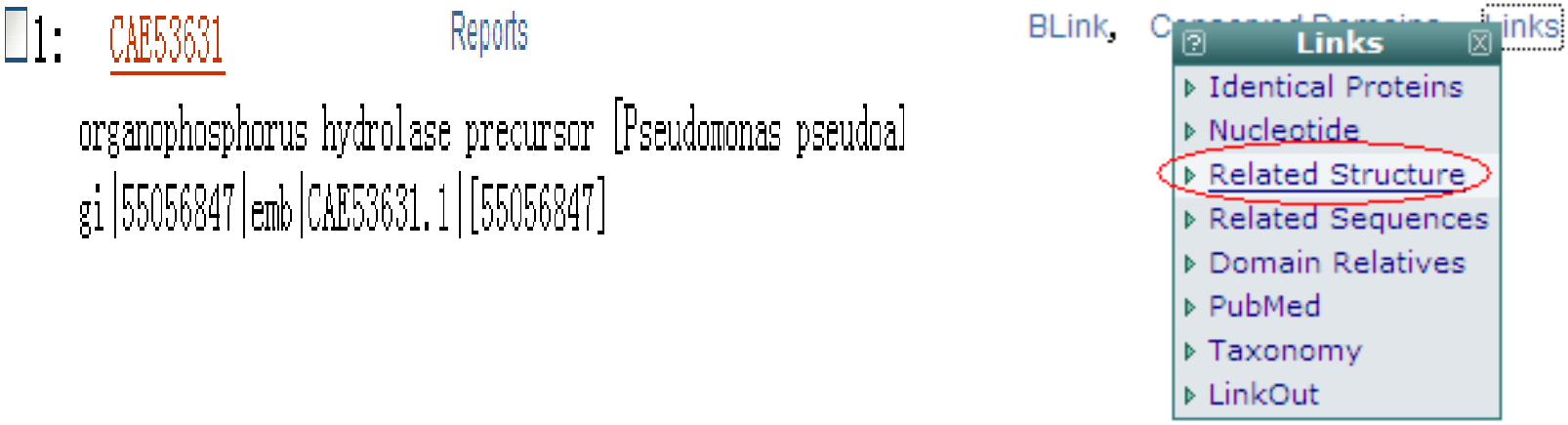
Residue	Number	Mole%	DayhoffStat
A = Ala	41	12.654	1.471
B = Asx	0	0.000	0.000
C = Cys	2	0.617	0.213
D = Asp	18	5.556	1.010
E = Glu	15	4.630	0.772
F = Phe	12	3.704	1.029
G = Gly	25	7.716	0.919
H = His	8	2.469	1.235
I = Ile	7	2.160	0.480
J = ---	0	0.000	0.000
K = Lys	15	4.630	0.701
L = Leu	37	11.420	1.543
M = Met	9	2.778	1.634
N = Asn	8	2.469	0.574
O = ---	0	0.000	0.000
P = Pro	21	6.481	1.246
Q = Gln	20	6.173	1.583
R = Arg	9	2.778	0.567
S = Ser	19	5.864	0.838
T = Thr	16	4.938	0.810
U = ---	0	0.000	0.000
V = Val	27	8.333	1.263
W = Trp	4	1.235	0.950
X = Xaa	0	0.000	0.000
Y = Tyr	11	3.395	0.999
Z = Glx	0	0.000	0.000

Property	Residues	Number	Mole%
Tiny	(A+C+G+S+T)	103	31.790
Small	(A+B+C+D+G+N+P+S+T+V)	177	54.630
Aliphatic	(A+I+L+V)	112	34.568
Aromatic	(F+H+W+Y)	35	10.802
Non-polar	(A+C+F+G+I+L+M+P+V+W+Y)	196	60.494
Polar	(D+E+H+K+N+Q+R+S+T+Z)	128	39.506
Charged	(B+D+E+H+K+R+Z)	65	20.062
Basic	(H+K+R)	32	9.877
Acidic	(B+D+E+Z)	33	10.185

3. 寻找同源蛋白质：

打开NCBI网页





找到一个相似性最高的蛋白

1P9E的PDB格式文件

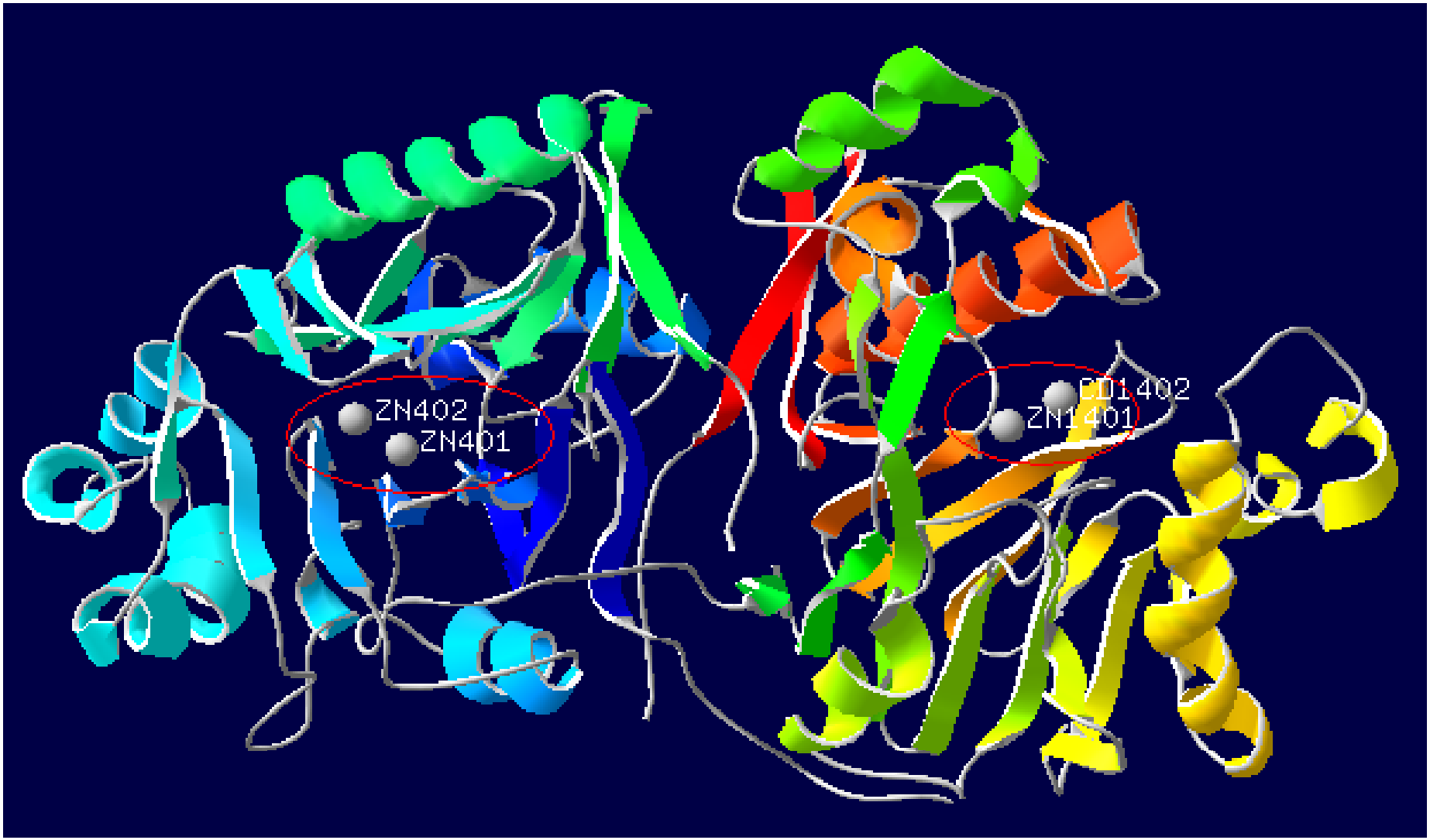
打开PDB主页 ⟶ 输入1P9E ⟶ 点击搜索 ⟶ 下载文件

1p9e

Red - Derived Information

Title	Crystal Structure Analysis of Methyl Parathion Hydrolase from Pse
Authors	**Dong, Y.**, **Sun, L.**, **Bartlam, M.**, **Rao, Z.**, **Zhang, X.**
Primary Citation	**Dong, Y.**, **Sun, L.**, **Bartlam, M.**, **Rao, Z.**, **Zhang, X.** Crystal Structure An Pseudomonas sp WBC-3 *To be Published*
History	Deposition 2003-05-11 Release 2004-05-25
Experimental Method	Type X-RAY DIFFRACTION Data [EDS]

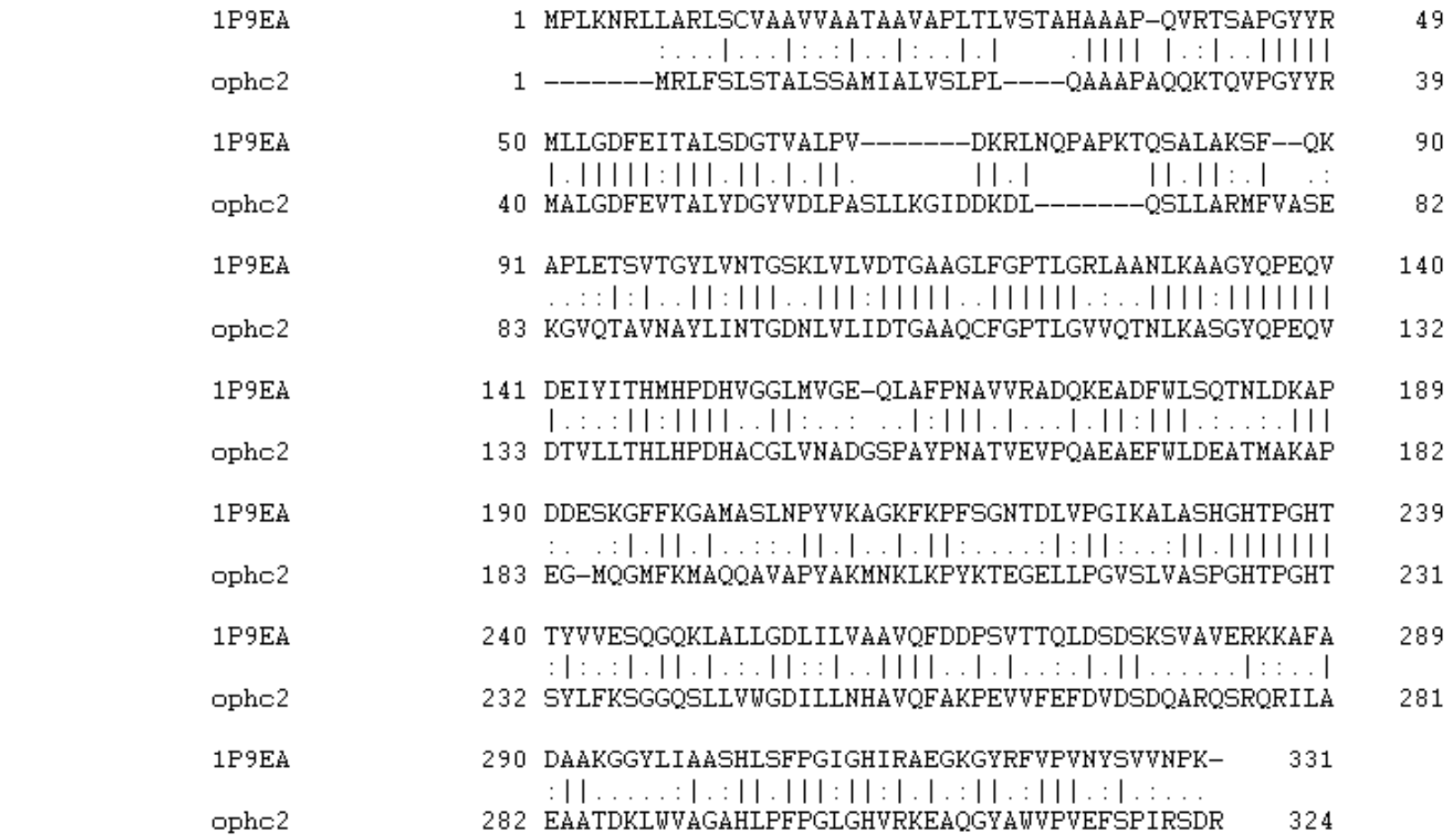
1P9E蛋白的立体结构



4. 1P9E与OPHC2蛋白氨基酸序列比对结果

```
Length: 343
Identity:      153/343 (44.6%)
Similarity:    204/343 (59.5%)
Gaps:           31/343 ( 9.0%)
Score: 728.0
```

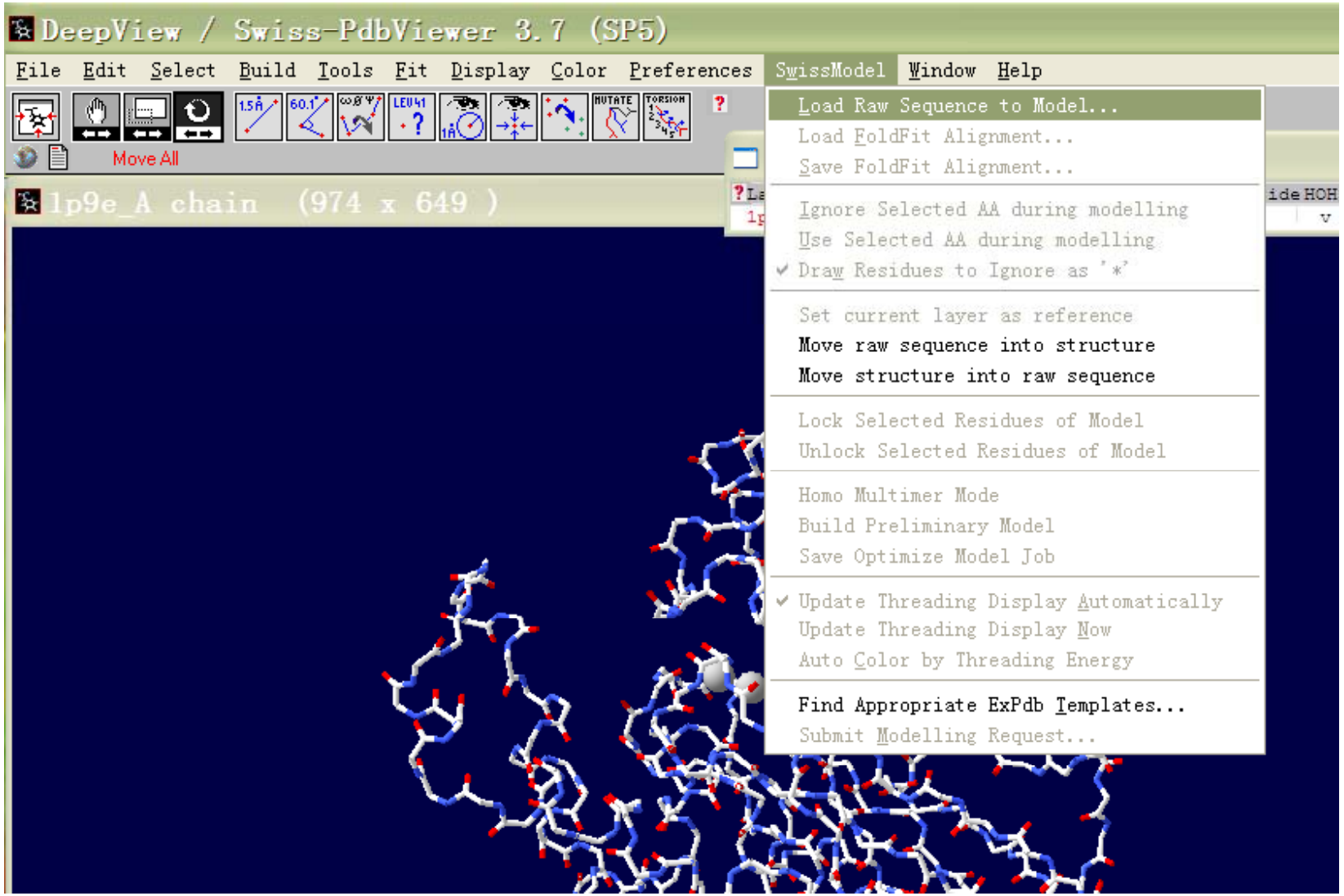
- 长度:343个aa
- 一致性:44.6%
- 相似性:59.5%

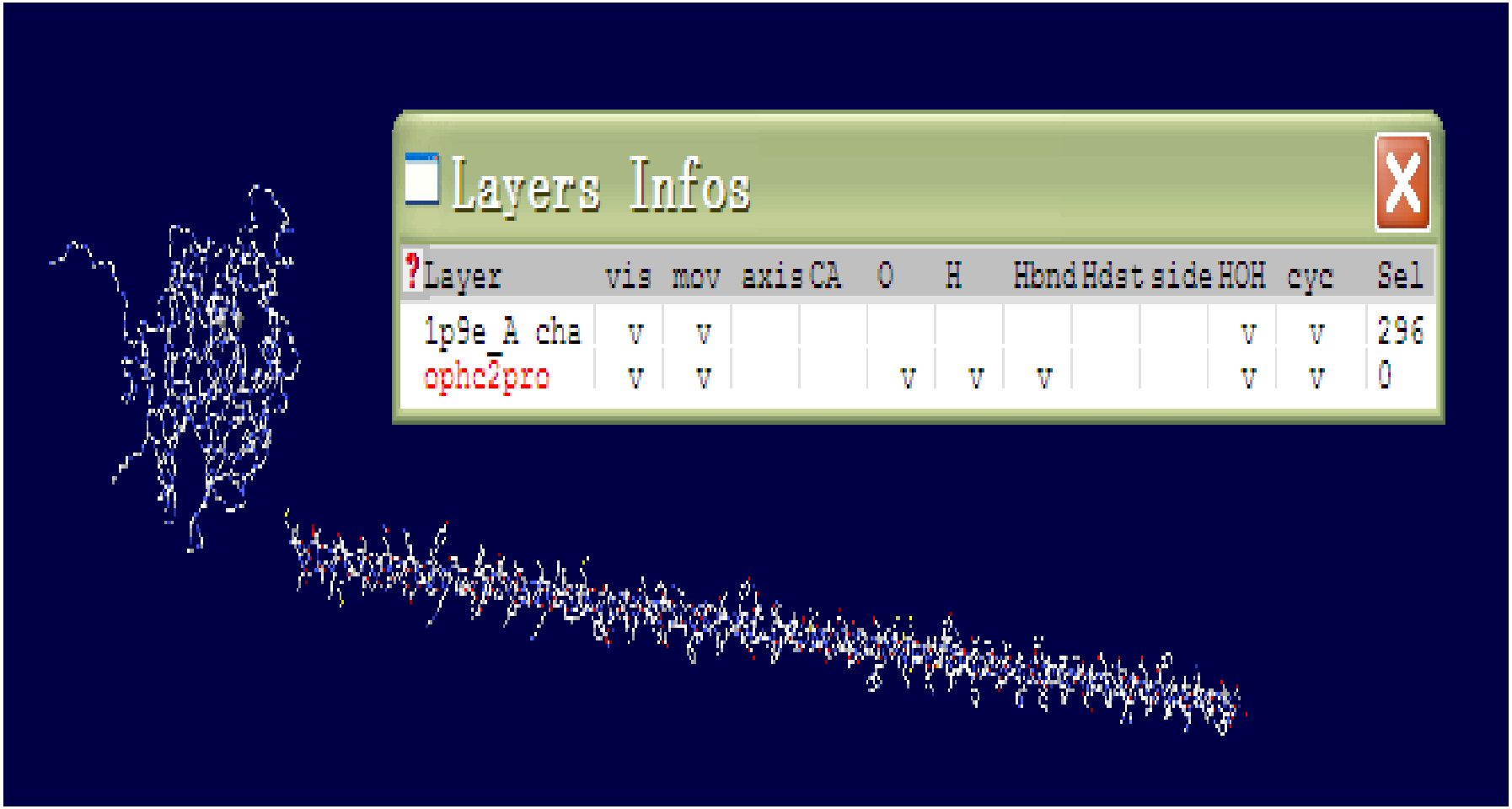

1P9EA 1 MPLKNRLLARLSCVAAVVAATAAVAPLTLVSTAHAAAP-QVRTSAPGYYR 49
ophc2 1 -------MRLFSLSTALSSAMIALVSLPL----QAAAPAQQKTQVPGYYR 39
1P9EA 50 MLLGDFEITALSDGTVALPV-------DKRLNQPAPKTQSALAKSF--QK 90
ophc2 40 MALGDFEVTALYDGYVDLPASLLKGIDDKDL-------QSLLARMFVASE 82
1P9EA 91 APLETSVTGYLVNTGSKLVLVDTGAAGLFGPTLGRLAANLKAAGYQPEQV 140
ophc2 83 KGVQTAVNAYLINTGDNLVLIDTGAAQCFGPTLGVVQTNLKASGYQPEQV 132
1P9EA 141 DEIYITHMHPDHVGGLMVGE-QLAFPNAVVRADQKEADFWLSQTNLDKAP 189
ophc2 133 DTVLLTHLHPDHACGLVNADGSPAYPNATVEVPQAEAEFWLDEATMAKAP 182
1P9EA 190 DDESKGFFKGAMASLNPYVKAGKFKPFSGNTDLVPGIKALASHGHTPGHT 239
ophc2 183 EG-MQGMFKMAQQAVAPYAKMNKLKPYKTEGELLPGVSLVASPGHTPGHT 231
1P9EA 240 TYVVESQGQKLALLGDLILVAAVQFDDPSVTTQLDSDSKSVAVERKKAFA 289
ophc2 232 SYLFKSGGQSLLVWGDILLNHAVQFAKPEVVFEFDVDSDQARQSRQRILA 281
1P9EA 290 DAAKGGYLIAASHLSFPGIGHIRAEGKGYRFVPVNYSVVNPK- 331
ophc2 282 EAATDKLWVAGAHLPFPGLGHVRKEAQGYAWVPVEFSPIRSDR 324

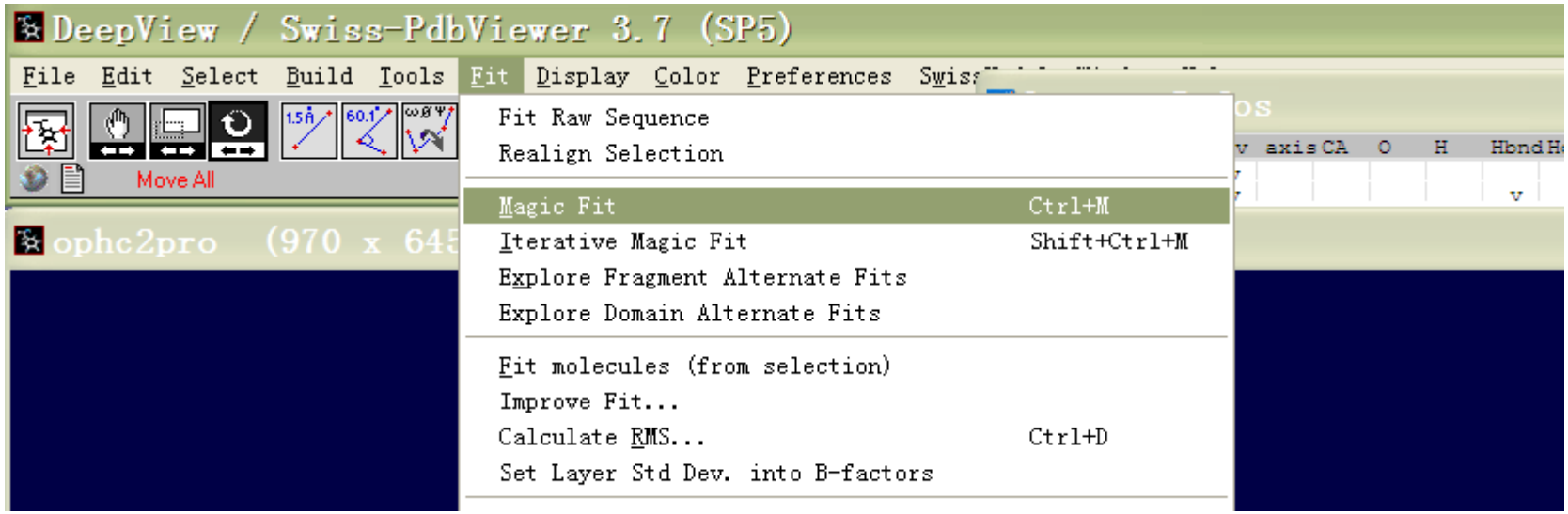
5. 预测OPHC2蛋白质的三维结构

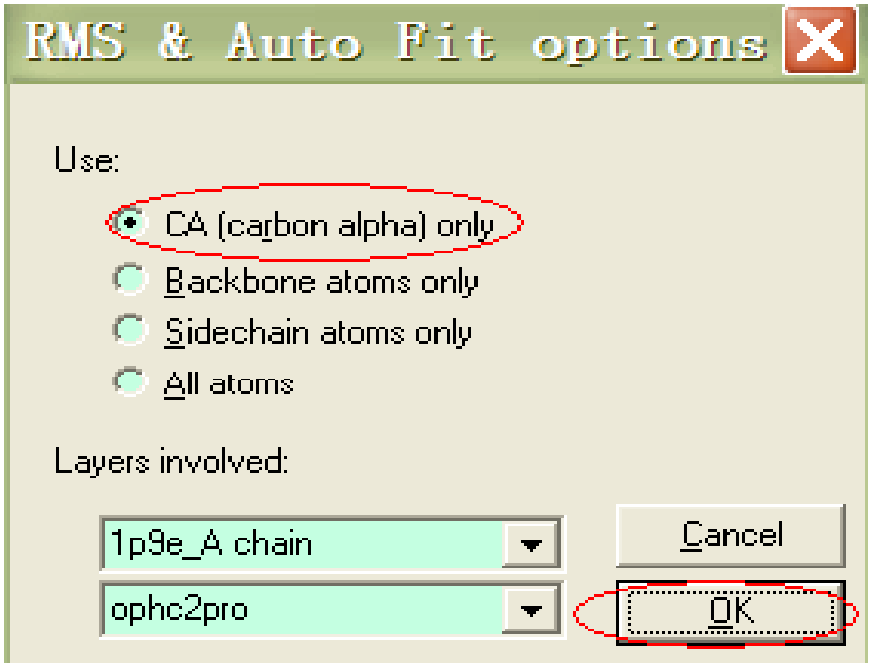
用SPDBV软件来构建OPHC2蛋白的模型

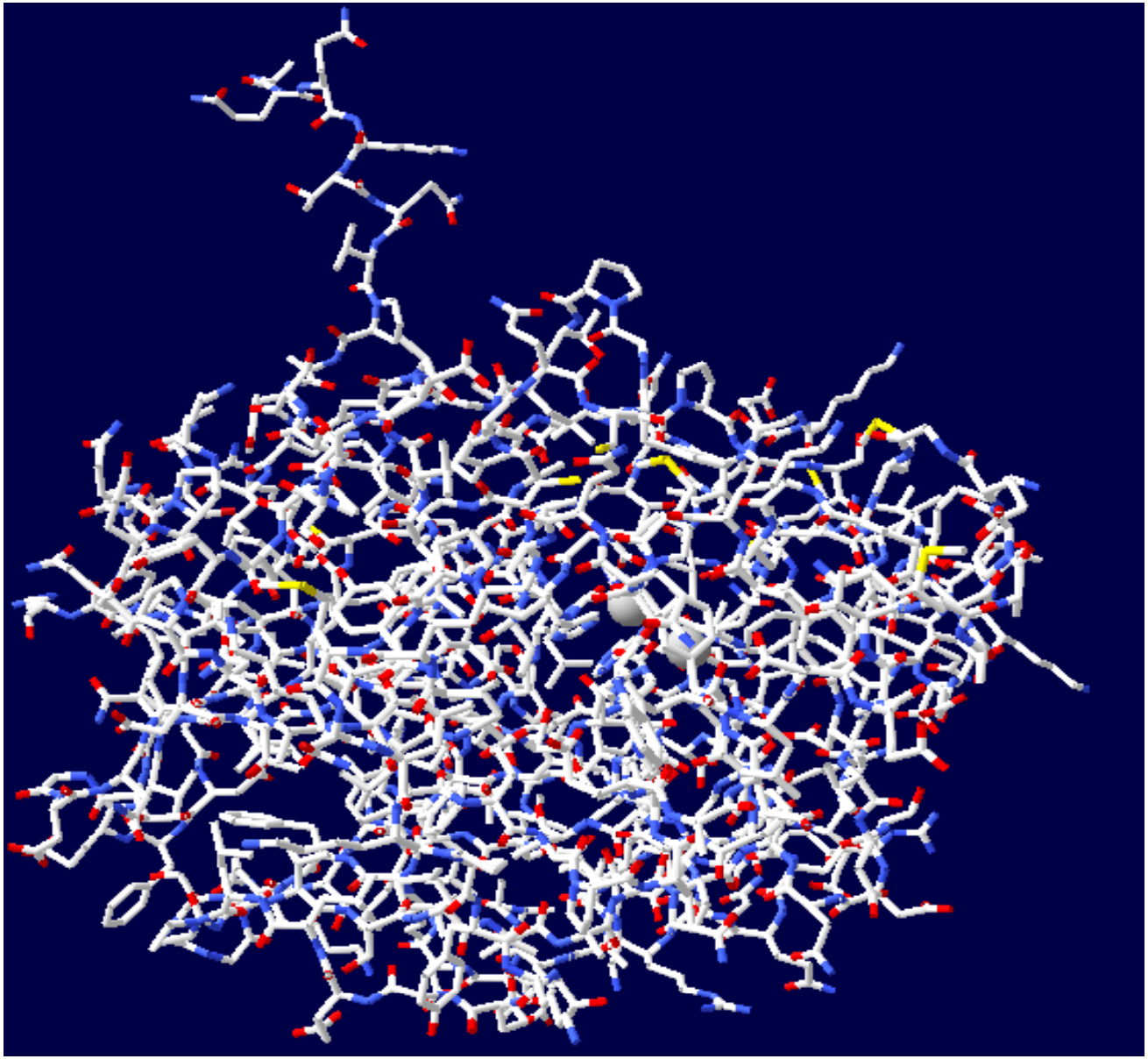
将OPHC2蛋白质的氨基酸序列添入Swiss-PdbViewer



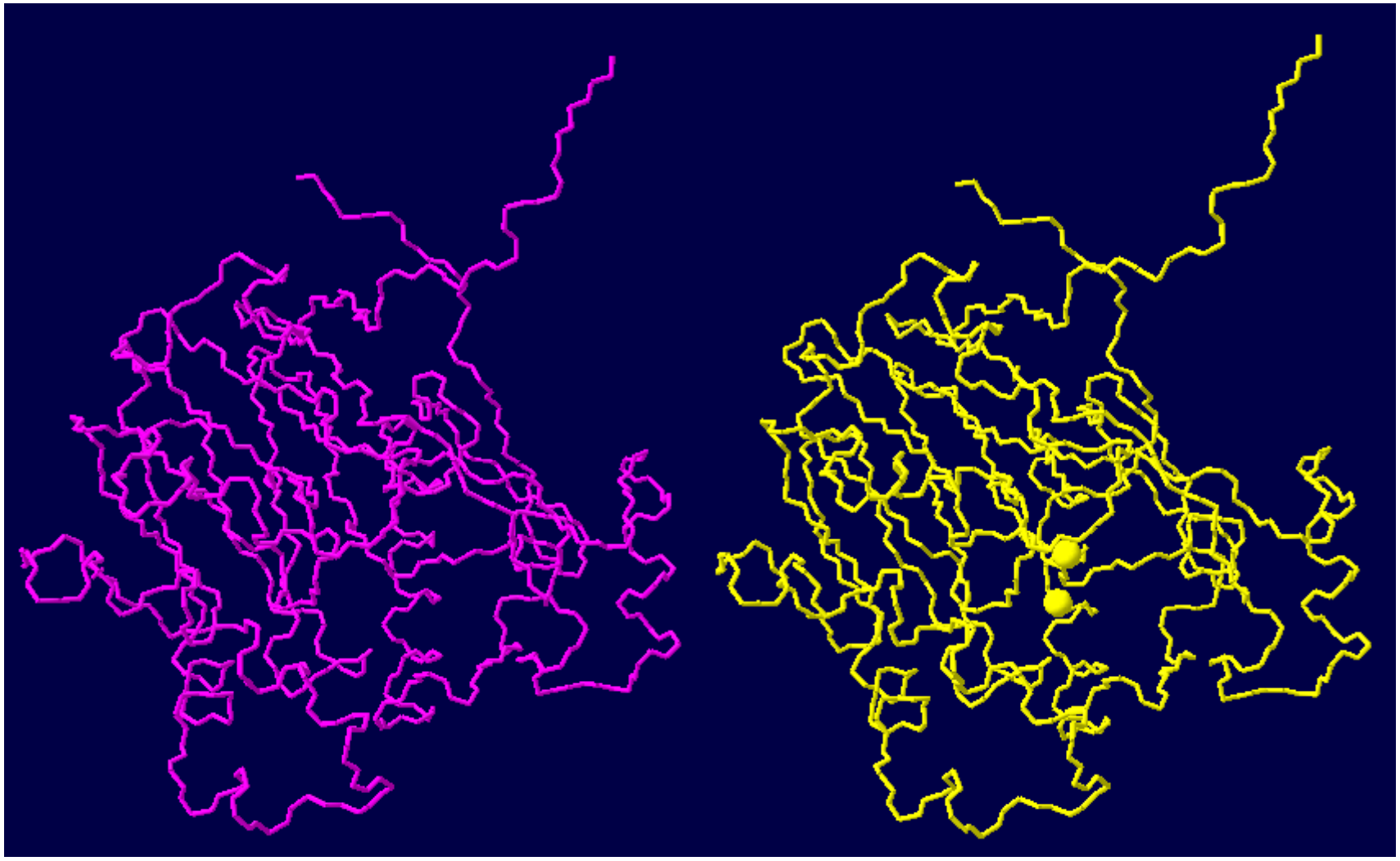

Layers Infos
Layer vis mov axis CA O H Hbnd Hdst side HOH cyc Sel
1p9e_A cha v v v v 296
ophc2pro v v v v v v 0

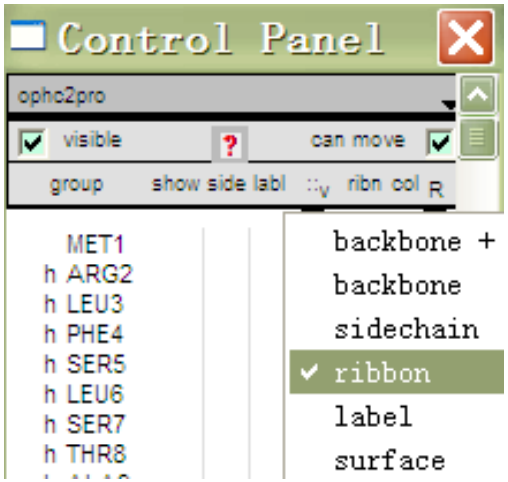

DeepView / Swiss-PdbViewer 3.7 (SP5)
File Edit Select Build Tools Fit Display Color Preferences
Move All
ophc2pro (970 x 645
Fit Raw Sequence
Realign Selection
Magic Fit Ctrl+M
Iterative Magic Fit Shift+Ctrl+M
Explore Fragment Alternate Fits
Explore Domain Alternate Fits
Fit molecules (from selection)
Improve Fit...
Calculate RMS... Ctrl+D
Set Layer Std Dev. into B-factors

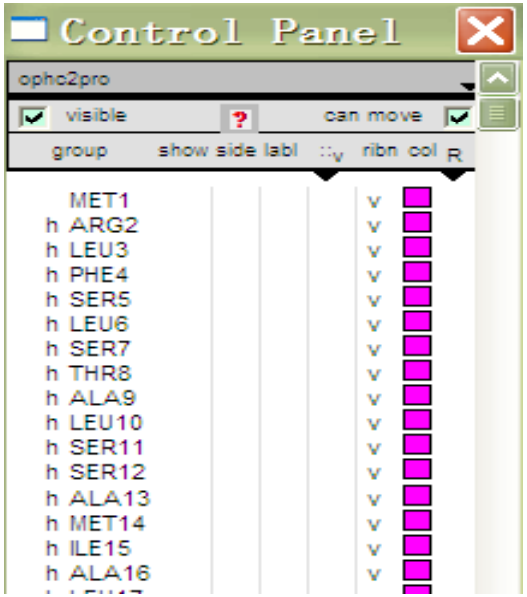

RMS & Auto Fit options
Use:
CA (carbon alpha) only
Backbone atoms only
Sidechain atoms only
All atoms
Layers involved:
1p9e_A chain
ophc2pro
Cancel
OK

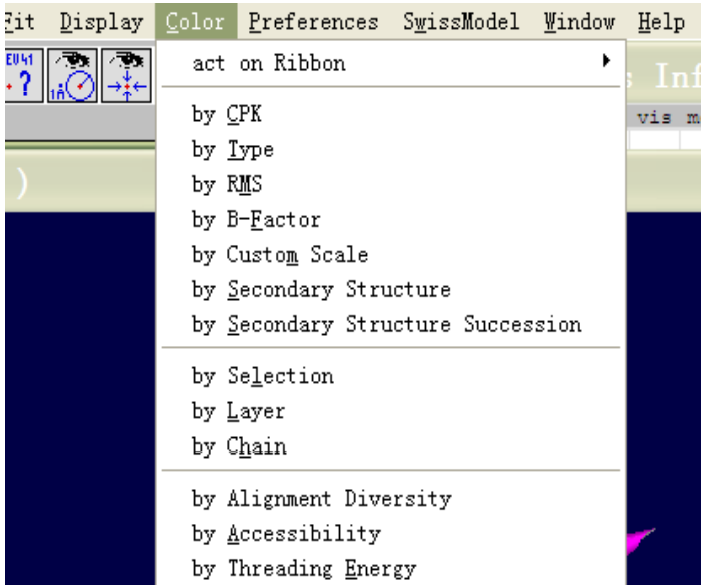


将1P9E蛋白（黄色）与预测的OPHC2蛋白用两种不同的颜色表示（紫色）。




Control Panel
opho2pro
visible
can move
group
show side labl
ribn col
MET1
h ARG2
h LEU3
h PHE4
h SER5
h LEU6
h SER7
h THR8
backbone +
backbone
sidechain
ribbon
label
surface

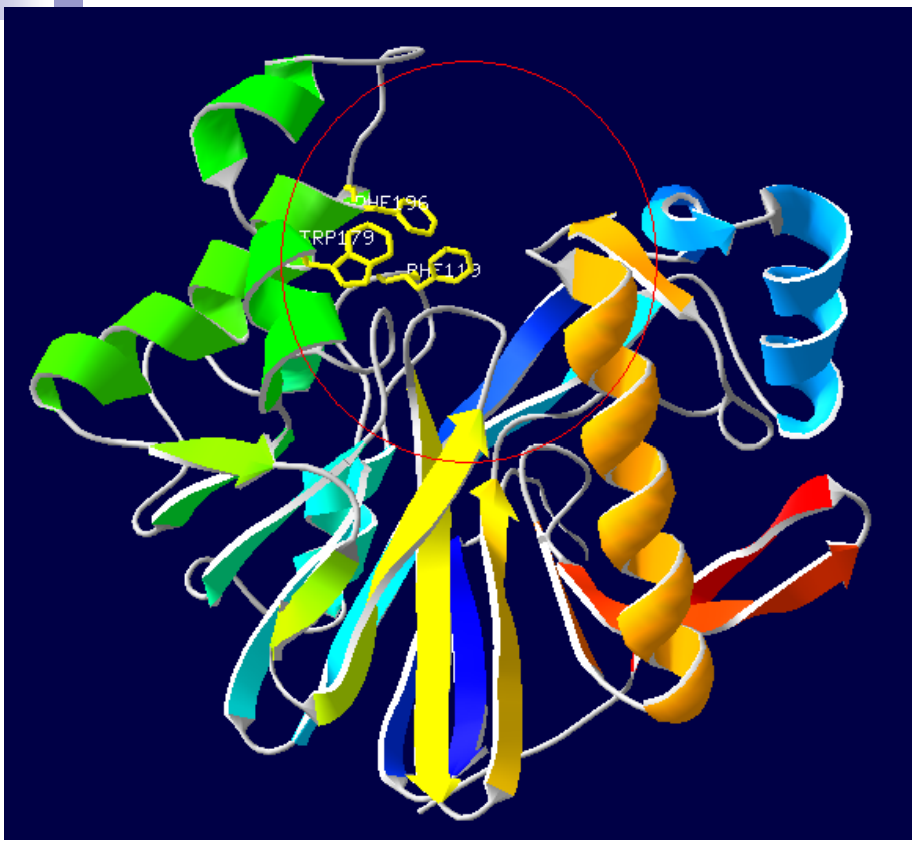

Control Panel
opho2pro
visible
can move
group
show side labl
ribn col
MET1
h ARG2
h LEU3
h PHE4
h SER5
h LEU6
h SER7
h THR8
h ALA9
h LEU10
h SER11
h SER12
h ALA13
h MET14
h ILE15
h ALA16


Fit
Display
Color
Preferences
SwissModel
Window
Help
act on Ribbon
by CPK
by Type
by RMS
by B-Factor
by Custom Scale
by Secondary Structure
by Secondary Structure Succession
by Selection
by Layer
by Chain
by Alignment Diversity
by Accessibility
by Threading Energy

6. 分析1P9E蛋白

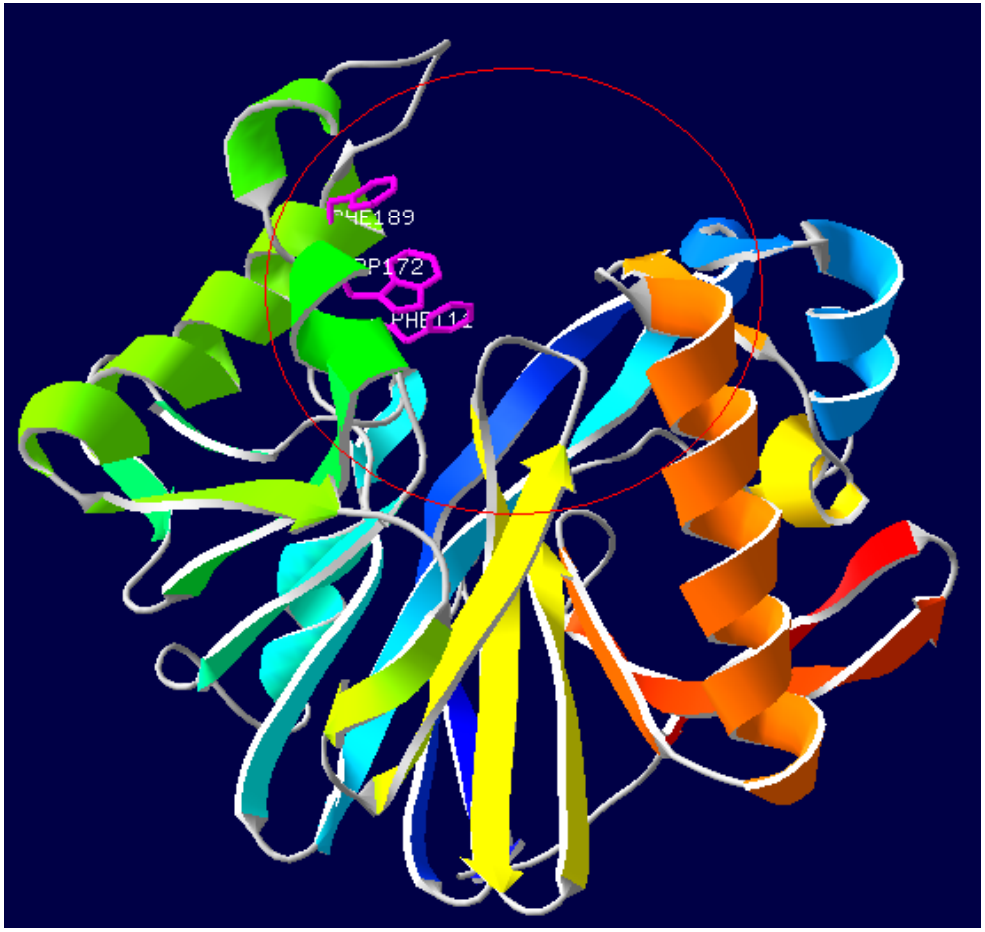
1）寻找特定的氨基酸:

- 找到Phe119, Trp179 和 Phe196三个氨基酸残基。
- 发现这三个氨基酸位于该酶的催化中心口袋的入口处。
- 通过序列比对发现OPHC2与1P9E的三个芳香族氨基酸相对应的分别为F111、W172、F189。

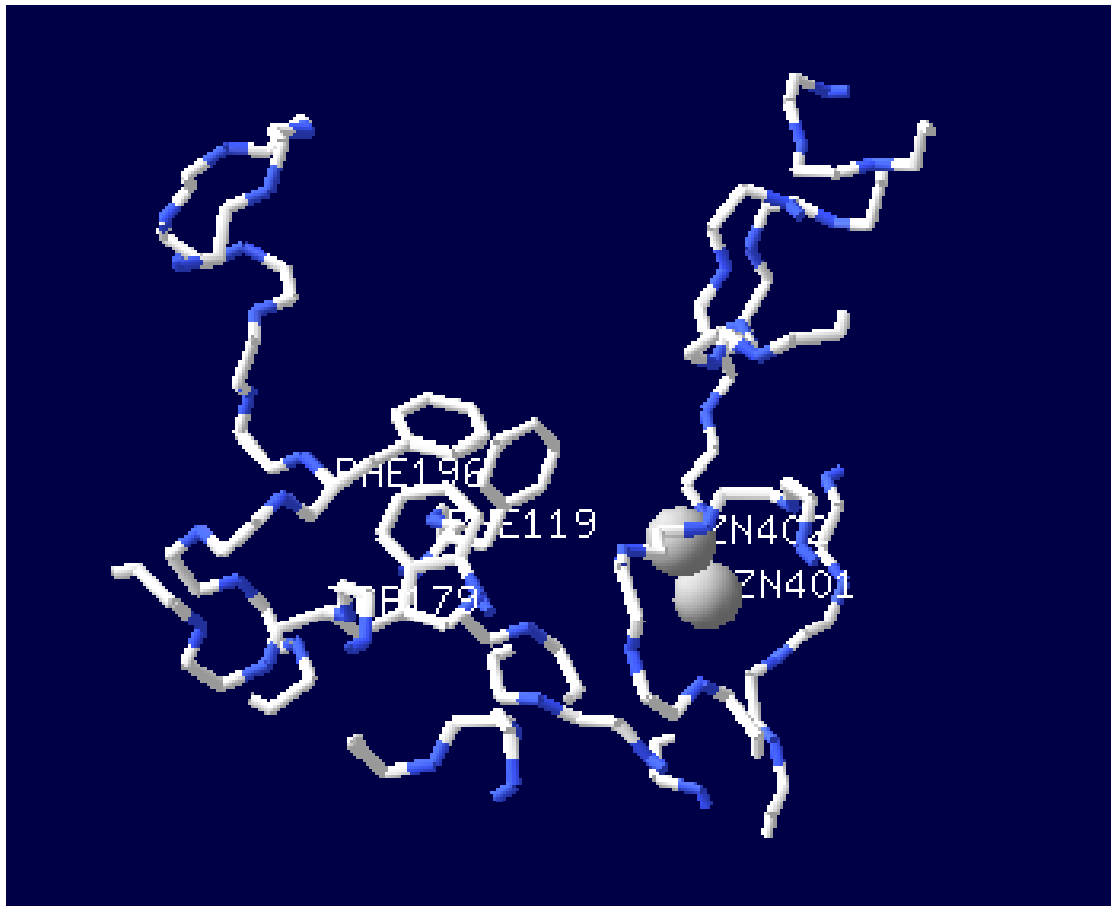


1P9E蛋白质(上图)

OPHC2蛋白质(下图)



2) 以F196的苯环上最靠近金属离子的一个原子为中心，得到距离中心原子15埃之内其它残基或原子



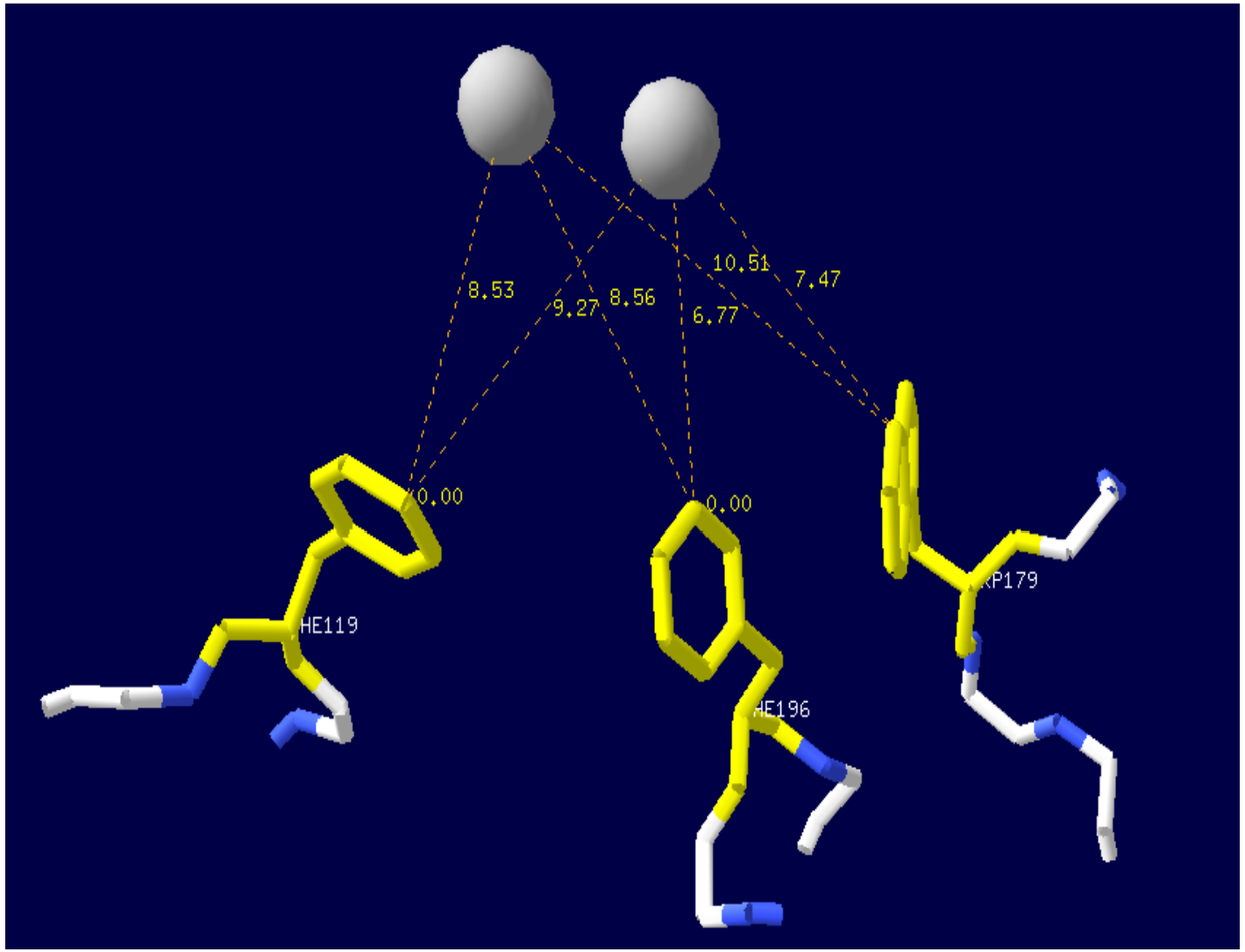
3）1P9E的三个氨基酸突变的结果

Table 2. Kinetic analysis of MPH and its mutants

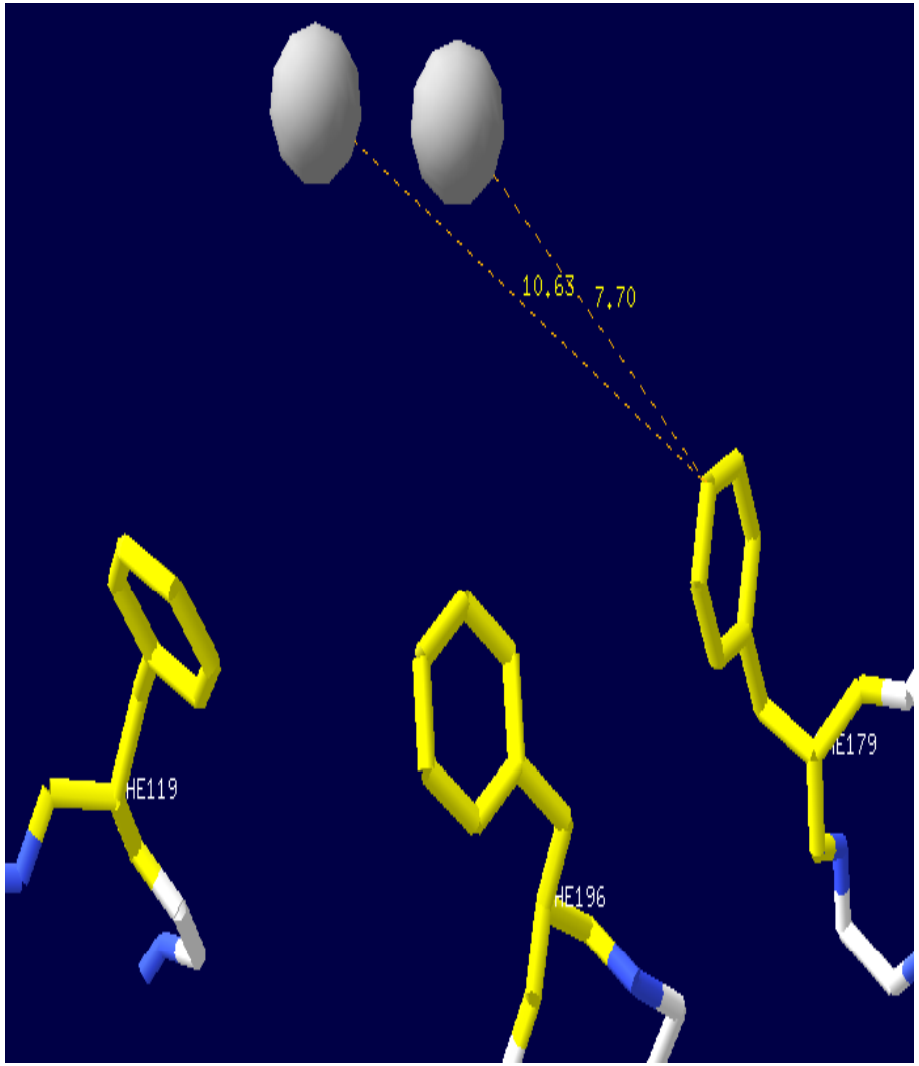
Type of MPH	Specific activity (units/mg)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\,\mu M^{-1}$)
Wild-type	50.5	37.4	37.1	0.992
W179F	34.5	48.4	30.6	0.632
W179A	8.4	74.6	7.9	0.106
F196W	64.0	50.0	52.8	1.056
F196A	4.8	107.4	5.0	0.047
F119W	29.2	28.2	20.8	0.734
F119A	32.0	41.1	23.8	0.578

4）六个突变体原子间的键长分析

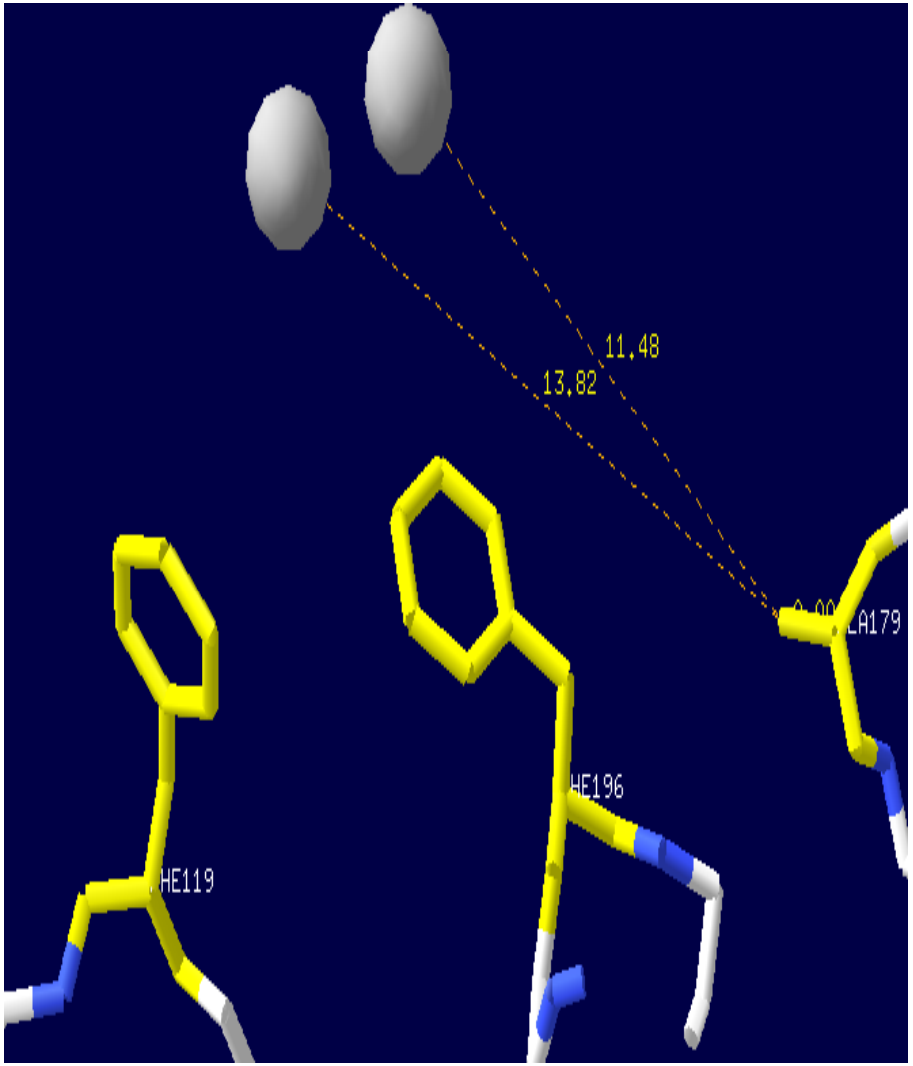
野生型:



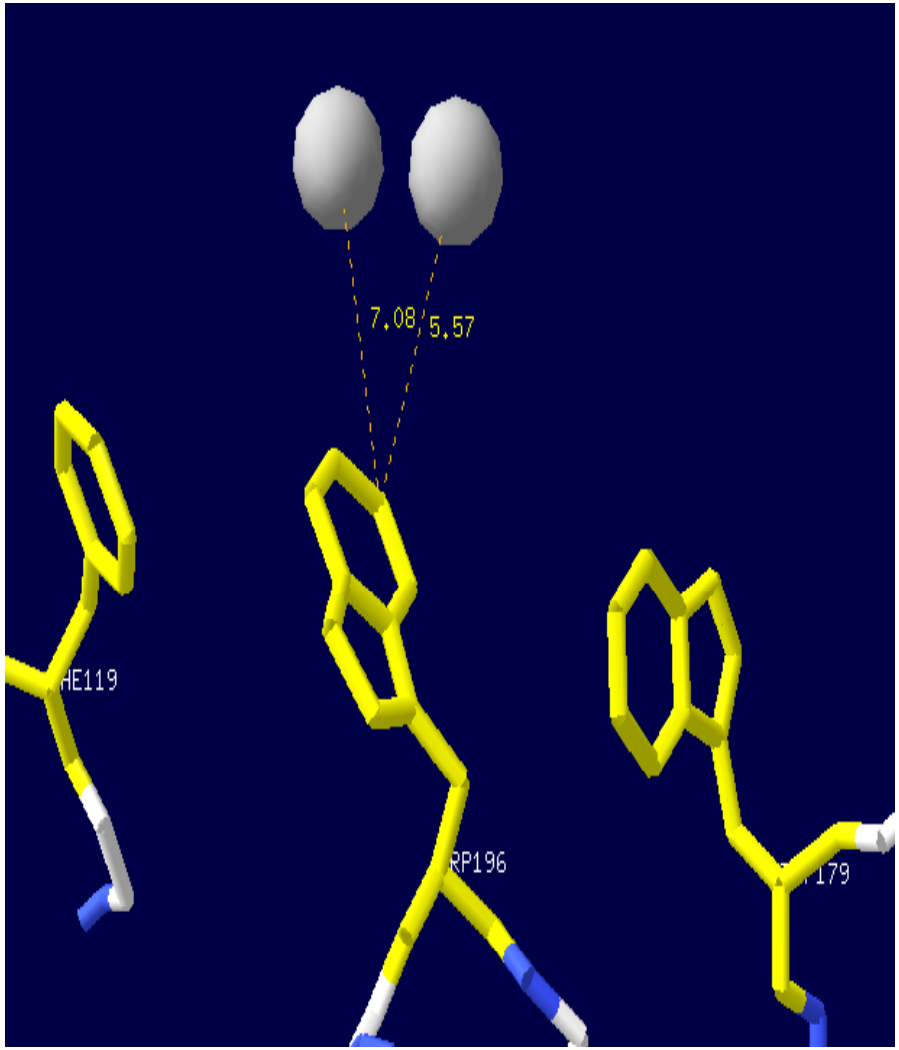
W179F



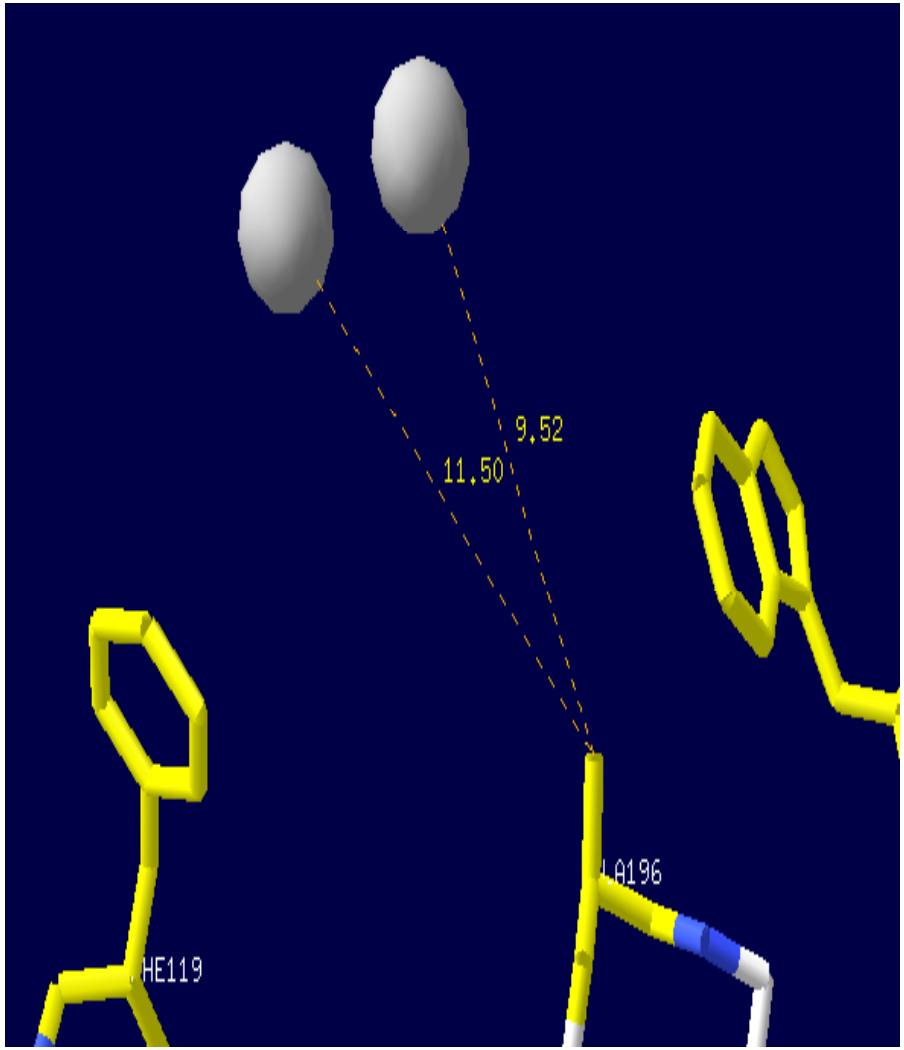
W179A



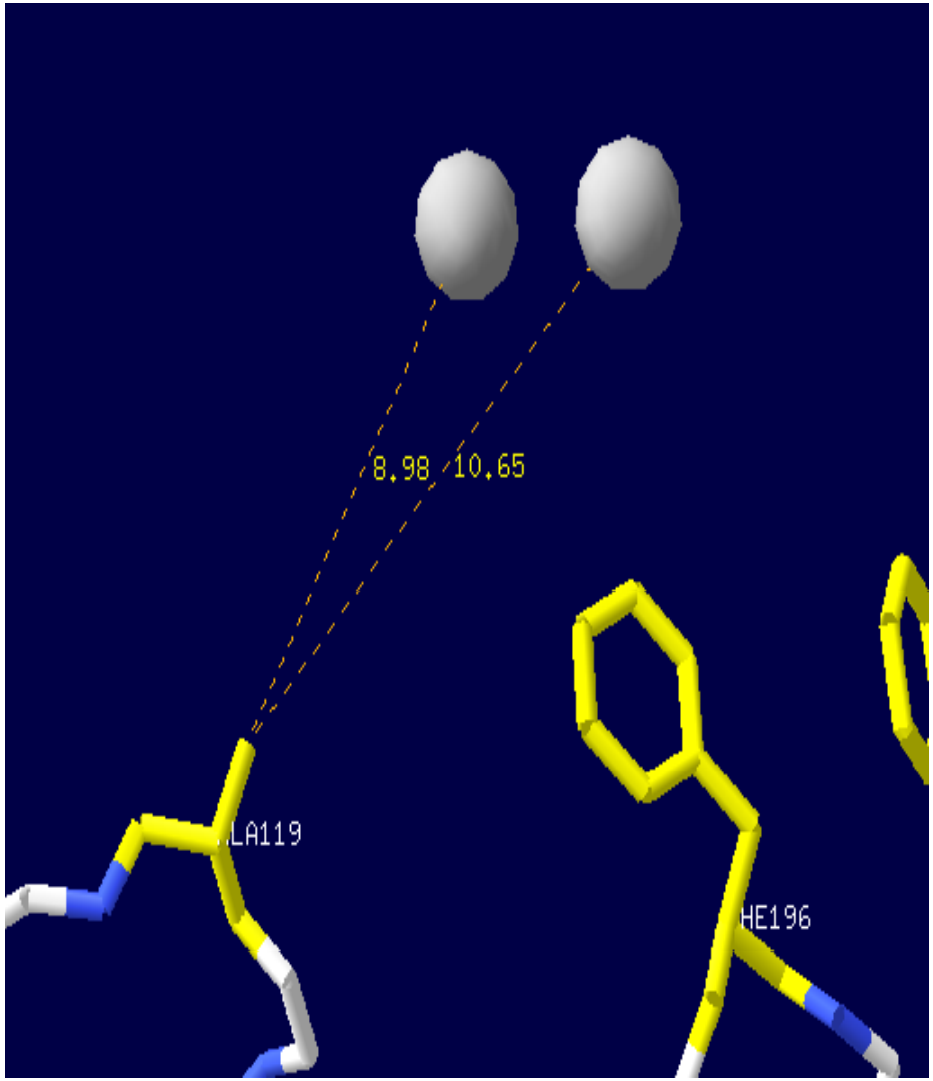
F196W



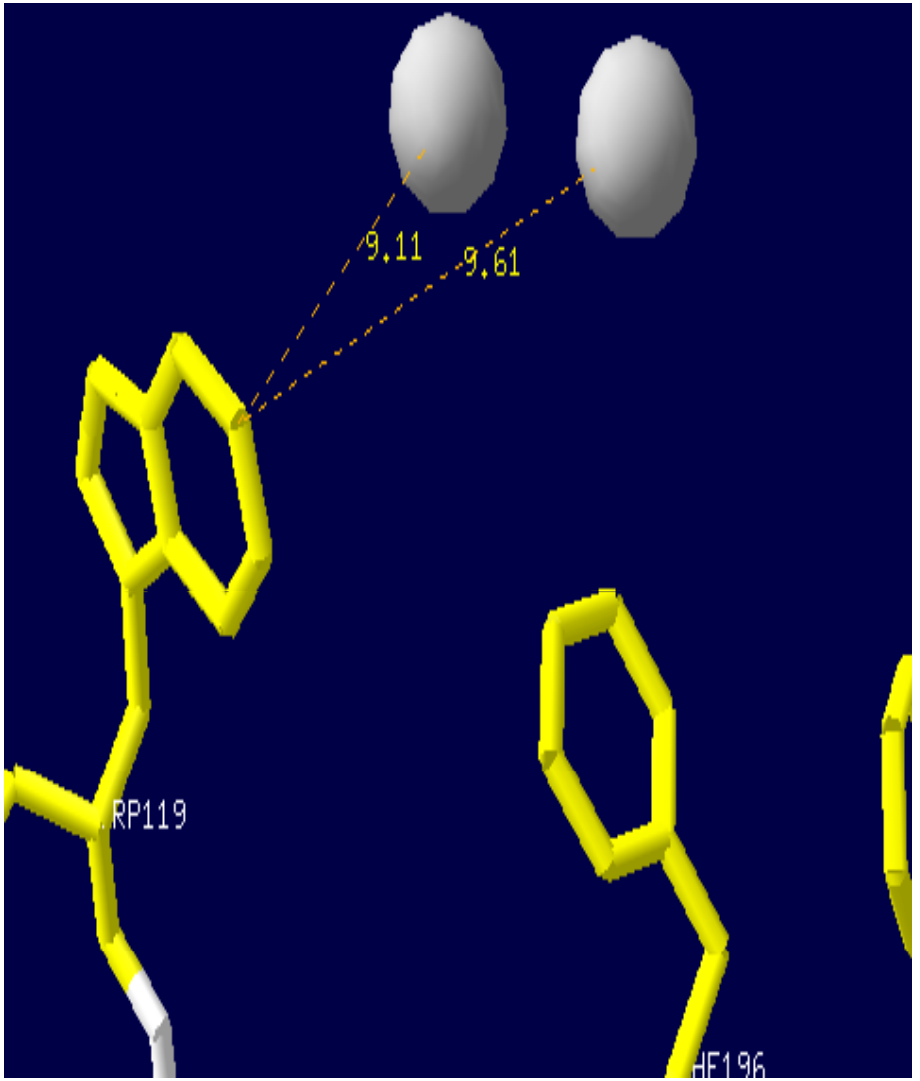
F196A



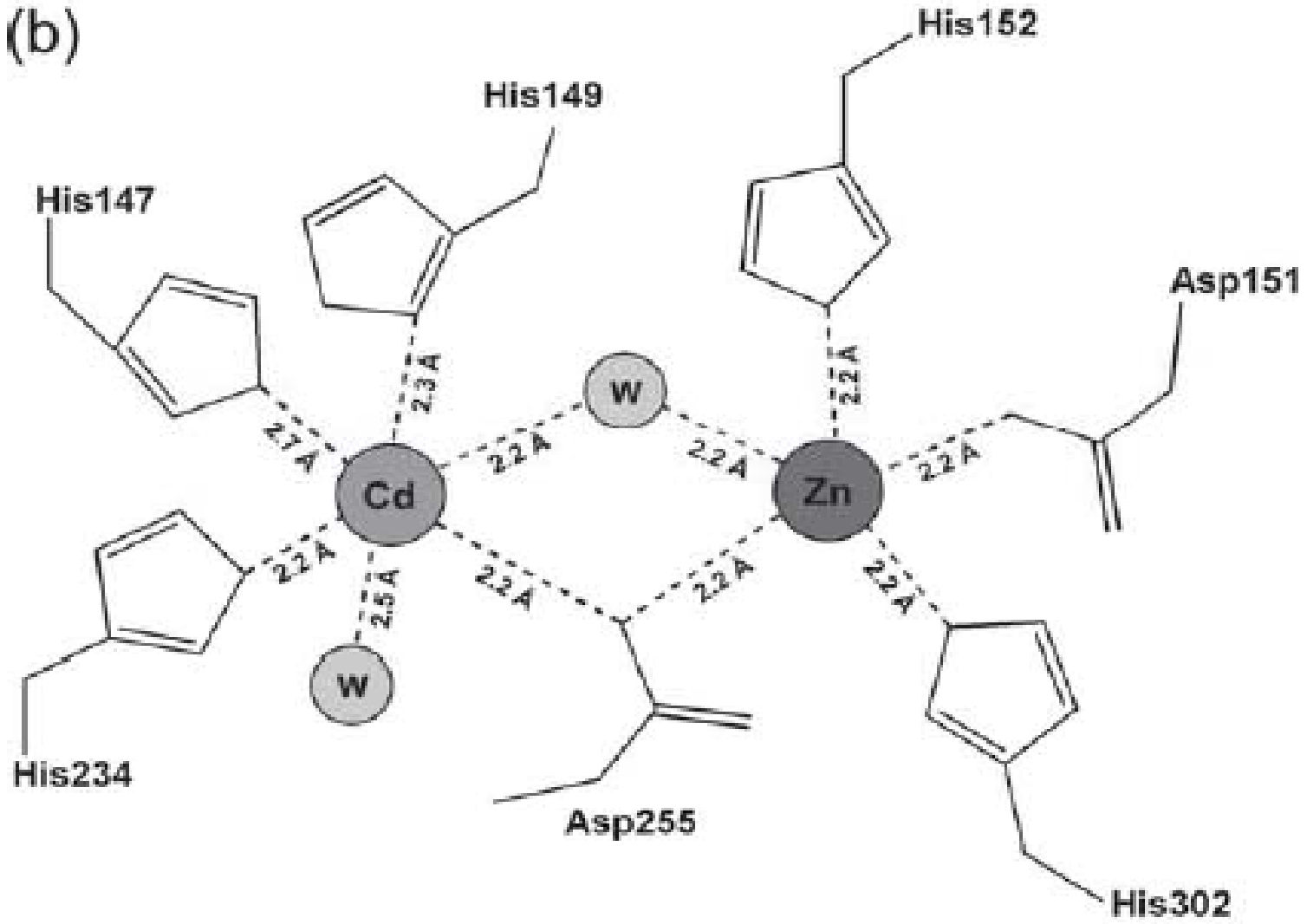
F119A



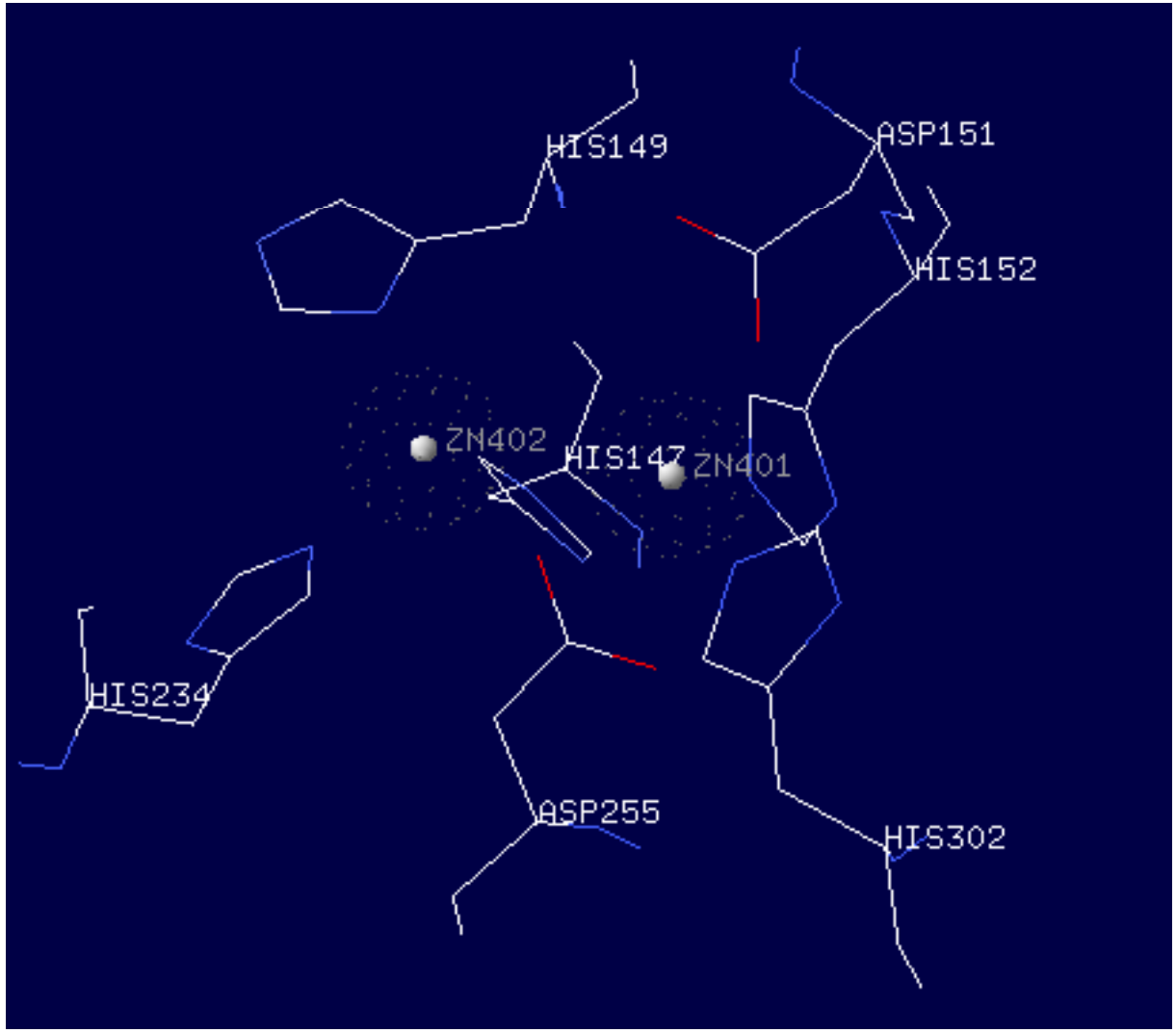
F119W



7. 金属离子附近的八面体结构。

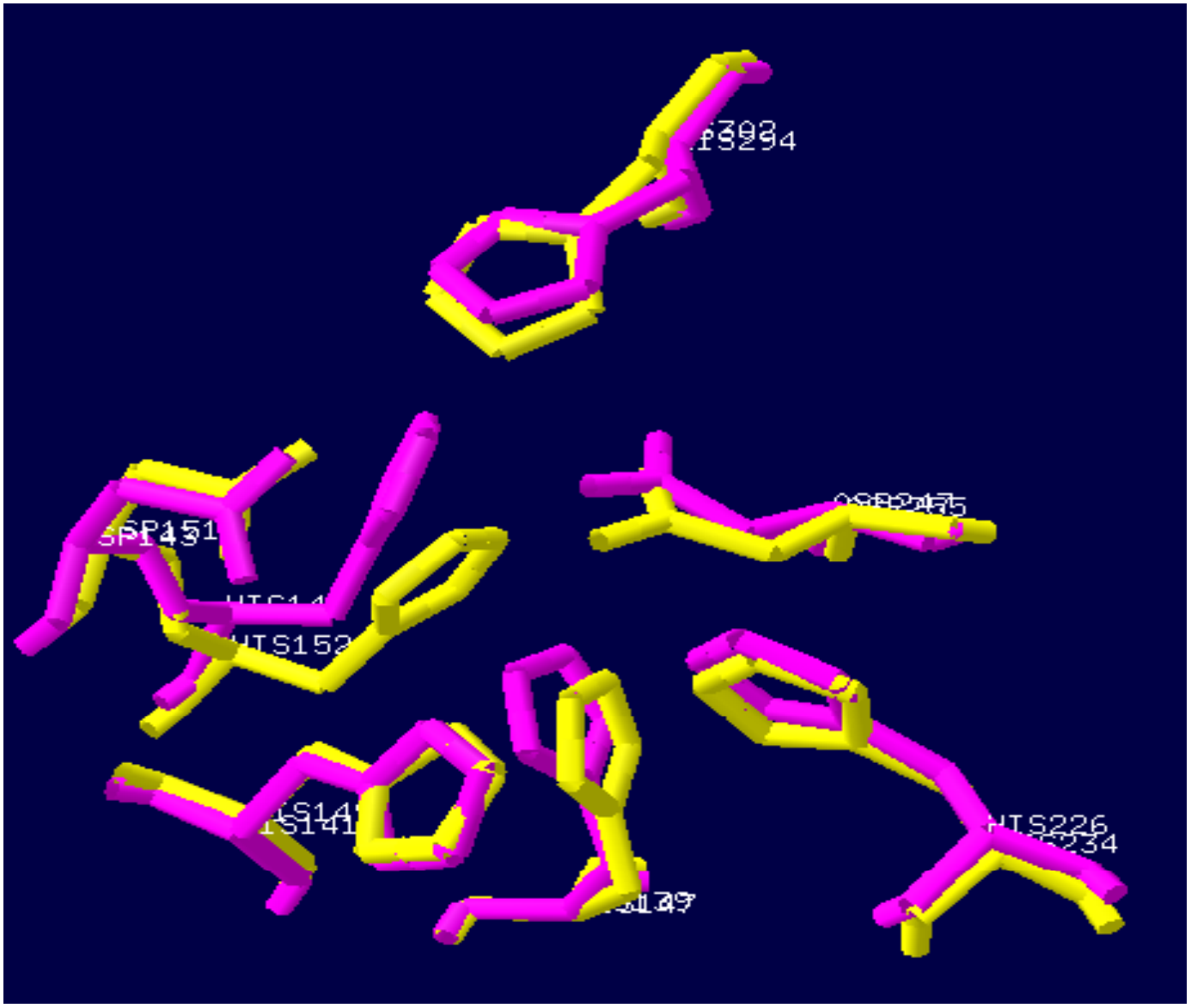


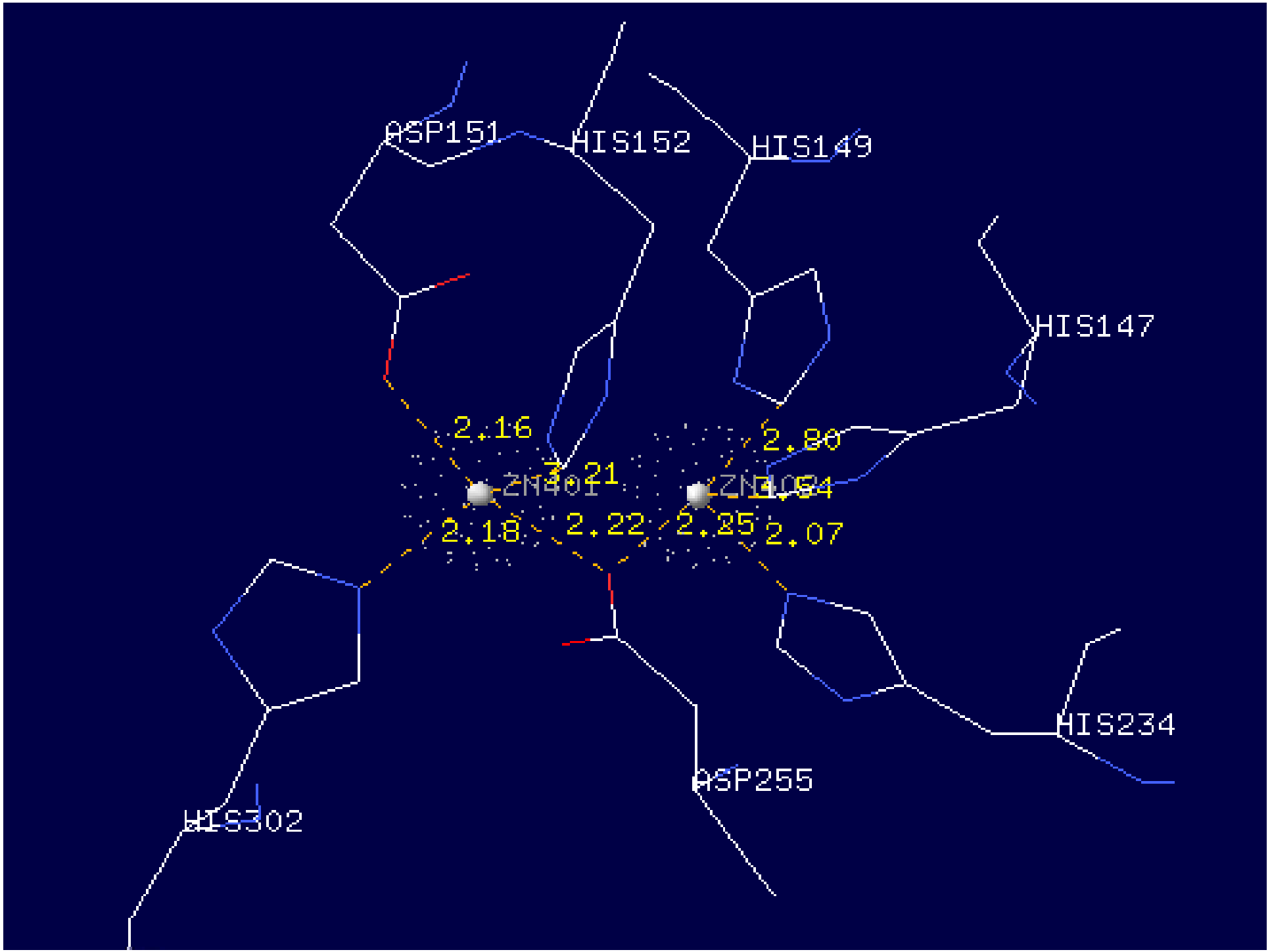
1）金属离子八面体结构中的七个氨基酸残基。



- His147
- His149
- Asp151
- His152
- His234
- Asp255
- His302

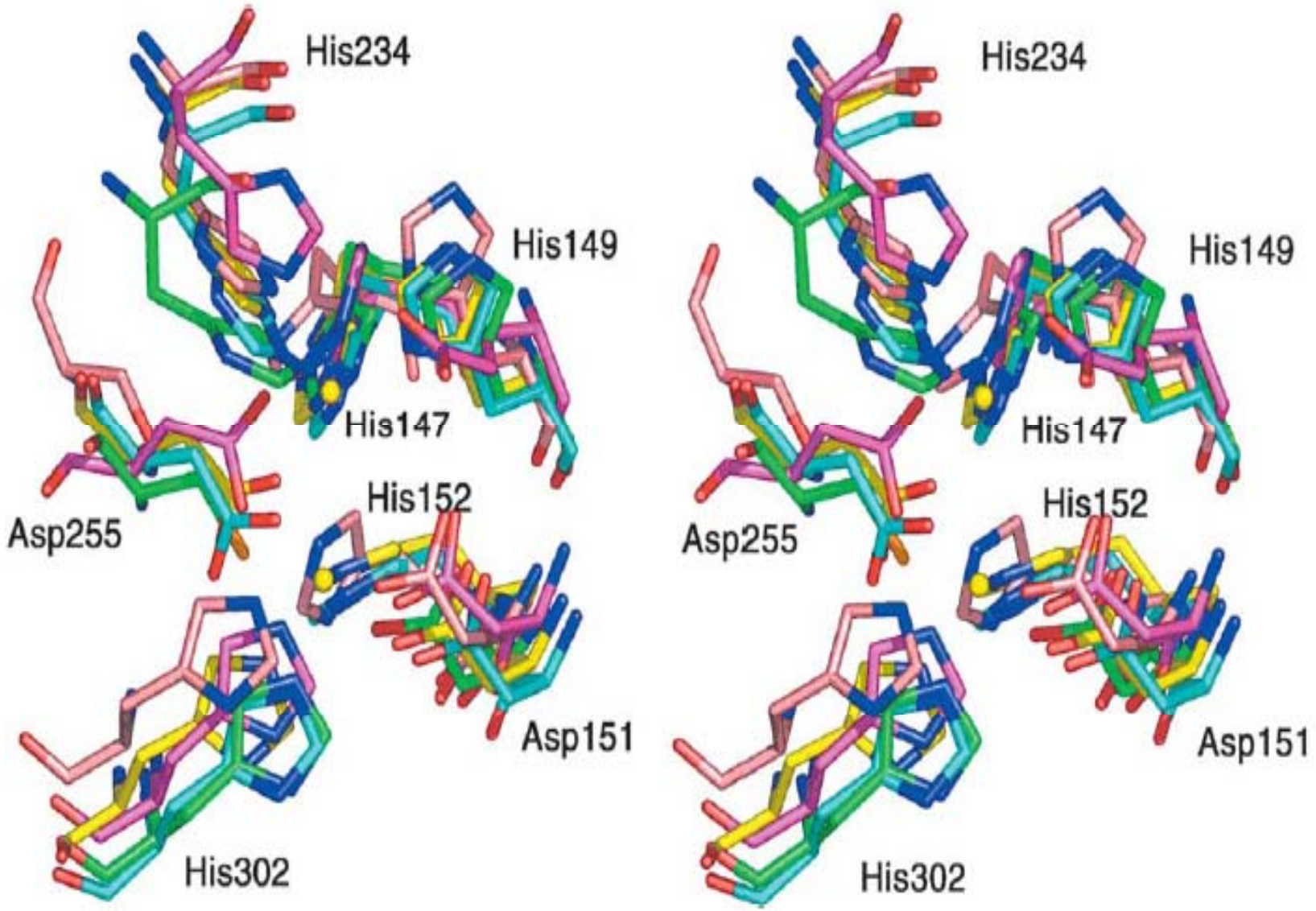
2）OPHC2蛋白上与之对应的七个氨基酸。




ASP151
HIS152
HIS149
HIS147
2.16
3.21
2.80
ZN401
ZN402
2.18
2.22
2.25
2.07
HIS234
ASP255
HIS302

3） 从PDB网页上分别下载1P9E的四个同源蛋白

- 它们分别是：1E5D，1A7T，1SML，1QH5。
- 找到它们与1P9E的His147 ，His149，Asp151， His152，His234，Asp255，His302相对应的氨基酸残基，对这五个蛋白均选中这七个氨基酸残基，再进行Fit。


His234
His149
His147
His152
Asp255
Asp151
His302
His234
His149
His147
His152
Asp255
Asp151
His302

四、结果

- 获得与OPHC2蛋白质同源的蛋白质1P9E及其立体结构。
- 成功的构建了OPHC2蛋白质的立体结构模型。
- OPHC2和1P9E的空间结构能够很好的重叠在一起。
- 由实验数据表2可知，突变体F196W的Kcat/Km值高于比野生型。而W179F，W179A，F196A，F119W，F119A五个突变体的Kcat/Km值均下降了。

- F196W突变体的色氨酸残基的侧链与两金属离子的间的距离缩短了，而其它五个突变体的残基与两金属离子的间的距离拉长。
- 1P9E金属离子附近的七个氨基酸残基，与OPHC2相应的七个氨基酸重叠的非常好。
- 1P9E的四个同源蛋白质，1E5D，1A7T，1SML，1QH5与1P9E的相应的七个氨基酸也重叠的非常好。判定这七个氨基酸是这一类蛋白质分子中非常保守的氨基酸。

五、讨论

- F119, W179 和 F196三个氨基酸对1P9E蛋白酶的底物与酶的亲和性有很重要的影响。
- 突变的氨基酸侧链与金属离子更接近时有可能提高该酶与底物结合的亲和性。
- 实验设计：将OPHC2蛋白质与1P9E蛋白相对应三个芳香族的点进行定点突变。

存在的问题:

- 1P9E的六个突变体，其每个氨基酸突变后所得的氨基酸侧链可以有多种构象。在上面三组突变体图只选择了它的一种构象，与实际的结果有所偏差。

解决方法:

- 可以设计底物类似物来与酶蛋白结合，再通过分析来确定突变体氨基酸的构象。

参考文献

- Crystal Structure of Methyl Parathion Hydrolase from Pseudomonas sp. WBC-3. J. Mol. Biol. (2005) 353, 655–663.

- Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in Pichia pastoris: purification and characterization.

  Protein Expr Purif. 2006 Sep;49(1):9-14.