

玉米黑粉菌 *cyp51* 基因结构分析与克隆表达

韩睿¹, 邓灵福¹, 黎晨¹, 张青叶², 张劼¹, 高强¹, 熊丽¹, 万坚², 刘德立^{1,2}

1 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

2 农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079

摘要: 通过生物信息学手段分析 *cyp51* 基因结构, 并根据 GenBank 登记的玉米黑粉菌 *cyp51* DNA 序列, 设计 *cyp51* 引物和两对分别截短不同跨膜区的突变体引物, 构建了多种重组表达质粒及突变体重组表达质粒。选用不同宿主菌包括 *Escherichia coli* BL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS 和 Rosetta(DE3) 诱导表达并优化条件。SDS-PAGE 分析结果表明: 只有突变体 pET32-YH-35 能够在 *E. coli* BL21(DE3) 中高效表达(30°C, 0.5 mmol/L IPTG 诱导)。通过与戊唑醇等 4 种商品化杀菌剂农药和 14 种 XF 系列农药先导化合物的紫外结合光谱分析表明: 重组蛋白具有生物学活性。其中一种 XF 系列化合物的结合常数接近商品化杀菌剂, 有可能开发为新的杀菌剂, 为设计开发新型高效抗真菌新药提供了理论依据。

关键词: 玉米黑粉菌, *cyp51*, 克隆表达, 结合常数

Analysis of Gene Structure, Cloning and Expression of *cyp51* from *Ustilago maydis*

Rui Han¹, Lingfu Deng¹, Chen Li¹, Qingye Zhang², Jie Zhang¹, Qiang Gao¹, Li Xiong¹, Jian Wan², and Deli Liu^{1,2}

1 College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

2 Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology (CCNU) of Ministry of Education, Wuhan 430079, China

Abstract: The *cyp51* primers and two pairs of mutant primers which removed different transmembrane region were designed based on *Ustilago maydis cyp51* gene structure analysis. The full *cyp51* DNA fragment as well as mutant *cyp51* genes were amplified and cloned by using the total DNA from *Ustilago maydis* as template, then subcloned into different expression vectors. The recombinant expression plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS and Rosetta (DE3) respectively. A series of experiments leads to the finding that only pET32-YH-35 could be highly expressed at the optimal condition of 30°C induced with 0.5 mmol/L IPTG. The expressed protein (CYP51) showed biological activity by spectra analysis of the protein binding to 4 standard fungicides and to 14 XF-synthetic fungicide compounds, and only one XF-synthetic fungicide compound (XF-113) was similar to standard fungicides in binding constant. This compound is promising to be a new effective antifungal drug. These results will facilitate the further study on the mechanism of pathogenic fungi CYP51 and pesticide molecules, and will provide a new idea for efficient design and development of new anti-fungal drugs.

Keywords: *Ustilago maydis*, *cyp51*, cloning and expression, binding constant

Received: March 6, 2008; **Accepted:** August 27, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30771429 and 20672041), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20060511002) and Construction Fund for "211" Project of the Ministry of Education of China.

Corresponding author: Deli Liu. Tel: +86-27-62424500; E-mail: deliliu2002@yahoo.com.cn

国家自然科学基金(Nos. 30771429, 20672041), 教育部博士点基金项目(No. 20060511002)和"211"重点学科建设项目资助。

细胞色素 P450 甾醇 14- α -脱甲基酶(P450_{14DM} 或 CYP51)是唯一发现普遍存在于高等植物、真菌、酵母和哺乳动物体内的细胞色素 P450 单加氧酶家族成员^[1]。它是真菌细胞膜甾醇生物合成过程中的一个关键酶,该酶的缺乏将导致膜结构的破坏和功能的丧失,最终导致真菌死亡。目前农业上大约三分之一的杀真菌剂为 CYP51 抑制剂(14- α demethylation inhibitors, DMIs)^[2]。DMIs 通过抑制真菌细胞 CYP51 酶的活性,导致甾醇 14 α 位去甲基化反应受阻,甾醇合成减少或被完全阻断,影响真菌细胞膜的流动性,改变膜上许多酶的活性,从而抑制细胞的生长和增殖,发挥抗真菌作用。然而,随着这类杀真菌剂的广泛使用,有关病菌对此类杀真菌剂产生抗药性的报道逐渐增加。因此,设计研发新型高效杀真菌剂农药显得非常重要。

玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)是引起玉米黑粉病的主要病原菌,发生危害较为普遍,果穗发病直接造成农作物整穗无粒。由于病菌直接危害果穗,其发病率基本上等同于损失率,一旦发病,即可造成严重减产,给农业生产和人们生活造成巨大危害。有关报道指出,玉米黑粉菌是研究丝状真菌抗药性机制的重要模式生物之一^[3]。本研究从玉米黑粉菌中克隆了 DMIs 类杀菌剂的靶标酶 CYP51 基因,并在 *E. coli* 中高效表达。基于序列同源性和性质相似性,建立了玉米黑粉菌 CYP51 突变体三维空间结构模型,并利用商品化杀菌剂和 XF 系列合成化合物研究了与突变体蛋白的紫外结合光谱。比较其结合光谱和结合能力,合成的先导杀菌剂化合物具有与商品化杀菌剂相似的效果,有开发为新型杀菌剂农药的潜力。为进一步阐明杀菌剂的作用机理、研发和筛选新型高效抗真菌新药奠定了良好基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒

玉米黑粉菌(*U. maydis*)购自中国微生物菌种保藏中心,大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS、Rosetta(DE3) 及质粒 pET-28a、pET-32a、pGEX-KG 均为本实验室保存;质粒 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 酶类与主要试剂

RNase、限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司。商品化杀菌剂农药和农药先导化合物由华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室提供,纯度 95%以上,用 DMSO 配置成母液,4 $^{\circ}$ C 保存备用。其它化学试剂购自武汉亦新生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

根据 GenBank 中玉米黑粉菌 *cyp51* DNA 序列 (Accession No. Z48164) 设计引物, Pf: 5'-GGGTTACCATGGTGGCCTCCTCGTCTTC-3', Pr: 5'-CGGAATTCCTAGTCGAGGTGGAGGGATTTCG-3', 正向和反向引物分别包含 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切位点(下划线标出)。根据 *cyp51* 序列分别设计两对突变体引物,一对前端截短 60 个核苷酸(编码 20 个氨基酸), Pf-20: 5'-CGAATTCATGCTCGCCGATTCTTCGGC-3', Pr-20: 5'-CAAGCTTATTAGTCGAGGTGGAGGGATTTC-3'; 另一对前端截断 105 个核苷酸(编码 35 个氨基酸), Pf-35: 5'-GGAATTCATGTTGCTTCCATTGCTCGCG-3'; Pr-35: 5'-CAAGCTTATTAGTCGAGGTGGAGGGATTTC-3'。两对突变体正向引物均添加 *Eco*R I 酶切位点,反向引物均添加 *Hind* III 酶切位点(下划线标出)。引物由上海基康公司合成。

1.2.2 玉米黑粉菌 *cyp51* 基因克隆

玉米黑粉菌基因组 DNA 提取方法参照文献[4]。以玉米黑粉菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *cyp51* 基因及其突变体基因。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物回收纯化后分别连接到 pMD18-T 载体上,酶切鉴定后由上海英俊公司测序。

1.2.3 玉米黑粉菌 CYP51 的生物信息学分析

根据 *cyp51* 在 GenBank 公布的全序列对其二级结构进行在线预测 (<http://www.expasy.ch/tools/>)^[5], 并对其跨膜区进行了预测分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)^[6,7]。根据已知的肺结核分枝杆菌晶体结构进行了同源建模^[8]。

1.2.4 重组表达质粒和突变体的构建

将克隆的玉米黑粉菌 *cyp51* 基因亚克隆到 pET-28a, 构建重组表达质粒 pET28-YH 并转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆。以同样的方法构建了重组表达质粒 pET32-YH、pGEXKG-YH 和突变体重组

表达质粒 pET28-YH-20、pGEXK-G-YH-20、pET32-YH-20、pET28-YH-35、pGEXK-G-YH-35 和 pET32-YH-35, 并筛选阳性克隆。

1.2.5 基因表达及条件优化

将各种重组质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3), 37°C 以 1.0 mmol/L IPTG 诱导 6 h, 分别取样并进行 SDS-PAGE 分析。通过改变 IPTG 浓度(0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L)和诱导温度(37°C、30°C、20°C), 并采用不同的表达宿主菌(BL21 (DE3) pLysS、Rosseta (DE3))对玉米黑粉菌 *cyp51* 进行诱导表达, 4000 r/min 离心集菌, SDS-PAGE 分析。

1.2.6 重组蛋白的活性测定

重组蛋白含量测定参照 Omura 和 Sato 测定细胞色素 P450 的分光光度法进行^[9]。采用终浓度为 0.25 mg/mL CYP51 重组蛋白在 350~500 nm 之间扫描基线, 分别加入 0.1~20 μmol/L 不同浓度的 4 种商品化杀菌剂农药, 紫外-可见分光光度计 S-3100 测定反应 2 min 时的吸收光谱。根据吸收光谱分析波峰和波谷间的差值, 通过 Hanes-Woolf 作图法计算结合常数^[10]。采用与商品化杀菌剂相同的方法比较了 CYP51 重组蛋白同 XF 系列的 14 种合成小分子化合物的结合关系。

2 结果与分析

2.1 玉米黑粉菌 *cyp51* 基因的克隆

以玉米黑粉菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增长度约为 1700 bp 的 *cyp51* 基因(图 1A)及 1600 bp 的 *cyp51* 突变体基因(*cyp51*YH-20 和 *cyp51*YH-35, 图 1B), 回收片段后分别插入 pMD18-T, 测序得知其大小分别为 1686 bp、1626 bp 和 1581 bp, 与玉米黑粉菌 *cyp51* 基因及突变体基因 *cyp51*YH-20 和 *cyp51*YH-35 预期大小相一致, 表明重组质粒构建成功。

2.2 玉米黑粉菌 CYP51 的生物信息学分析预测

对玉米黑粉菌 CYP51 蛋白序列进行了跨膜结构预测, 结果表明 N 端呈两次跨膜(图 2A)。选择性地截短核苷酸(编码 N 端跨膜区相应的氨基酸)并进行跨膜结构预测: 当截短 20 个氨基酸时, N 端有一次跨膜(图 2B); 当截短 35 个氨基酸时, N 端没有跨膜区(图 2C)。从而得到两个玉米黑粉菌 CYP51 的突变体。

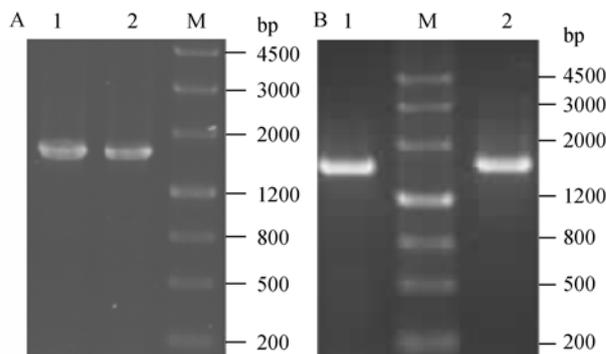


图 1 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products (A) PCR products of *U. maydis cyp51*; M: DNA marker III; 1,2: PCR products; (B) PCR products of *U. maydis cyp51* mutant gene; 1: *cyp51* YH-20; 2: *cyp51*-YH-35; M: DNA marker III

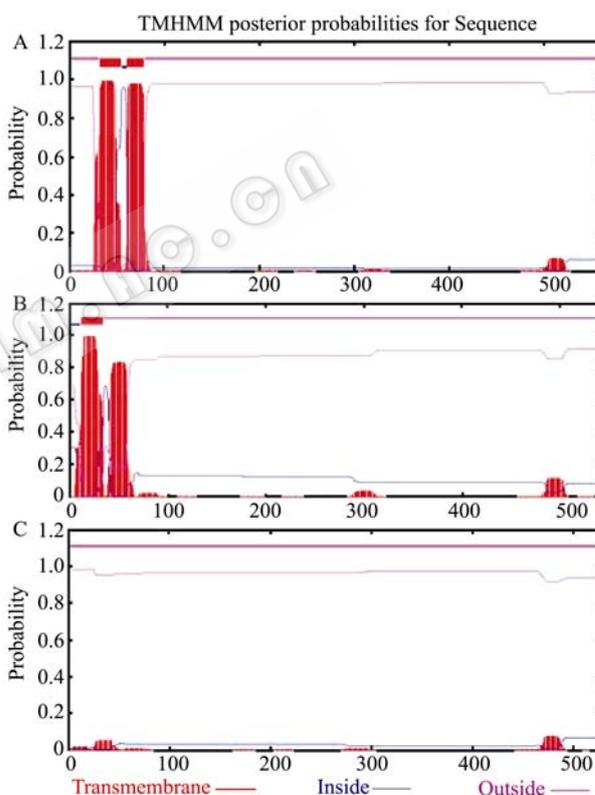


图 2 玉米黑粉菌 CYP51 跨膜区分析

Fig. 2 Transmembrane region analysis of *U. maydis* CYP51 (A) the whole sequence of CYP51; (B) transmembrane region analysis of truncating N-terminal 20 amino acids; (C) transmembrane region analysis of truncating N-terminal 35 amino acids

至今玉米黑粉菌 CYP51 晶体结构还没有报道, 采用生物信息学分析的方法对其进行了结构预测。以 1e9x.pdb 晶体结构为模板, 模建出玉米黑粉菌 CYP51 三维空间结构模型(图 3A)。玉米黑粉菌

CYP51 全长序列与 1e9x 叠合的结果表明, 玉米黑粉菌 CYP51 同模板之间在整体结构上具有很高的相似度(图 3B)。根据这个预测结果可以推断全长序列和突变体之间在空间结构上没有明显变化。玉米黑粉菌 CYP51 全长序列和突变体之间在外部空间结构上存在一些差异, 但三维空间结构中酶活性中心的血红素位点几乎重合(图 3C), 所以初步推断突变体蛋白与全序列蛋白在酶活性方面基本保持相同。

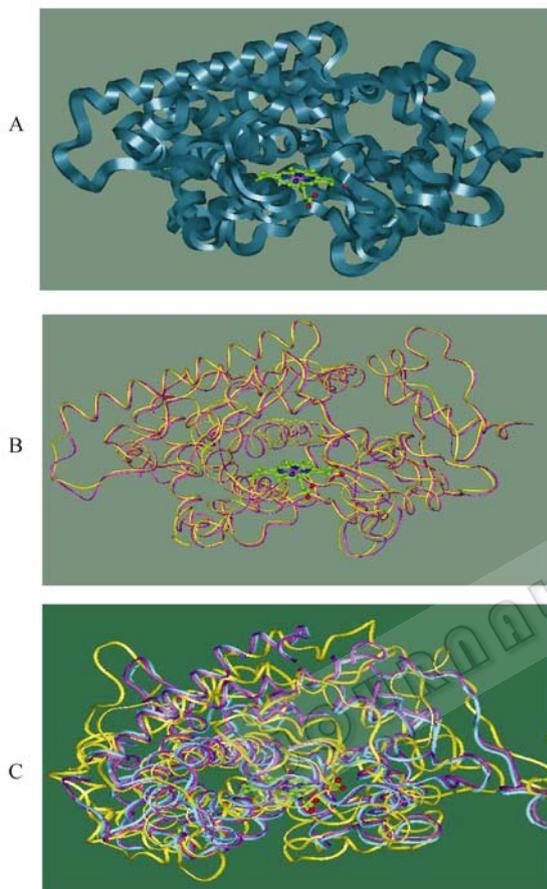


图 3 同源建模分析

Fig. 3 Homology modeling analysis

(A) 3D model of CYP51; (B) superposition of the model of CYP51 (purple) and the template (yellow); (C) superposition of the model of CYP51 (yellow) and the mutants (CYP51-20 mutant blue; CYP51-35 mutant purple)

2.3 构建重组表达质粒和突变体表达载体

以 *Hind* III/*Sac* I 酶切重组质粒 pMD-YH, 将玉米黑粉菌 *cyp51* 基因分别亚克隆至 pET-28a、pET-32a 和 pGEX-KG 中, 成功构建了重组表达质粒 pET28-YH、pET32-YH 和 pGEXKG-YH。以 *Eco*R I/*Hind* III 酶切 pMD-YH-20、pMD-YH-35, 回收 *cyp51* 基因突变体分别亚克隆到 pET-32a、pET-28a 和 pGEX-

KG 中, 成功构建了重组表达质粒 pET32-YH-20、pET28-YH-20、pGEXKG-YH-20、pET32-YH-35、pET28-YH-35 和 pGEXKG-YH-35。重组表达质粒 pET32-YH-35 的构建和酶切鉴定如图 4。

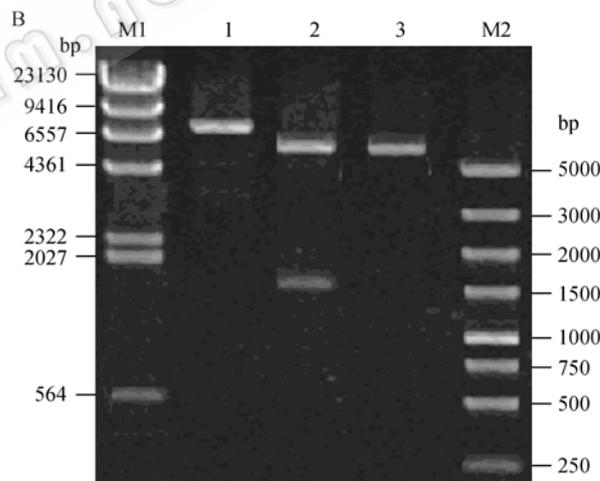
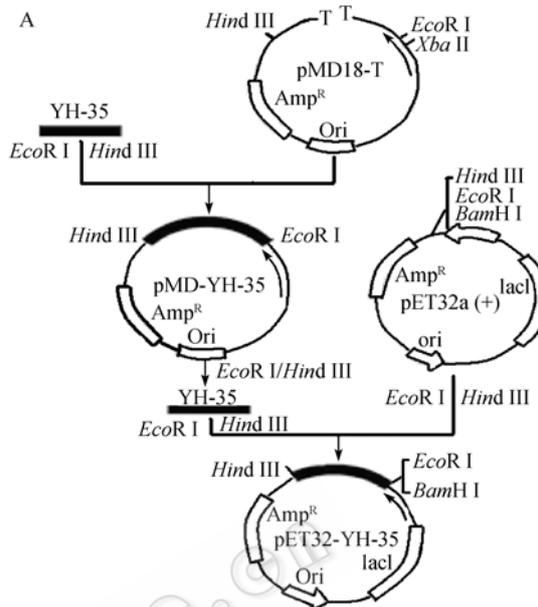


图 4 重组表达质粒 pET32-YH-35 的构建和酶切鉴定

Fig. 4 Restriction analysis and construction of recombinant plasmid pET32-YH-35

(A) construction of recombinant plasmid; (B) Restriction analysis of recombinant plasmid; M1: λ DNA/*Hind* III; 1: pET32-YH-35 *Eco*R I; 2: pET32-YH-35 *Eco*R I/*Hind* III; 3: pET-32a *Eco*R I; M2: DL5000 marker

2.4 *cyp51* 基因及突变体 *cyp51* 基因的表达

生物信息学预测表明: *cyp51*cDNA 全长 1686 bp, 编码蛋白分子量约 62 kD; 突变体 *cyp51-20* cDNA 长 1626 bp, 编码蛋白分子量约为 59 kD; *cyp51-35* cDNA 长 1581 bp, 编码蛋白约为 58 kD。pET-32a

载体上带有 *trxA* 基因, 其编码的硫氧还蛋白约为 12 kD。将构建好的 9 种重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 诱导表达, 通过改变 IPTG 浓度(0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L)和诱导温度(37°C、30°C、20°C)进行表达条件优化。SDS-PAGE 分析结果表明: 9 种重组质粒中, 仅有 pET32-YH-35 能够在 BL21(DE3)中表达; 在约 70 kD 处有明显的表达带, 与预测的突变体蛋白(58 kD)和 TrxA 编码蛋白(12 kD)分子量之和大小相符(图 5)。30°C 采用 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 其表达量最大。全长序列和 N 端截短了 20 个氨基酸的突变体(*cyp51*YH-20)未能表达。

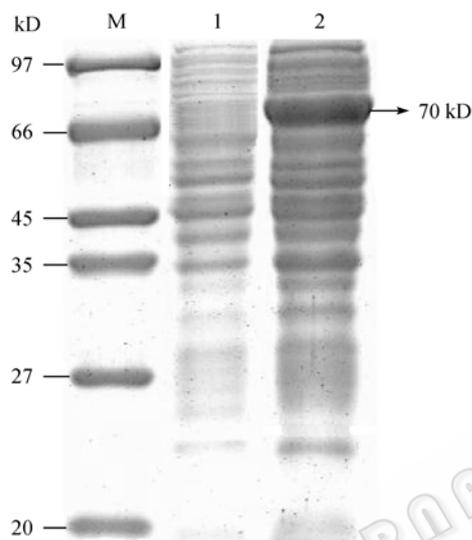


图 5 重组蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein
M: protein molecular weight markers; 1: un- induced;
2: induced for 6 h

采用了 3 种 *E. coli* 表达宿主菌表达两个突变体蛋白。结果显示, 在 30°C, 0.5 mmol/L IPTG 诱导下, pET32-YH-35 重组质粒在 3 种宿主菌中均可表达, 而 pET32-YH-20、pET28-YH-20、pET28-YH-35、pGEXKG-YH-20 和 pGEXKG-YH-35 在 3 种菌中均不表达。pET32-YH-35 重组质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达量最大, 在另外两种宿主菌表达量相对较小。

2.5 重组细胞色素 P450 的活性测定

对在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达的重组蛋白 CYP51-35 进行活性测定, 玉米黑粉菌 CYP51-35 与商品化的杀菌剂农药产生的结合光谱, 戊唑醇和烯唑醇在 400 nm 左右有波谷, 在 430 nm 左右有波峰, 是典型的 II 型 P450 的结合光谱^[11], 且 $\Delta A_{430-400}$ 随农

药浓度增加而增大, 有明显的剂量效应关系。三唑醇和三唑酮结合光谱为 I 型的。根据 Hanes-Woolf 作图法得到结合常数 K_d 值(表 1)。结合常数越小, 表明重组蛋白与农药亲和力越好, 农药对于真菌 CYP51 的抑制作用越强。分析结果表明, 杀菌剂与重组蛋白的结合常数较小, 说明该重组蛋白具有生物学活性^[12]。在分析具有 II 型 P450 结合光谱特征的结合常数时, 戊唑醇的 K_d 值最小, 为 0.11 $\mu\text{mol/L}$; 其产生的结合光谱和结合能力分析见图 6。

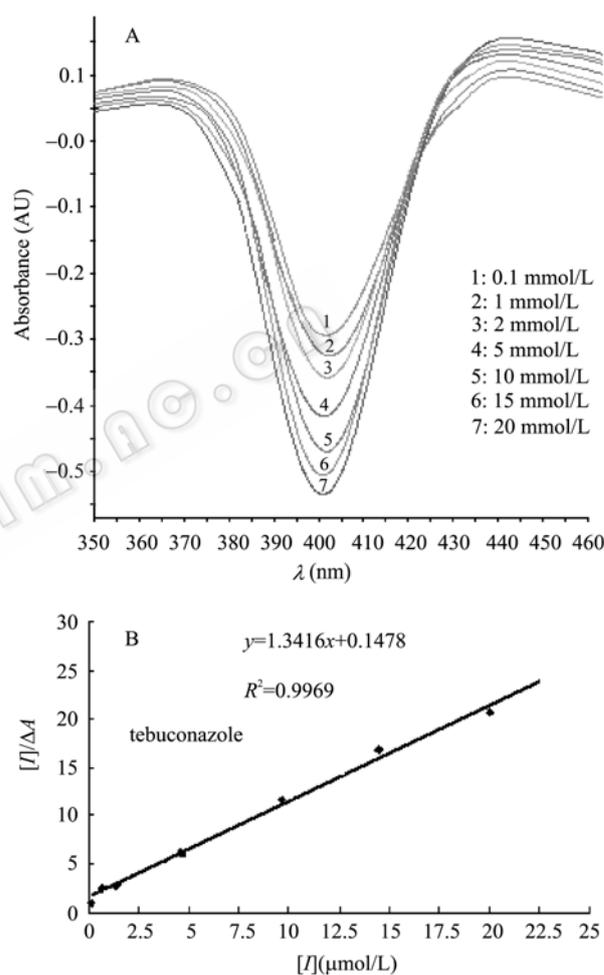


图 6 重组玉米黑粉菌 CYP51 突变体蛋白和戊唑醇的结合光谱及结合能力分析

Fig. 6 Spectra and plot analysis of tebuconazole binding to recombinant *U. maydis* CYP51

(A) spectra of tebuconazole binding to CYP51; (B) Hanes-Woolf plot for tebuconazole binding to CYP51

XF 系列化合物是一类针对农作物真菌合成的先导小分子杀菌剂农药。测定其同重组蛋白结合光谱的结果显示: 多数线性关系较好。根据 Hanes-Woolf 作图法计算的 XF 系列杀菌剂结合常数

与商品化杀菌剂相比(表 1), K_d 值偏大; 但其中 XF-113 结合常数的值接近商品化杀菌剂, 将有可能开发为新的杀真菌剂。

表 1 杀菌剂和先导化合物与重组玉米黑粉菌 CYP51 蛋白结合常数分析

Table 1 Binding constants analysis of fungicide and recombinant *U. maydis* CYP51

Standard fungicides			
Tebuconazole	0.110	Diniconazole	0.255
Triadimenol	0.057	Triadimefon	0.252
Synthetic fungicide compounds			
XF-22	0.679	XF-36	0.798
XF-38	1.647	XF-40	1.383
XF-49	1.160	XF-62	0.984
XF-78	3.641	XF-87	0.915
XF-100	0.463	XF-113	0.307
XF-115	0.840	XF-118	0.321
XF-167	1.360	XF-169	0.620

3 讨论

玉米黑粉菌 *cyp51* 已在酿酒酵母中成功表达^[13], 在原核系统中, 一直未见相关报道。本研究从原核细胞表达入手, 期望实现玉米黑粉菌 *cyp51* 的高效表达。首先构建了 pET28-YH, 转入大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达, 没有发现特异性表达条带。优化诱导条件(采用不同的诱导时间、不同的诱导剂 IPTG 浓度、不同的培养基及添加葡萄糖等限制因子), 仍未能实现表达。通过稀有密码子分析, 玉米黑粉菌 *cyp51* 中含有较多的稀有密码子, 从而采用添加了稀有 tRNAs 的宿主菌(BL21(DE3)pLysS、Rosetta(DE3))进行表达, SDS-PAGE 检测仍未能得到玉米黑粉菌 CYP51 全长蛋白质较为明显的表达。采用不同的表达质粒(pET-32a 和 pGEX-KG)进行表达, 希望通过不同的融合标签增加目的蛋白在细胞质中的可溶性或帮助目的蛋白实现在难以表达的原核系统中表达。结果表明, 融合蛋白自身可以表达, 但插入玉米黑粉菌 *cyp51* 基因后不能表达。原因可能是玉米黑粉菌 CYP51 氨基酸 N 端序列的信号肽对于表达起到一定的抑制作用。

由于玉米黑粉菌 CYP51 是一种膜结合型的蛋白, 通过生物信息学的手段对其全序列的蛋白质进行了跨膜分析。结果显示在 N 端呈两次跨膜, 考虑到 N

端跨膜区定位于细胞膜的序列可能对于蛋白质本身的表达起到调控作用, 且 N 端的定位序列对于蛋白质的功能活性影响一般较小, 从而考虑通过截短 N 端的跨膜区, 改变调控作用, 使其可以进行异源表达。当截短了 N 端 20 个氨基酸时, N 端的跨膜区结构由两次跨膜变为一次跨膜, 直到截短了 N 端 35 个氨基酸时, 跨膜区被去除, 蛋白质成为没有跨膜的结构, 预测结果显示为可溶性蛋白。通过同源模件构建了玉米黑粉菌 CYP51 的全长序列和突变体序列的结构预测分析表明, 得到的突变体蛋白质和全长序列的蛋白质的在酶活性部位基本相同。可以推断玉米黑粉菌 CYP51 和突变体蛋白质间的酶学性质相同, 酶的活性保持良好。因此重新克隆得到了 2 个突变体序列, 并构建了 CYP51 突变体表达质粒(pET 和 pGEX-KG), 尝试在大肠杆菌表达宿主菌(BL21、BL21(DE3)pLysS、Rosetta (DE3))中诱导表达。SDS-PAGE 结果表明: 仅有一种 N 端剪掉了 35 个氨基酸玉米黑粉菌 CYP51 突变体的重组质粒(pET32YH-35)在大肠杆菌 BL21(DE3)中能够较好地表达。通过紫外-可见光谱对玉米黑粉菌 CYP51 与底物的结合作用的研究表明: 重组玉米黑粉菌 CYP51 酶具有活性, XF 系列化合物可以与该菌的 CYP51 相结合, 有可能开发为新的杀真菌剂。除去跨膜区, 改变调控作用, 有利于异源表达。除去编码 N 端 20 个氨基酸相应序列的重组质粒仍不能表达, 可能与第二跨膜区的抑制作用有关。至于构建的多种突变体重组质粒, 只有 pET32YH-35 能够表达, 其它重组质粒都不能表达的原因还不十分清楚。可能与 pET-32a 自身具有的特殊融合蛋白基因有关, 其表达机理还有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] Lepesheva GI, Waterman MR. CYP51—the omnipotent P450. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, **215**: 165–170.
- [2] Cao YB, Zhang L, Wang Y, et al. Voriconazole and its clinical use. *Chin J New Drugs Clin Rein*, 2005, **24**: 330–332.
曹永兵, 张磊, 王彦, 等. 伏立康唑及其临床应用. *中国新药与临床杂志*, 2005, **24**: 330–332.
- [3] Martinez-espinoza AD, Garcia-pedrajas MD, Gold SE. The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol*, 2002, **35**: 1–20.
- [4] Han LG, Yuan Y, Wang G. Extraction of DNA from

- filamentous fungal tissues. *Biotechnol*, 1999, **9**: 38–41.
- 韩利刚, 袁毅, 王罡. 丝状真菌组织 DNA 的提取. 生物技术, 1999, **9**: 38–41.
- [5] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, *et al*. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 2005, 571–607.
- [6] Krogh A, Larsson BR, Heijine GV, *et al*. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 2001, **305**(3): 567–580.
- [7] Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, 2004, **338**(5): 1027–1036.
- [8] Podust LM, Poulos TL, Waterman MR, *et al*. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98**: 3068–3073.
- [9] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem*, 1964, **239**(7): 2370–2378.
- [10] Guardiola-Diaz HM, Foster LA, Mushrush D, *et al*. Azole-antifungal binding to a novel cytochrome P450 from *Mycobacterium tuberculosis*: implications for treatment of tuberculosis. *Biochem Pharmacol*, 2001, **61**(12): 1463–1470.
- [11] Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol*, 1967, **3**: 113–123.
- [12] Xiao M, Yang JY, Xiao WJ, *et al*. Application of binding spectra DMIs fungicide screening. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(6): 1129–1134.
- 肖敏, 杨娇艳, 肖文精, 等. 结合光谱法在 DMIs 类杀真菌剂筛选中的应用. 生物工程学报, 2007, **23**(6): 1129–1134.
- [13] Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, *et al*. Expression, purification, reconstitution and inhibition of *Ustilago maydis* sterol 14 α -demethylase (CYP51; P450 (14DM)). *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **169**: 369–373.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

蛋白质结构预测——支持向量机的应用

孙向东 刘拥军 黄保续 谢仲伦 编著

978-7-03-022387-6 ¥35.00 2008年9月出版

统计学习理论是20世纪90年代逐渐成熟的机器学习理论,以这种理论为基础的支持向量机与以往的学习机器相比具有支持小样本、不会陷入局部势井、鲁棒性好以及运算成本低等优势。实现这种理论的支持向量机算法已经成为机器学习和知识挖掘的标准工具。

自从2001年支持向量机被首次用于蛋白质二级结构的预测以来,这种算法发展到蛋白质的结构类型、亚细胞结构和膜蛋白的结构等领域的预测中。本书详细介绍了依据统计学习理论构建支持向量机的方法、各种相关软件原理和使用方法,并以二级结构和结构域为例介绍了以支持向量机为工具预测蛋白质结构的方法。书中使用了大量的原创性实验结果,理论联系实际,详细阐述了以支持向量机为工具预测蛋白质结构的全过程。

本书适合从事蛋白质结构基础研究的学生和科技工作者阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>