

# 分子对接技术研究热休克蛋白 27 与 $\beta$ 受体激动剂的相互作用

胡梦华<sup>1</sup>, 王 晶<sup>2</sup>, 王方雨<sup>2</sup>, 邓瑞广<sup>2</sup>, 樊剑鸣<sup>1,\*</sup>

(1. 郑州大学公共卫生学院, 河南郑州 450001;

2. 河南省农业科学院, 河南省动物免疫学重点实验室, 河南郑州 450002)

**摘 要:** 利用分子对接技术, 研究热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27) 与  $\beta$  受体激动剂类药物的结合能力, 探究 HSP27 用于检测  $\beta$  受体激动剂的可能性。将人工表达的 HSP27 和  $\beta_2$  肾上腺素受体 ( $\beta_2$  adrenergic receptor,  $\beta_2$  AR) 分别与  $\beta$  受体激动剂类药物进行分子对接, 比较它们的结合能力的差异性, 并对对接结果进行酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 验证。对接结果显示, 15 种  $\beta$  受体激动剂类药物中有 9 种药物与 HSP27 对接的总评分值高于  $\beta_2$  AR。ELISA 的结果显示, HSP27 可以与 HRP-克伦特罗、HRP-非诺特罗和 HRP-莱克多巴胺特异性结合, OD 值分别为 0.685、0.0525、0.662, 这与分子对接结果基本一致。结论: HSP27 与  $\beta$  肾上腺素受体激动剂类药物具有较强的结合能力, 可以用于检测  $\beta$  肾上腺素受体激动剂的可能性较大。

**关键词:** 分子对接技术, 热休克蛋白 27 (HSP27),  $\beta_2$  肾上腺素受体,  $\beta$  受体激动剂

## Interaction of heat shock protein 27 and $\beta$ adrenergic agonists by molecular docking

HU Meng-hua<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, WANG Fang-yu<sup>2</sup>, DENG Rui-guang<sup>2</sup>, FAN Jian-ming<sup>1,\*</sup>

(1. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Henan Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The molecular docking technology were used to investigate the combining ability of heat shock protein 27 (HSP27) and  $\beta$  adrenergic receptor agonists and the possibility that heat shock protein 27 be used to detect  $\beta$  adrenergic receptor agonists. Artificially expressed heat shock protein 27 and  $\beta_2$  adrenergic receptor ( $\beta_2$  AR) were combined with  $\beta$  adrenergic receptor agonists respectively by molecular docking technology. Based on the results of molecular docking, the differences of their combining ability were compared, and then verified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that nine total score of heat shock protein 27 was higher than  $\beta_2$  adrenergic receptor with fifteen small molecule drugs of  $\beta$  adrenergic receptor agonist in molecular docking. Enzyme-linked immunosorbent assay results showed that heat shock protein 27 could be reacted with all three horse radish peroxidase (HRP)- $\beta$  adrenergic receptor agonists of clenbuterol, fenoterol, ractopamine specifically and the optical density (OD) values obtained were 0.685, 0.0525, and 0.662 respectively. The results of enzyme-linked immunosorbent assay are in accordance with the results of molecular docking basically. In this paper, heat shock protein 27 has strong combining ability with  $\beta$  adrenergic agonists, which can be used to detect  $\beta$  adrenergic receptor agonists in all probability.

**Key words:** molecular docking; heat shock protein 27;  $\beta_2$  adrenergic receptor;  $\beta$  adrenergic agonist

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)03-0087-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.018

$\beta$  受体激动剂在肉类食品的非法添加一直是影响我国居民健康的热点问题之一<sup>[1]</sup>。现有的检测方法主要包括高效液相色谱质谱技术<sup>[2-3]</sup>、ELISA 检测<sup>[4]</sup>和胶体金免疫层析法<sup>[5]</sup>等, 它们在快速检测方面具有很大的局限性。近年来, 人们开发出基于受体

配体反应的受体分析法, 利用体外表达系统获取  $\beta_2$  肾上腺素受体<sup>[6-8]</sup>, 但在  $\beta$  激动剂的多残留检测方面仍处于实验室探索阶段。

HSP27 属于低分子量热休克蛋白家族的成员, 其重要的功能是保护细胞抵抗环境中各种应激因素

收稿日期: 2017-07-20

作者简介: 胡梦华 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: hmh1518@126.com。

\* 通讯作者: 樊剑鸣 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子毒理学, E-mail: fan5746067@126.com。

基金项目: 河南省农业科学院优秀青年科技基金 (2016YQ27); 国家自然科学基金 (31372453)。

引起的损伤<sup>[9]</sup>。在高温、缺血等条件干扰下,HSP27表达量提高并发生磷酸化与其他蛋白相互作用,在心血管疾病中发挥重要作用<sup>[10-11]</sup>;近年来,对HSP27的研究主要集中心血管疾病、呼吸系统疾病及与癌症的关系等方面<sup>[12-14]</sup>,HSP27在 $\beta$ 受体激动剂类小分子药物检测方面的应用尚未见报道。

分子对接技术是根据配体与受体作用的“锁钥原理”,模拟它们的相互作用,通过一定的计算来预测两者间的结合模式及亲和力,从而进行药物的虚拟筛选。现有的研究表明:通过分子对接技术,可以进行虚拟筛选及新药发现<sup>[15-16]</sup>。此外,HSP27的过表达可能影响癌淋巴结转移<sup>[17]</sup>,增加人体对化疗药物的敏感性<sup>[18-19]</sup>。

基于分子对接技术中受体配体的结合特点,本研究将人工表达的HSP27和 $\beta_2$ AR蛋白与 $\beta$ 受体激动剂类小分子药物分别进行分子对接,并对HSP27和 $\beta_2$ AR蛋白的分子对接结果进行ELISA验证,鉴定HSP27与 $\beta$ 受体激动剂特异性结合的能力,为 $\beta$ 受体激动剂多残留检测快速检测方法的建立提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

$\beta$ 受体激动剂类药物的分子结构 ZINC 上下载; $\beta_2$ AR蛋白分子结构(2RH1)和HSP27蛋白分子结构(3ROR) PDB数据库中下载;HSP27蛋白,HSP27的兔源多抗血清由河南农业大学禽病研究所惠赠; $\beta_2$ AR蛋白由本实验室保存;EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)和NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)美国Thermo scientific公司;羊抗兔酶标二抗(goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase, GaRIgG-HRP)华美生物工程有限公司;双蒸水动物免疫实验室自制;磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline,PBS,0.01 mol/L)、PBST洗涤液(PBS:Tween20 = 2 × 10<sup>3</sup>:1)、包被缓冲溶液(carbonate buffered saline,CBS,0.05 mol/L NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>缓冲液)、封闭液(PBST:BSA = 100:1)、终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)均为国产分析纯级别。

电子天平(AE260)德国Mettler公司;电泳仪(JM-250)大连捷迈科贸有限公司;凝胶成像仪(GBox-F3)美国Syngene公司;酶标仪(Bio-Rad550)美国Bio-Rad公司;超纯水仪(QPAK2)德国Millipore公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 对接准备 依据2RH1的分子结构,对接口袋设定为包含Asp113、Asn312、Ser203、Phe193、Phe289、Phe290、Val114、Val117、Trp109、Tyr308、Tyr316、Tyr199、Trp286和Thr118残基的区域,Threshold定义为0.50,Bloat定义为10A。依据3ROR的具体情况,对接口袋设定为包含Glu99、Asp65、Arg209、Phe100、Tyr50、Cys103、Asp203、Tyr202、Ser200、Asn199、Glu198、Trp62、Met66、Met67、Val98和Ser45等残基所在区域,Threshold定义为0.50,Bloat定义为10A。所有的 $\beta$ 受体激动剂类药物的分子结构进行优化,以

获得其能量的最小化状态,以备后续进行分子对接。去除 $\beta_2$ AR蛋白分子结构中相应的配体结构和其他非必要的部分,并进行加氢及能量的最小化处理。

1.2.2 分子对接 以上述两种蛋白的对接区域作为受体,以 $\beta$ 受体激动剂类小分子药物作为配体,借助SYBYL软件中FlexX方法进行对接工作,对接前先对HSP27进行系列优化:首先提取出配体分子,然后对侧链的修补、主链末端的处理,加氢、删除水分子、指定原子类型、加电荷和能量优化等均按SYBYL默认值进行系列优化;利用SYBYL软件的蛋白质对接下面的Define来生成对接活性口袋,其中Protomol Generation项选择Multi-Channel Surface模式,其它条件按SYBYL默认值。以对接结果中总评分值(Total Score)为最终判断对接结果的依据。

1.2.3 数据统计分析 对HSP27和 $\beta_2$ AR与 $\beta$ 受体激动剂类小分子药物分子对接的总评分值进行差异性分析,采用SPSS 21.0进行统计分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ ,当 $p < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

1.2.4 HSP27的活性鉴定 纯化后的HSP27,经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后,用ELISA对其活性进行鉴定。包被纯化后的HSP27,包被浓度为1  $\mu$ g/mL,50  $\mu$ L孔,37  $^{\circ}$ C放置2 h后,PBST洗涤三次以上,晾干。加入1% BSA,200  $\mu$ L/孔,4  $^{\circ}$ C过夜封闭。PBST洗涤三次以上后,晾干。加入的兔源多抗血清从1:1000倍倍比稀释,空白对照孔加入用于稀释兔源多抗血清的PBS,50  $\mu$ L/孔。37  $^{\circ}$ C放置30 min后,PBST洗涤三次以上后,加入1:5000,PBST稀释的羊抗兔二抗,50  $\mu$ L/孔。加入显色液100  $\mu$ L/孔,显色10 min。最后加入终止液50  $\mu$ L/孔,用酶标仪读取各孔在450 nm处的吸光值(optical density,OD)。

1.2.5 HSP27与小分子结合能力验证 将人工表达的HSP27和 $\beta_2$ AR蛋白,以200 ng/mL的包被浓度倍比稀释,50  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C置2 h后,PBST洗涤三次以上,晾干。加入1% BSA,200  $\mu$ L/孔,4  $^{\circ}$ C过夜封闭。PBST洗涤三次以上后,晾干。加入克伦特罗、莱克多巴胺及非诺特罗三种 $\beta$ 受体激动剂HRP酶标记物,测定HSP27和 $\beta_2$ AR与三种药物特异性结合的OD值。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子对接的结果

在本次实验中,15种 $\beta$ 受体激动剂类药物按事先设定的程序,分别与HSP27和 $\beta_2$ AR进行分子对接,并在15种 $\beta$ 受体激动剂中选取3种具有代表性的小分子药物,分别是克伦特罗、莱克多巴胺和非诺特罗,进行对接结果的ELISA分析。它们与HSP27的对接模型图如图1所示,HSP27的大分子结构在其跨膜区形成的“配基结合小袋”中与 $\beta$ 受体激动剂类小分子药物依靠疏水键和氢键相互作用。

近年来,G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor,GPCR)成为分子对接以及虚拟筛选领域研究的焦点,人们以根据已知配体的结构进而衍生得到GPCR模型<sup>[20-21]</sup>。基于这些模型进行新的研究表明<sup>[22-25]</sup>,小分子药物作为配体与 $\beta_2$ AR结合的部位位于其跨膜区,并构成一个“配基结合小袋”,在这些跨

膜区与配基以离子键或氢键的形式结合并发挥相互作用。HSP27 作为体内重要的小分子蛋白,在分子对接中与  $\beta$  受体激动剂类药物在其跨膜区的结合力明显优于  $\beta_2$ AR。

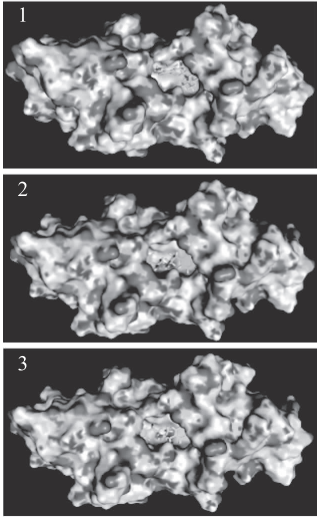


图1 HSP27 与  $\beta$  受体激动剂类药物分子对接模型图  
Fig.1 Modeling diagram of HSP27 and  $\beta$  adrenergic receptor agonists by molecular docking  
注:1:HSP27 与克伦特罗;2:HSP27 与莱克多巴胺;  
3:HSP27 与非诺特罗。

2.2 统计结果分析

$\beta$  受体激动剂类药物与两种蛋白的分子对接结果如表 1 所示,15 组对接结果中有 9 个 HSP27 的总评分值高于  $\beta_2$ AR。将 HSP27 组的分子对接结果设定为 A 组, $\beta_2$ AR 组的设定为 B 组,A 组与 B 组间对接结果的差值服从正态分布,故采用配对 t 检验分析两组间差异有无统计学意义。由表 2 结果可知,A 组与 B 组间对接结果的差异有统计学意义 ( $p = 0.03$ ),

故可认为 HSP27 与  $\beta$  受体激动剂类药物的结合能力高于  $\beta_2$ AR。

表 2 统计分析结果

Table 2 Results of statistical analysis

| 分组  | 例数 | 均值 $\pm$ 标准差    | T 值   | P 值   |
|-----|----|-----------------|-------|-------|
| A 组 | 15 | 6.05 $\pm$ 1.09 | 2.419 | 0.030 |
| B 组 | 15 | 5.69 $\pm$ 0.94 |       |       |

2.3 HSP27 鉴定结果

2.3.1 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定 人工表达 HSP27 的方法与  $\beta_2$ AR 的类似,都可以通过大肠杆菌表达系统、真核细胞表达系统等方法获得<sup>[26-27]</sup>,而 HSP27 的获取过程更简单,且有较高的表达量,纯化产物的纯度较高。对纯化后的 HSP27 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳初步鉴定,SDS-PAGE 鉴定结果如图 2 所示。图中 HSP27 的分子质量约在 27 kD 左右,初步鉴定该蛋白为 HSP27,且纯化后的 HSP27 目的条带单一,表明获得的 HSP27 的纯度较高,可以用于检测  $\beta$  受体激动剂方面的研究。

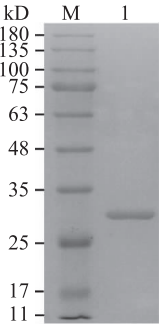


图 2 纯化后 HSP27 的 SDS-PAGE 鉴定结果  
Fig.2 SDS-PAGE analysis of the purified HSP27  
注:M:180kD 蛋白 Marker;1:纯化后的 HSP27。

2.3.2 HSP27 的 ELISA 测定结果 包被 1  $\mu$ g/mL 浓

表 1  $\beta$  受体激动剂与两种蛋白分子对接结果

Table 1 Determination of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists with two kinds of protein by molecular docking

| $\beta$ 受体激动剂类药物   | 英文全称                     | CAS                        | Total Score |              |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|-------------|--------------|
|                    |                          |                            | HSP27       | $\beta_2$ AR |
| 多巴酚丁胺<br>(盐酸多巴酚丁胺) | Dobutamine hydrochloride | 34368-04-2<br>(49745-95-1) | 8.4035      | 7.5982       |
| 非诺特罗               | Fenoterol                | 13392-18-2                 | 7.8134      | 7.3290       |
| 莱克多巴胺              | Ractopamine              | 97825-25-7                 | 7.0472      | 6.8865       |
| 沙丁胺醇               | Salbutamol               | 18559-94-9                 | 6.3827      | 5.7219       |
| 吡布特罗               | Pirbuterol               | 38677-81-5                 | 6.3238      | 5.5702       |
| 特布他林               | Terbutaline              | 23031-25-6                 | 6.2437      | 5.7557       |
| 马布特罗               | Mabuterol                | 56341-08-3                 | 6.0874      | 5.0646       |
| 奥西那林               | Orciprenaline            | 586-06-1                   | 5.8220      | 5.8766       |
| 克伦特罗               | Clenbuterol              | 129138-58-5                | 5.8202      | 4.5850       |
| 溴布特罗               | Brombuterol              | 41937-02-4                 | 5.7717      | 4.5829       |
| 异丙肾上腺素             | Isoproterenol            | 7683-59-2                  | 5.4242      | 5.8632       |
| 西马特罗               | Cimaterol                | 54239-37-1                 | 5.4104      | 5.2559       |
| 肾上腺素               | Adrenaline               | 51-43-4                    | 5.2629      | 5.4472       |
| 氯丙那林               | Clorprenaline            | 3811-25-4                  | 4.7317      | 5.1257       |
| 苯基乙醇胺              | Phenylethanolamine       | 7568-93-6                  | 4.2296      | 4.6572       |

表3 HSP27 蛋白 ELISA 鉴定结果  
Table 3 Determination of HSP27 by ELISA

| HSP27              | 兔多抗血清稀释倍数 |       |       |       |        |        |        |         |         |       |
|--------------------|-----------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | 10000     | 20000 | 40000 | 80000 | 160000 | 320000 | 640000 | 1280000 | 2560000 | 空白对照  |
| OD 值               | 3.923     | 3.850 | 3.768 | 3.490 | 2.599  | 1.635  | 0.965  | 0.674   | 0.514   | 0.149 |

表4 HSP27 与  $\beta_2$ AR 的 ELISA 测定结果  
Table 4 Determination of HSP27 and  $\beta_2$ AR by ELISA

| 包被蛋白            | 酶标物种类          |                 |                |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
|                 | HRP-克伦特罗(OD 值) | HRP-莱克多巴胺(OD 值) | HRP-非诺特罗(OD 值) |
| HSP27 蛋白        | 0.685          | 0.662           | 0.525          |
| $\beta_2$ AR 蛋白 | 0.448          | 0.320           | 0.364          |

度的 HSP27 蛋白时,用酶标仪读取各孔在 450 nm 处的 OD 值。由表 3 可知,在兔源多抗血清稀释  $3.2 \times 10^5$  倍时,测得 HSP27 的 OD 值为 1.635,血清稀释高于  $3.2 \times 10^5$  倍时,测得 OD 值更高。表明免疫得到的兔源多抗血清效果较好,同时也表明人工表达的 HSP27 具有较高的活性。活性较高的 HSP27 也为 HSP27 用于  $\beta$  受体激动剂的检测方面奠定了基础。

## 2.4 HSP27 与 $\beta$ 受体激动剂的结合能力验证

由表 4 可知,HSP27 与盐酸克伦特罗、莱克多巴胺和非诺特罗三种  $\beta$  受体激动剂的酶标记物均能够发生特异性反应,OD 值分别为 0.685、0.662 和 0.525,  $\beta_2$ AR 与三种  $\beta$  受体激动剂的酶标记物反应的 OD 值分别为 0.448、0.320 和 0.364。对比两种蛋白 OD 值的差异性可知,HSP27 与  $\beta$  受体激动剂能够特异性结合,且灵敏度较高。国内外对 HSP27 的研究主要集中于其在人体及其他动物体内的调控机制研究<sup>[28-30]</sup>,这些研究表明,HSP27 在体内分布广泛,在不同组织中发挥着不同的调控作用。作为入侵机体的毒物,当  $\beta$  受体激动剂进入人体后与位于平滑肌细胞膜上的  $\beta_2$ AR 结合并相互作用时,位于平滑肌的 HSP27 可能与  $\beta$  受体激动剂发生相互作用,从而阻止  $\beta$  受体激动剂对人体的损害。结合 HSP27 与  $\beta$  受体激动剂类小分子药物分子对接结果,实验结果表明,HSP27 可以用于  $\beta$  受体激动剂检测方面的可能性较大。

## 3 结论

本研究利用分子对接技术,从分子结构上预测它们之间的结合力,不仅证实了 HSP27 可以与  $\beta$  受体激动剂类药物发生反应,也可以为进一步提高 HSP27 检测  $\beta$  受体激动剂类药物的灵敏度提供技术支持。ELISA 的验证结果显示,HSP27 与盐酸克伦特罗、莱克多巴胺和非诺特罗三种  $\beta$  受体激动剂的酶标记物均能够发生特异性反应,OD 值分别为 0.685、0.662 和 0.525。经本实验验证,HSP27 用于检测  $\beta$  受体激动剂类药物的可能性较大,这为  $\beta$  受体激动剂快速检测方法的建立提供了新的思路。

## 参考文献

[1]王健. $\beta$ 激动剂直接竞争酶重组受体分析技术研究[D].北京:中国农业科学院,2015.  
[2]Zhang M X, Li C, Wu Y L. Determination of

phenylethanolamine A in animal hair, tissues and feeds by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry with QuEChERS[J].Journal of Chromatography B, 2012, 900: 94-99.

[3]Wei D, Zhao G, Fu Q, et al. Combined microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for rapid analysis of ractopamine in porcine muscle and urine samples [J]. Food Chemistry, 2014, 145 (145C):789-795.

[4]Li Y, Lu S, Liu Z, et al. A monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of phenylethanolamine A in tissue of swine[J].Food Chemistry, 2015, 167:40-44.

[5]Li C, Luo W, Xu H, et al. Development of an immunochromatographic assay for rapid and quantitative detection of clenbuterol in swine urine [J]. Food Control, 2013, 34 (2): 725-732.

[6]Prashen Chelikani P J R U. The synthesis and high-level expression of a beta2-adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line. [J]. Protein Science, 2006, 15(6):1433-1440.

[7]Gerasimov A S, Zeinalov O A, El Darov M A, et al. Biosynthesis of human  $\beta_2$ -adrenergic receptor in methylotrophic yeast Pichia pastoris and its purification[J].Molecular Biology, 2012, 46(2):279-286.

[8]陈爱亮,王迪,白志宏,等. $\beta_2$ AR 表达纯化及其在  $\beta_2$  激动剂残留检测中的应用[J].中国兽医杂志,2011,47(1):61-63.

[9]王万银,钱令嘉.HSP27 研究现状[J].临床与病理杂志,2001,21(6):467-469.

[10]周琴,邓华菲,谭玉林,等.siRNA 沉默热休克蛋白 27 对雌激素心血管保护作用的影响[J].中国现代医学杂志,2016,26(9):1-6.

[11]汤鑫,邱强.HSP27 在心血管疾病中作用的研究进展[J].医学综述,2013,19(8):1378-1380.

[12]蔡颖,李一鸣,陈红栓,等.COPD 大鼠模型气道弹性及炎症因子改变的研究[J].中华临床医师杂志:电子版,2016(7):190-191.

[13]张亚云,林超,孙鑫,等.雌激素介导的 HSP27 在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J].中国药理学通报,2016(2):159-162.

[14] 李弘夏, 谢智钦, 杜立阳. 基于 HSP27 的乳腺癌干细胞靶向治疗研究进展[J]. 中国老年学, 2014, 34(2): 561-563.

[15] Tang H, Wang X S, Hsieh J H, et al. Do crystal structures obviate the need for theoretical models of GPCRs for structure-based virtual screening? [J]. Proteins - structure Function & Bioinformatics, 2012, 80(6): 1503-1521.

[16] 任洁, 魏静. 分子对接技术在中药研究中的应用[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(1): 123-125.

[17] 高霞, 钱晓龙, 李崖青, 等. Hsp27 在乳腺浸润性微乳头状癌中的表达及其意义[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(9): 525-528.

[18] 张松. HSP27 与胰腺癌吉西他滨化疗耐药的相关性及其机制研究[D]. 南京: 南京大学, 2012.

[19] 李海燕, 王常玉, 石英, 等. HSP27 在卵巢癌顺铂耐药细胞系中的作用[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(11): 1219-1223.

[20] Katritch V, Kufareva I, Abagyan R. Structure based prediction of subtype - selectivity for adenosine receptor antagonists.[J]. Neuropharmacology, 2011, 60(1): 108-115.

[21] Merobb F M, Capuano B, Crosby I T, et al. Homology modeling and docking evaluation of aminergic G protein-coupled receptors[J]. Journal of Chemical Information & Modeling, 2010, 50(4): 626-637.

[22] Vilar S, Ferino G, Phatak S S, et al. Docking-based virtual screening for ligands of G protein-coupled receptors: not only crystal structures but also in silico models [J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2011, 29(5): 614-623.

[23] Carlsson J, Coleman R G, Setola V, et al. Ligand discovery

(上接第 86 页)

fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2006, 64(2): 244-250.

[20] 孟彦羽, 岳敏, 张建平, 等. 海南土地杆菌 *Pedobacter hainanensis* 13-QT 发酵生产  $\kappa$ -卡拉胶酶的条件优化[J]. 中国酿造, 2013, 32(7): 20-23.

[21] Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, et al. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(5): 1136-1140.

[22] Teixeira M F S, Filho J L L, Durán N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586 Efeito das fontes de carbono na produção de pectinase por *Aspergillus japonicus* 586 [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2000, 31(4): 286-290.

[23] 王丽丽, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 黑曲霉固态发酵产生果胶酶条件的优化[J]. 食品科技, 2008, 33(5): 14-18.

[24] 吴永沛, 蔡慧农. 金属离子和 pH 对九孔鲍几种消化酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 66-69.

[25] 李聚海. 辅酶 Q 高产菌株选育及发酵条件优化研究

from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(11): 769.

[24] Dilly S, Scuvée-Moreau J, Wouters J, et al. The 5-HT(1A) agonism potential of substituted piperazine - ethyl - amide derivatives is conserved in the hexyl homologues: molecular modeling and pharmacological evaluation.[J]. Journal of Chemical Information & Modeling, 2011, 51(11): 2961.

[25] Katritch V, Jaakola V P, Lane J R, et al. Structure-Based Discovery of Novel Chemotypes for Adenosine A2A Receptor Antagonists [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(4): 1799.

[26] Singh M K, Tiwari P K. Cloning & sequence identification of Hsp27 gene and expression analysis of the protein on thermal stress in *Lucilia cuprina* [J]. Insect Science, 2016, 23(4): 555-568.

[27] 金欢胜, 吴雄飞, 金锡御, 等. HSP27 基因的克隆与表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 844-846.

[28] 张宝宏, 谢飞, 任海军, 等. HSP27 对细胞迁移的调控[J]. 生物化学与生物物理进展, 2017, 44(2): 110-116.

[29] Fossa P, Cichero E. In silico evaluation of human small heat shock protein HSP27: Homology modeling, mutation analyses and docking studies[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 23(13): 3215-3220.

[30] Hong-Hong H E, Cui Y, Pan Y Y, et al. Cloning of Bos Grunniens HSP27 Gene and Its Expression in the Female Yak Reproductive Organs [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 20(11): 4178-4187.

[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2007.

[26] 张卫婷. 发酵微生物的不同温度生长变化曲线仿真分析[J]. 科技通报, 2015(7): 24-26.

[27] 连中帅. 嗜热果胶酶菌株的选育与酶学特性研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2014.

[28] XIA Jin-lan, MENG Hao, WANG Run-min, et al. Identification and fermentation optimization of protopectinase-overproducing strain *Aspergillus niger* CD-01 for pectin production[J]. Journal of Central South University of Technology, 2009, 16(1): 53-60.

[29] 董云舟, 堵国成, 陈坚. 芽孢杆菌发酵产碱性果胶酶温度控制策略[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 359-362.

[30] 武满满, 孙佩哲, 胡佳俊, 等. 温度、pH 对非光合微生物菌群固碳效率的影响及其成因分析[J]. 工业微生物, 2012, 42(1): 45-51.

[31] 周小红, 李学英, 杨宪时, 等. 接种量对单增李斯特菌生长期及生长界面的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 180-184.

[32] 杨哲, 蔡慧农, 倪辉, 等. 响应面法优化肌苷摇瓶发酵培养基及培养条件[J]. 中国食品学报, 2014, 14(3): 86-93.