



中国农业科学院蔬菜花卉研究所

The institute of vegetables and flowers chinese academy of agricultural sciences

小菜蛾抗药性相关p-糖蛋白的生物信息学分析

第十组： 梁 欢 蔬菜花卉研究所
郭利桃 蔬菜花卉研究所
段韞丹 蔬菜花卉研究所
田丽霞 蔬菜花卉研究所

Outline

1 Background

1.1 Diamond back moth

1.2 ABC transporter

1.3 P—glycoprotein

2 Analysis

2.1 Gene analysis

2.2 Protein analysis

3 The first stage of experiment

1 Background

1.1 Diamond back moth



 小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)属鳞翅目Lepidoptera, 菜蛾科Plutellidae。

 分布：一种世界性分布的重要害虫。

 寄主：主要危害十字花科植物。

 危害：严重发生时能减产90%以上，甚至绝收。



1.1.1 小菜蛾的生活史



1.1.2 小菜蛾的危害

幼虫钻入叶组织为害叶片，初孵幼虫可钻入叶片组织，取食叶肉，稍大即取食叶表皮及叶肉，残留一层表皮，形成透明斑，即“开天窗”。3~4龄幼虫食叶成空洞及缺刻，严重时菜叶被吃成网状。



花椰菜受害状



甘蓝受害状

1.1.3 小菜蛾抗药性

- 通过NCBI、www.caas.net.cn，利用PubMed、Bookshelf等工具查询，了解小菜蛾抗药性及研究现状。
- 小菜蛾为各种十字花科蔬菜的重要害虫，对多种有机氯、有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯、苯甲酰胺类昆虫生长调节剂、农用抗生素等均产生了不同程度的抗药性。

navigation
检索导航 专辑导航

请选择查询范围:

→ [总目录](#)

- 理工A(数学物理学天文学)
- 理工B(化学化工冶金环境矿业)
- 理工C(机电航空交通水利建筑能源)
- 农业
- 医药卫生
- 文史哲
- 政治军事与法律
- 教育与社会科学综合
- 电子技术及信息科学
- 经济与管理

逻辑 检索项 检索词 词频 扩展

关键词 小菜蛾抗药性

从 1979 到 2011 更新 全部数据 范围 全部期刊 匹配 模糊 排序 时间 每页 20 中英扩展

共有记录287条 [首页](#) [上页](#) [下页](#) [末页](#) 1 / 15

序号	篇名	作者	刊名	年期
1	小菜蛾对氯虫苯甲酰胺抗性发展趋势及其种群生物适合度代价初步研究	牛芳	农药学报	2011/05
2	AV菌素在实际生产中的应用	杜全友	中小企业管理与科技(上旬刊)	2011/09
3	小菜蛾对阿维菌素抗药性的研究进展	孙礼兵	北方园艺	2011/16
4	张家口地区田间小菜蛾种群对6种新型杀虫剂的敏感性测定	韩文素	中国植保导刊	2011/08
5	内江市小菜蛾发生特点及其综合防控措施	王治明	中国植保导刊	2011/08
6	小菜蛾成虫蛋白质组双向电泳图谱的建立及条件优化	张娜娜	南京师大学报(自然科学版)	2011/02
7	小菜蛾对高效氯氟菊酯和阿维菌素的抗药性监测	宋姝娥	农药科学与管理	2011/05
8	高温对小菜蛾caspase-9酶活性和基因组DNA的影响	庄华梅	福建农林大学学报(自然科学版)	2011/03
9	小菜蛾不同抗性品系杂交后代羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活力分析	刘虹伶	西南农业学报	2011/02



1.2 ABC transporter

- ATP-binding cassette transporter

ABC转运蛋白超家族是一组跨膜蛋白,具有ATP结合区域的单向底物转运泵,以主动转运方式完成多种分子的跨膜转运。

- 在NCBI、www.caas.net.cn, 利用PubMed、Bookshelf等工具查询ABC transporter、P-glycoprotein的相关研究现状。



PubMed

(ABC transporter[Title/Abstract]) AND p-glycoprotein[Title/Abstract]

Search

US National Library of Medicine
National Institutes of Health

RSS Save search Limits Advanced

Help

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Recently Added

Send to: Filter your results:

Results: 1 to 20 of 322

<< First < Prev Page 1 of 17 Next > Last >>

All (322)

Free Full Text (92)

Review (73)

Manage Filters

[Potiation of anticancer drugs: effects of pentoxifyline on neoplastic cells.](#)

1. Barancik M, Bohacova V, Gibalova L, Sedlak J, Sulova Z, Breier A.

Int J Mol Sci. 2012;13(1):369-82. Epub 2011 Dec 28.

PMID: 22312258 [PubMed - in process]

[Related citations](#)

[Expression of ABC transporters is an unfavorable prognostic factor in laryngeal squamous cell carcinoma.](#)

2. Shen B, Li D, Dong P, Gao S.

Ann Otol Rhinol Laryngol. 2011 Dec;120(12):820-7.

PMID: 22279954 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[Related citations](#)

[Inactivating PSMB5 mutations and P-glycoprotein \(MDR1/ ABCB1\) mediate resistance to proteasome inhibitors: ex vivo efficacy](#)

3. [of \(immuno\) proteasome inhibitors in mononuclear blood cells from rheumatoid arthritis patients.](#)

Verbrugge SE, Assaraf YG, Dijkmans BA, Scheffer GL, Al M, den Uyl D, Oerlemans R, Chan ET, Kirk CJ, Peters GJ, van der

Heijden IM, de Groot TD, Schaner DI, Jansen G

Titles with your search terms

Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions m [Oncologist. 2007]

Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dy [Biochemistry. 2007]

Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprote [Cytometry A. 2004]

See more...

- **The ATP - binding cassette (ABC) proteins represent a highly diversified superfamily in all living kingdoms, with 49 human proteins,14 of which are associated with various diseases.**
- **ABC转运蛋白的一个亚家族与多药抗性(multidrug resistance,MDR)有关,而多药抗性是临床肿瘤化疗中需要解决的主要问题,也是农业害虫抗药性研究中的重要内容。**

1.3 P—glycoprotein

- 1976年Juliano和Ling在具有多药耐药性表型的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中发现一种与耐药程度呈正相关的高分子糖蛋白，命名为P—糖蛋白(由MDRI或ABCBI基因编码)，它是第一个被发现的人ABC转运蛋白。

- **P-glycoprotein is all ATP-driven efflux pump, which transports a wide variety of structurally compounds from cell interior to extracellular space. Over-expression of P-glycoprotein is closely associated with the formation of multidrug resistance(MDR).**
- **P-糖蛋白是一类能量依赖性的转运蛋白，能将许多结构不同的化合物逆向转运出细胞。P-糖蛋白的过表达与细胞的多药耐药性(Multidrug Resistance, MDR)密切相关。**

- 大量研究表明，生理状态下，P-糖蛋白主要参与内、外源药物和毒素的吸收、分布和排泄，对机体组织和器官行使防御保护的作用。
- 如今，Pgp除了在人类的肿瘤癌症研究中占据重要地位，在其他物种的抗性研究中也日益引起关注，Pgp广泛存在于许多物种中。
- 在UniProt、NCBI中搜索Pgp的蛋白序列，选择几个不同物种的序列，利用MEGA软件进行序列比对，构建进化树。

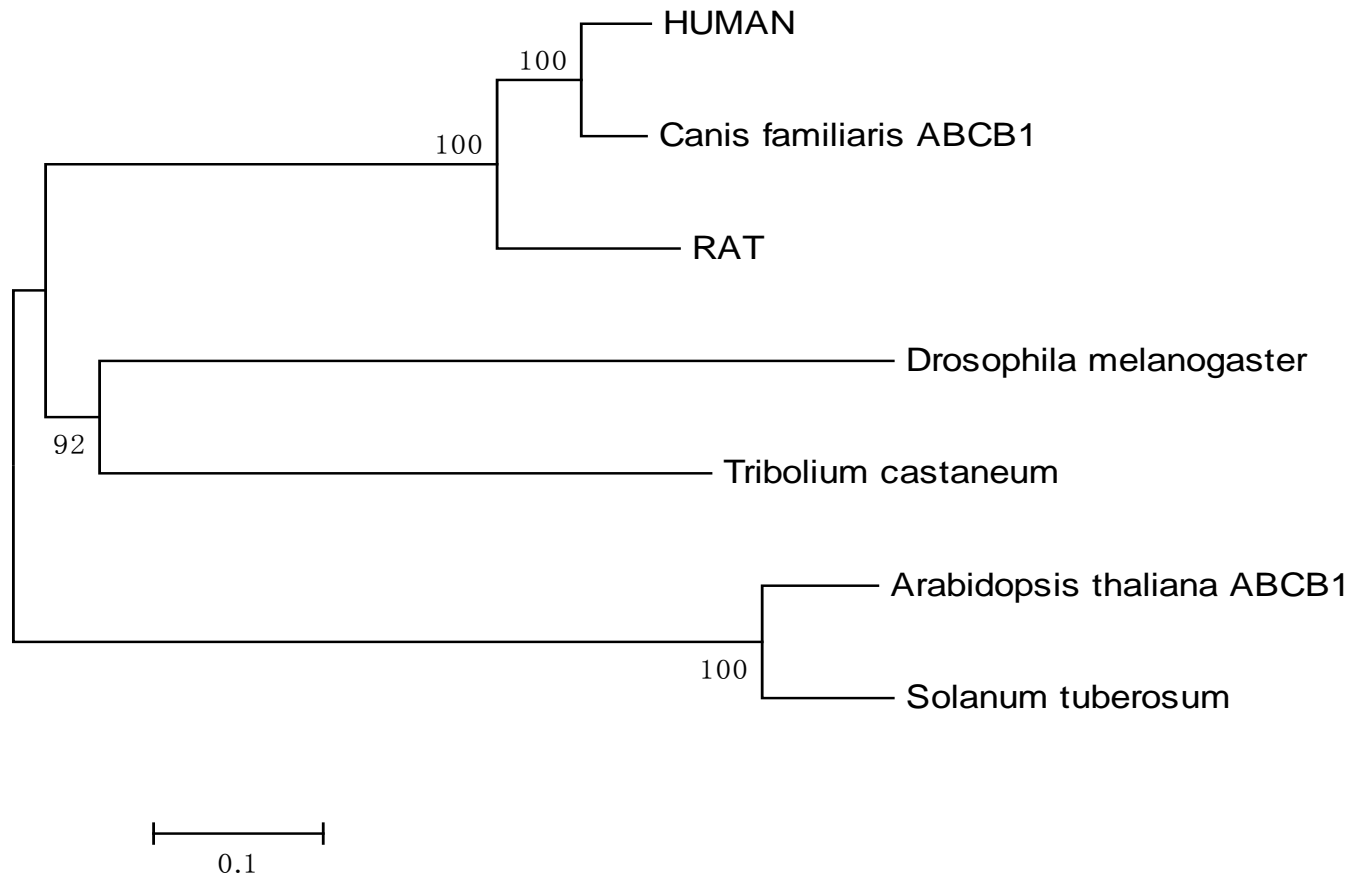


Figure1. Evolutionary relationships of taxa

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method . The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed [2]. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches . The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

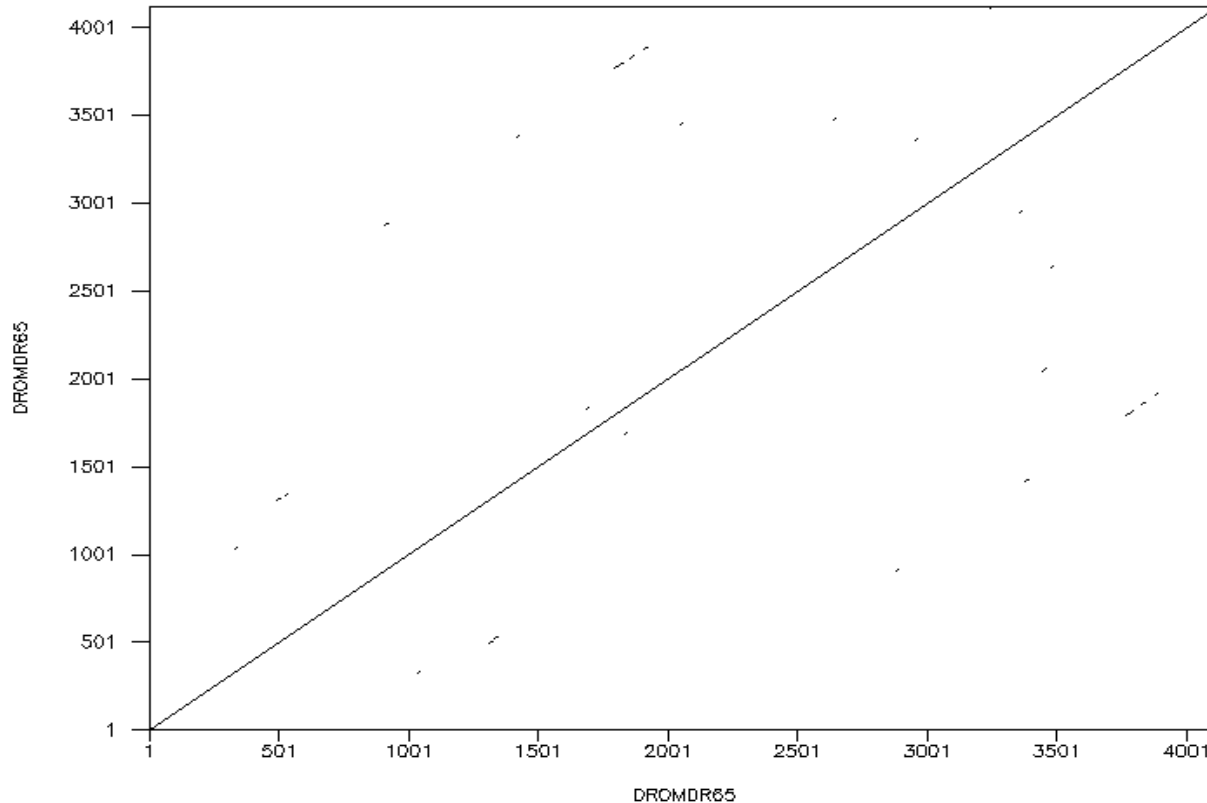
2 Analysis

2.1 Gene analysis

- 选用模式生物——黑腹果蝇的Pgp gene进行分析。
- 基因结构分析主要采用dottup、shoftberry、Genscan
- mRNA analysis (plotorf、showorf)

利用dottup软件分析

Dottup: fasta::509259:DROMDR65 vs fasta::509259:DROMDR65...
Thu 16 Feb 2012 16:18:28



从上图可以看出，DROMDR65序列中没有很多重复序列的区域，只有一小部分

softberry 分析结果

FGENESH 2.6 Prediction of potential genes in Drosophila genomic DNA

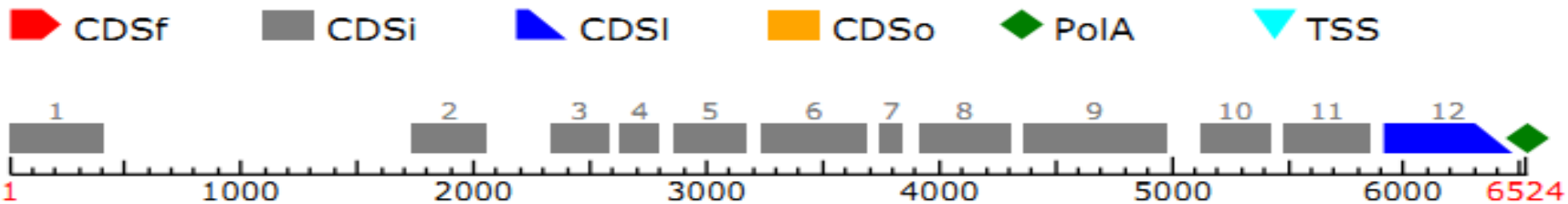
Seq name: Drosophila melanogaster P-glycoprotein

Length of sequence: 7332

Number of predicted genes 1: in +chain 1, in -chain 0.

Number of predicted exons 12: in +chain 12, in -chain 0.

Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score:410.115771



1 +	1	CDSi	1	-	399	28.93	1	-	399	399
1 +	2	CDSi	1729	-	2048	44.25	1729	-	2046	318
1 +	3	CDSi	2324	-	2569	24.58	2325	-	2567	243
1 +	4	CDSi	2622	-	2793	10.32	2623	-	2793	171
1 +	5	CDSi	2854	-	3168	30.62	2854	-	3168	315
1 +	6	CDSi	3228	-	3684	46.31	3228	-	3683	456
1 +	7	CDSi	3740	-	3840	4.56	3742	-	3840	99
1 +	8	CDSi	3910	-	4297	48.32	3910	-	4296	387
1 +	9	CDSi	4354	-	4969	44.42	4356	-	4967	612
1 +	10	CDSi	5120	-	5416	26.22	5121	-	5414	294
1 +	11	CDSi	5479	-	5845	44.31	5480	-	5845	366
1 +	12	CDSI	5906	-	6460	58.11	5906	-	6460	555
1 +		PoIA	6524			1.26				

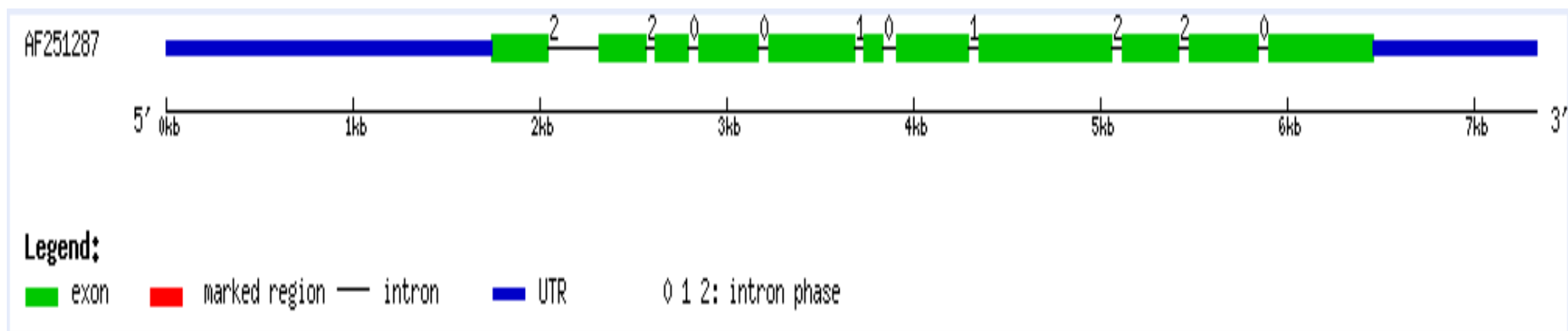
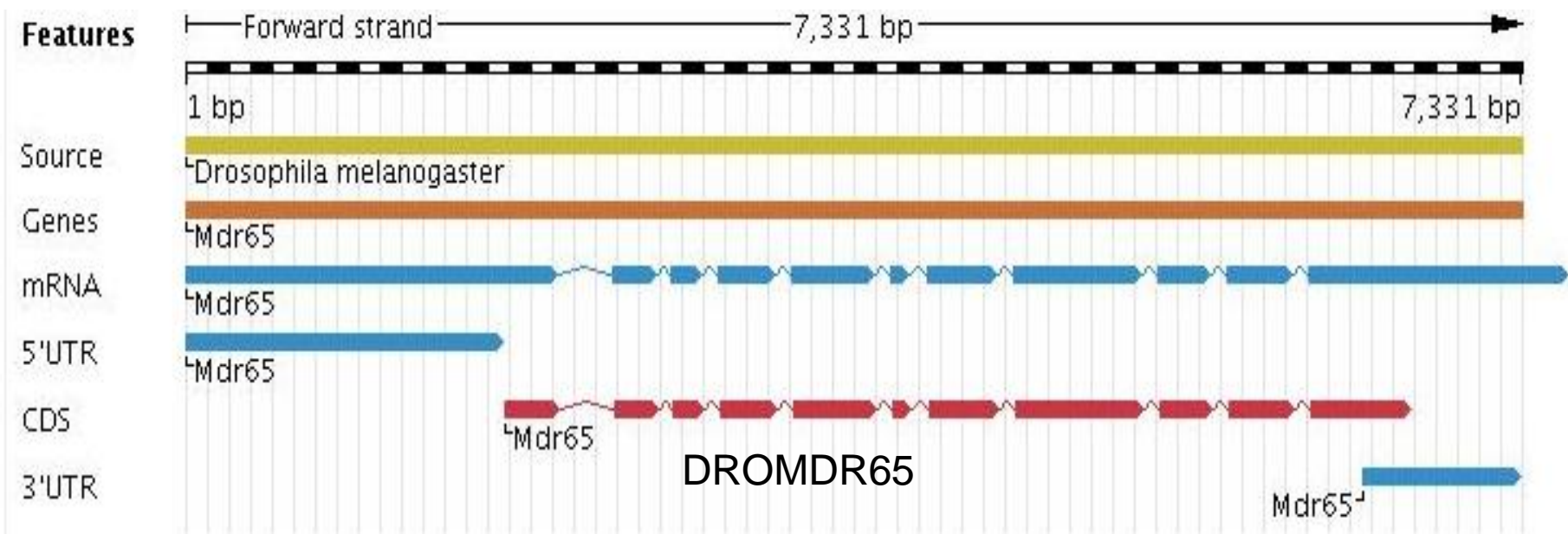
Predicted protein(s) :

```
>FGENESH:[mRNA] 1 12 exon (s) 1 - 6460 4233 bp, chain +
AACGATGTGATCACCACGATAACCGGTGTCCTTGTCCATCCAGCGATCGCCGTCAGCACTT
TCCATTGTGGAGCTGACCCGGTGCAGATGTCCAGGATGGATATAGCAACAGTGGGGTCCGAGC
```

Genescan 分析结果

1.01	Term	+	65	433	369	1	0	59	44	364	0.967	23.75
1.02	PlyA	+	1112	1117	6							1.05
2.00	Prom	+	1296	1335	40							-4.66
2.01	Init	+	1769	2070	302	1	2	102	93	329	0.993	31.52
2.02	Intr	+	2346	2591	246	0	0	54	83	183	0.994	10.97
2.03	Intr	+	2644	2815	172	1	1	64	116	33	0.870	3.65
2.04	Intr	+	2876	3190	315	1	0	28	61	261	0.998	13.66
2.05	Intr	+	3250	3471	222	0	0	51	45	156	0.609	5.92
2.06	Intr	+	3932	4319	388	1	1	32	38	562	0.996	39.96
2.07	Intr	+	4376	4862	487	0	1	37	2	298	0.334	8.17
2.08	Intr	+	5142	5410	269	0	2	47	44	293	0.507	17.98
2.09	Intr	+	5551	5867	317	2	2	55	61	309	0.668	20.68
2.10	Term	+	5928	6482	555	2	0	43	42	444	0.997	29.63
2.11	PlyA	+	6546	6551	6							1.05

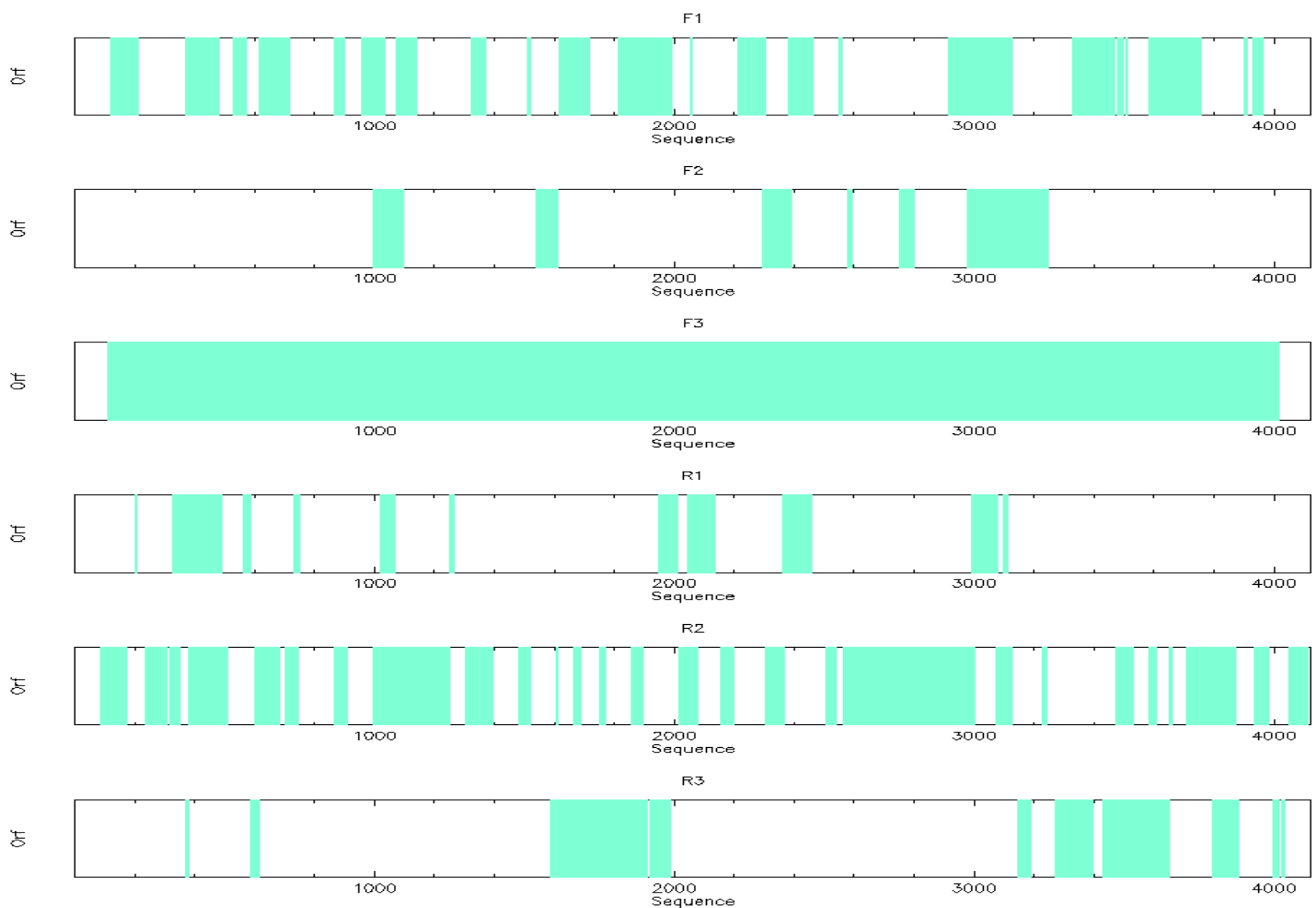
DROMDR65基因结构



mRNA analysis

1) plotorf

2) showorf



将DROMDR65序列用plotorf软件进行分析，可以看出只有F3才能够形成一个完整的阅读框，其他阅读方式都不断的被终止；因此该基因的阅读方式是上图中的F3。

用 showorf 软件分析 DROMDR65

SHOWORF of DROMDR65 from 1 to 4124

```
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 GAATTCGGTTACAATCTGCGGACAATATTTAACTTTTATCTGAAGCAAGTGCGAATAAT 60
F3 1 I P V T I C G Q Y L T F I * S K C E * L 1
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 TGAAGGATCTATCAAAAAGTGGCAATTA AAAAGTGCCGACTAAACATCACCATGGAGCGAG 120
F3 2 K D L S K S G N * K C R L N I T M E R D 11
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 ATGAGGTGTCCACCTCGAGCAGCGAGGGCAAATCACAGGAGGAGGCGCCCATGGCGGAGG 180
F3 12 E V S T S S S E G K S Q E E A P M A E G 31
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 GTTTGGAGCCACAGAGCCTATTGCATTCTGAAACTTTTTGATTCTCCACCTACGGGG 240
F3 32 L E P T E P I A F L K L F R F S T Y G E 51
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 AGATTGGCTGGCTGTTCTTCGGCTTCATAATGTGCTGCATTAAGGCACTGACCCTTCCTG 300
F3 52 I G W L F F G F I M C C I K A L T L P A 71
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 CCGTGGTCATTATCTACAGTGAGTTCACGTCCATGTTGGTGGACCGCGCCATGCAGTTTG 360
F3 72 V V I I Y S E F T S M L V D R A M Q F G 91
```

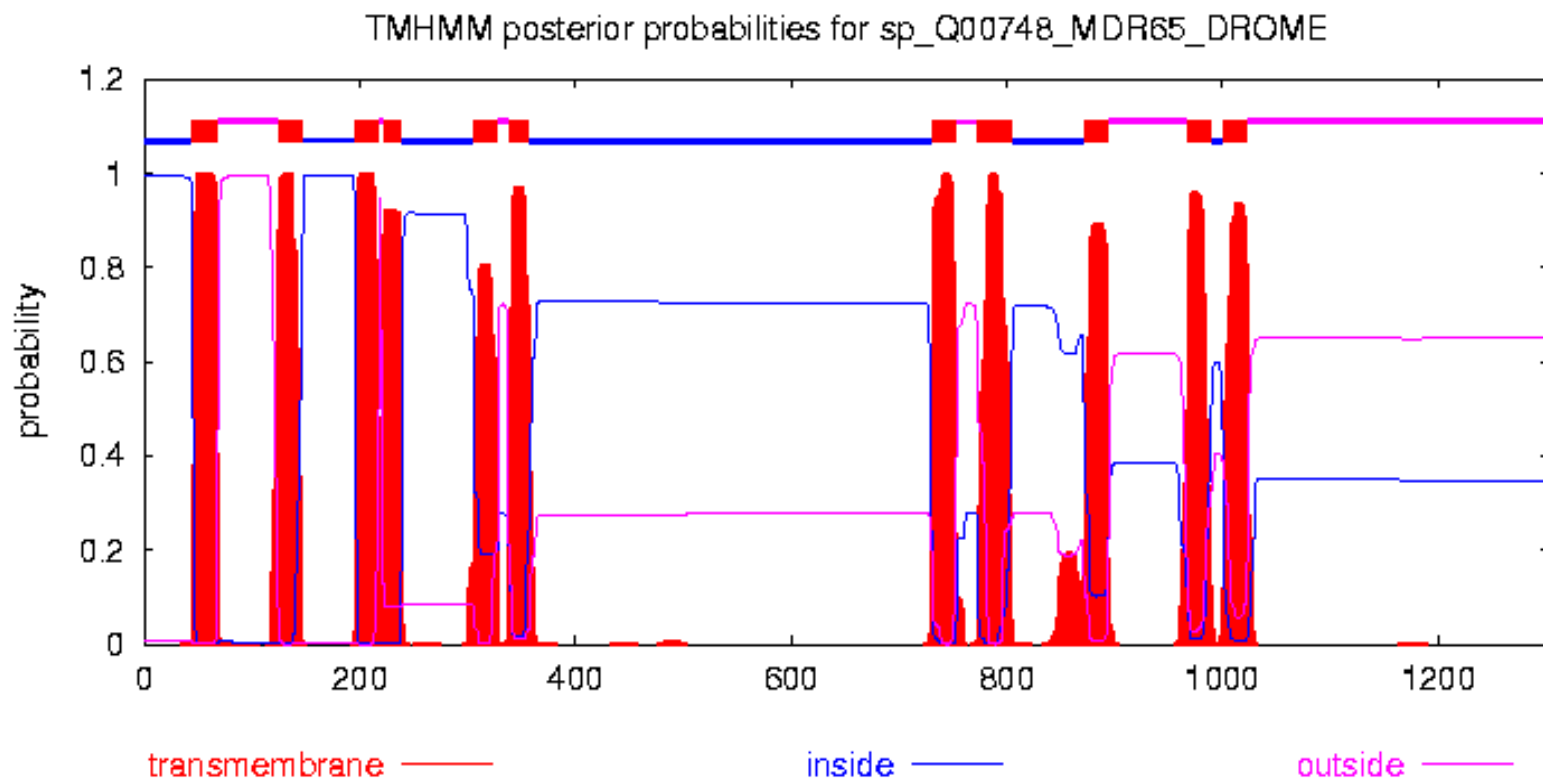
2.2 Protein analysis

- 跨膜区预测 (TMHMM 、 tmap)
- 氨基酸序列的分析 (dotmatcher)
- 蛋白质结构的观察
(PDBSUM、 Swiss-Pdbviewer)

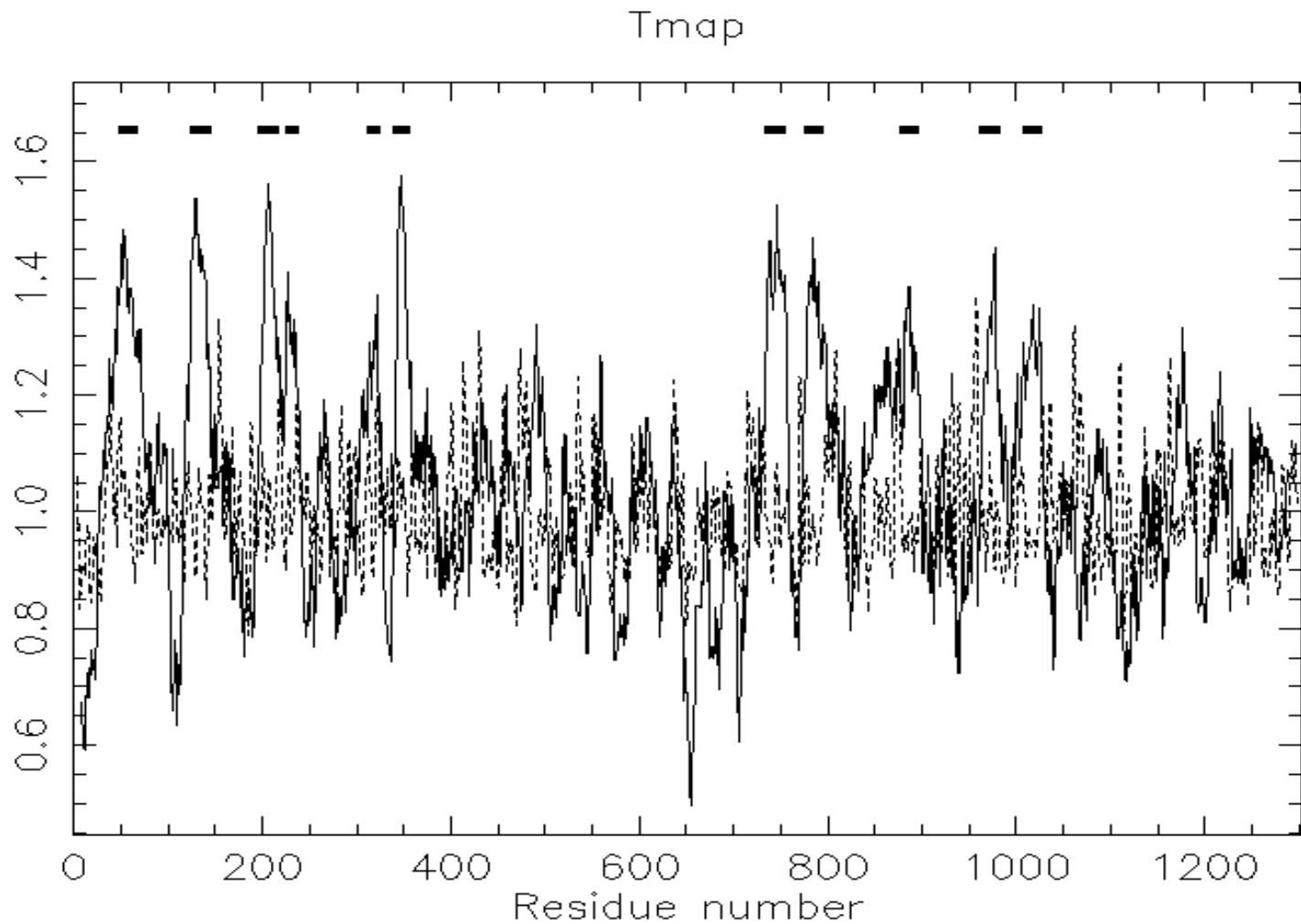
跨膜区预测

- Uniprot中搜索果蝇的P-glycoprotein序列，得到序列号为Q00748，长度为1302AA。
- 用TMHMM、tmap、DNAMAN预测跨膜区

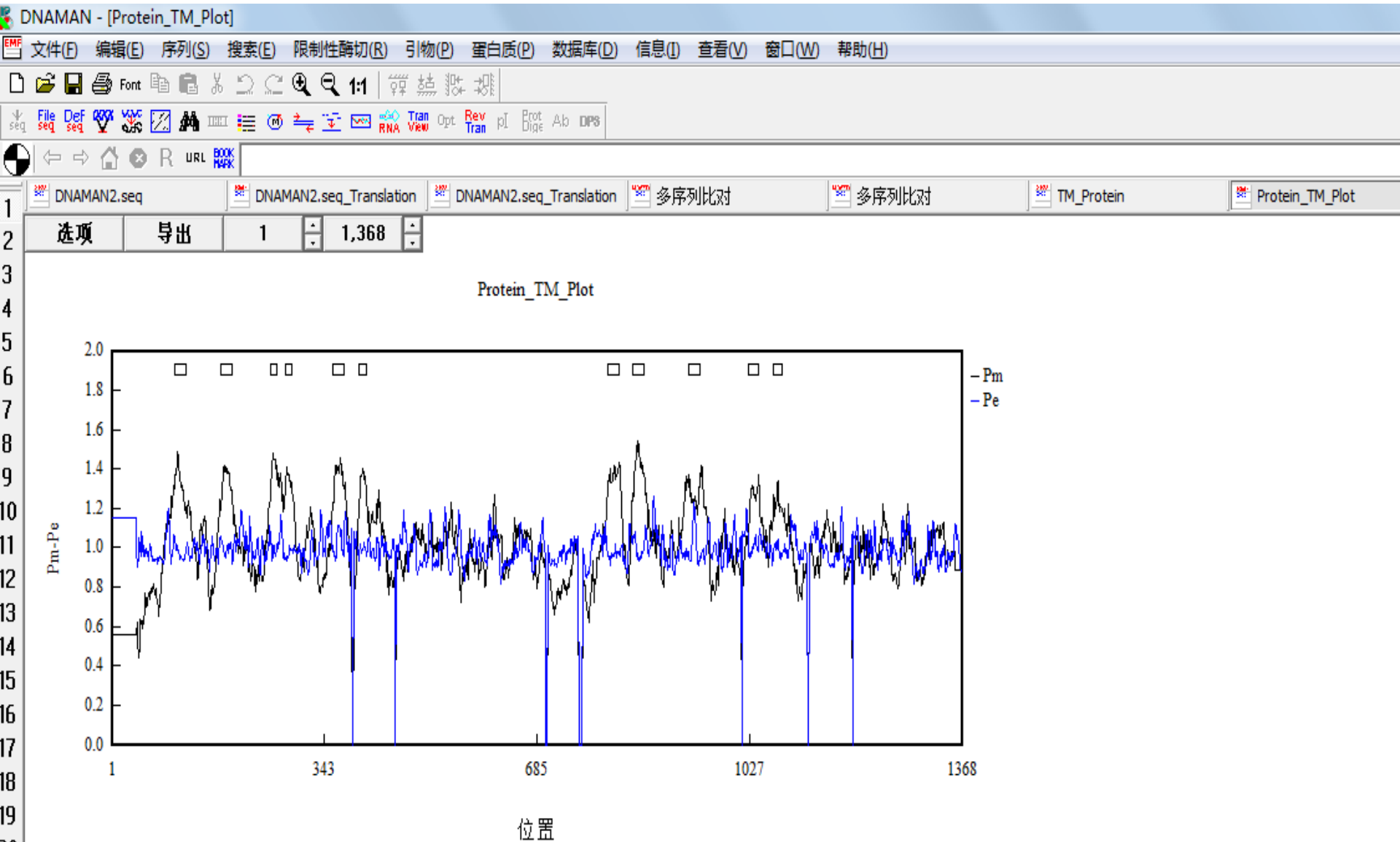
用TMHMM预测跨膜区结果



用tmap预测跨膜区结果



DNAMAN预测结果





1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Predicted transmembrane segments for the alignemnt

- # 1: 97 - 125 29aa
- # 2: 171 - 199 29aa
- # 3: 251 - 271 21aa
- # 4: 276 - 296 21aa
- # 5: 351 - 379 29aa
- # 6: 394 - 416 23aa
- # 7: 794 - 822 29aa
- # 8: 833 - 861 29aa
- # 9: 923 - 951 29aa
- #10: 1019 - 1045 27aa
- #11: 1060 - 1084 25aa

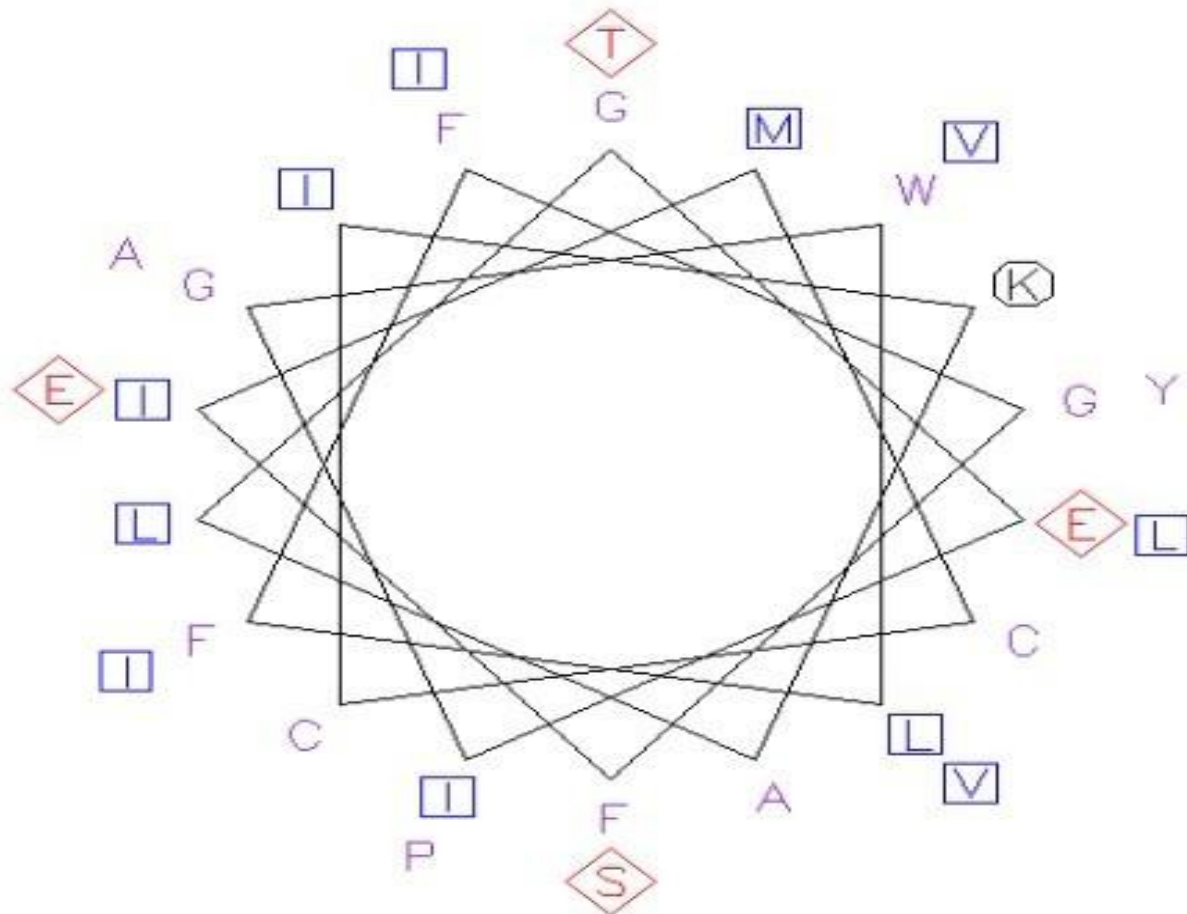
11个跨膜区序列

- 1 GEIGWLFFGFIMCCIKALTLPAVVIIYSE
- 2 YGILLTIASVVMFISGIFSVDVFNMVALR
- 3 ISEKVGHFVYLVVGFIIITVAISFSYGWKL
- 4 TLAVSSYIPLVILLNYYVAKFQ
- 5 LKSMLYLSCAGAFWYGVNLII
- 6 NKEYTPAILMIAFFGIIVGADNIART
- 7 CYLILGTISAVAVGFLYPAFVIFGEFYA
- 8 RTAVLSWACLGLAFLTGLVCFLQTYLFNY
- 9 YYNWKLALLCLANCPHIVGSVILEAKMMS
- 10 RGVLNSTMQASAFFAYAVALCYGGVLVSE
- 11 YGSMMLAQSLAFTPAFSAALIAGHRLFQI

用pepwheel工具做螺旋轮

Helical wheel of raw::509408

Fri 17 Feb 2012 19:47:57



结论

用三种软件预测P-glycoprotein的跨膜区，结果一致，为11个跨膜部位。

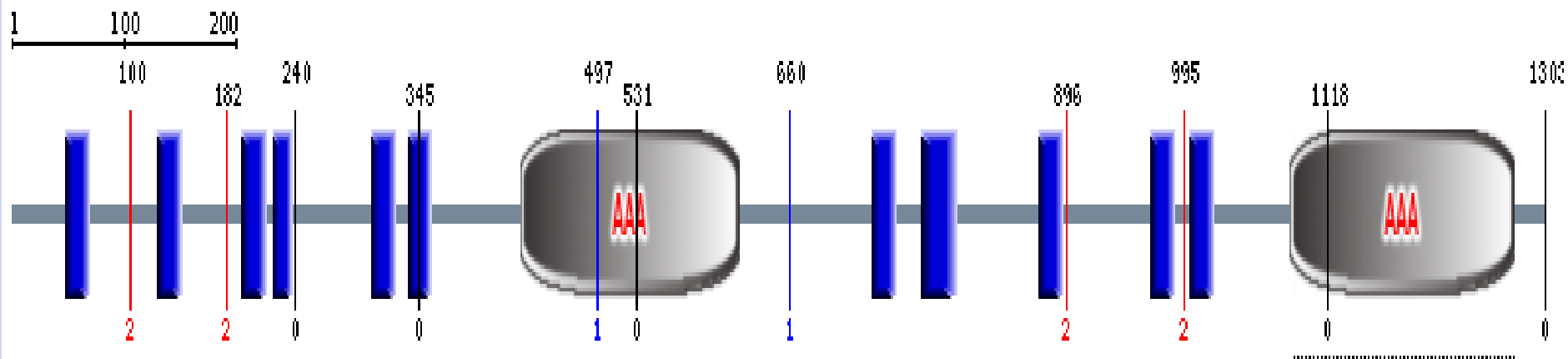
SMART 分析蛋白质



[SETUP](#) [FAQ](#) [ABOUT](#) [GLOSSARY](#) [WHAT'S NEW](#) [FEEDBACK](#)

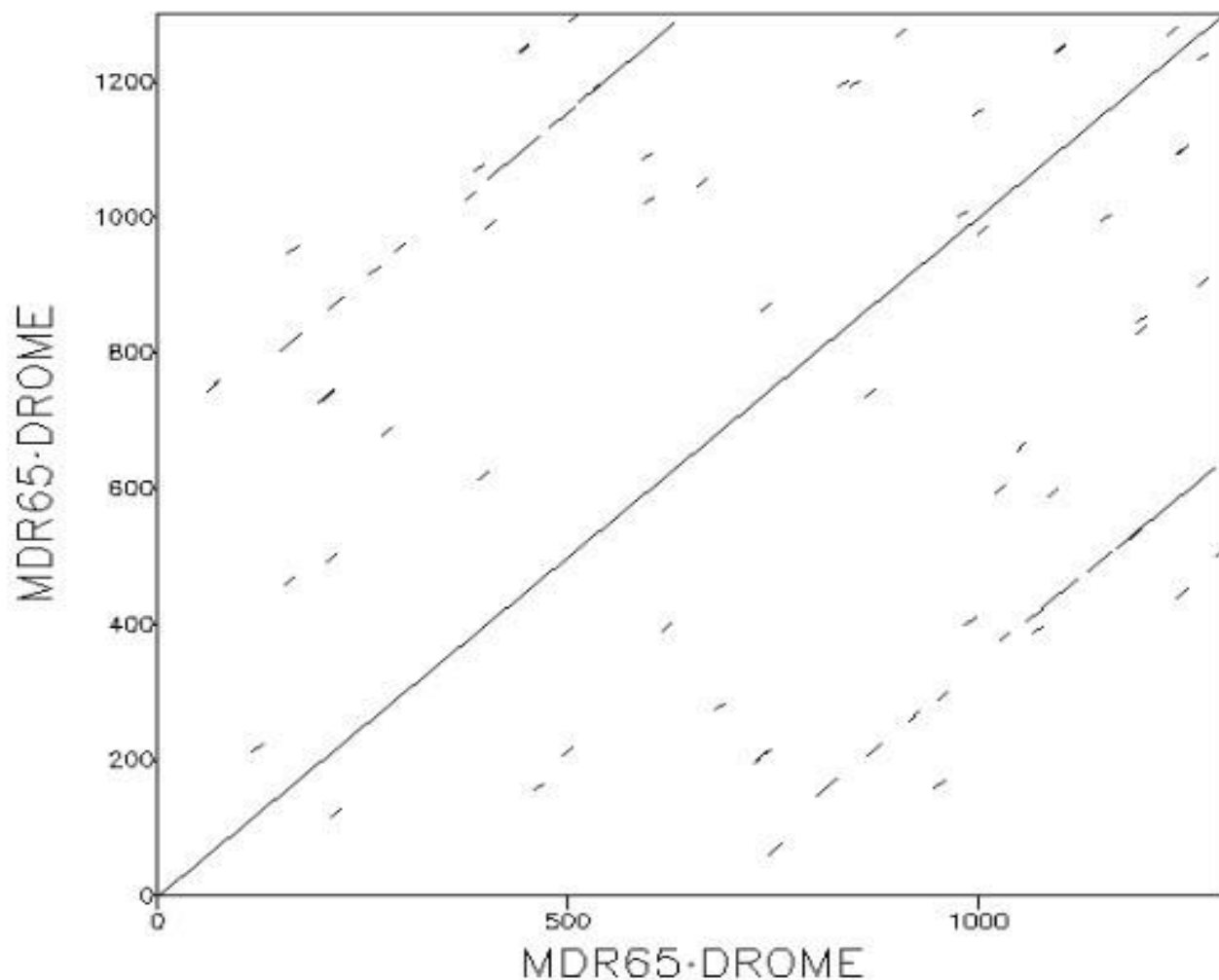
Domains within *Drosophila melanogaster* protein MDR65_DROME (Q00748)

Multidrug resistance protein homolog 65



Dotmatcher 分析结果

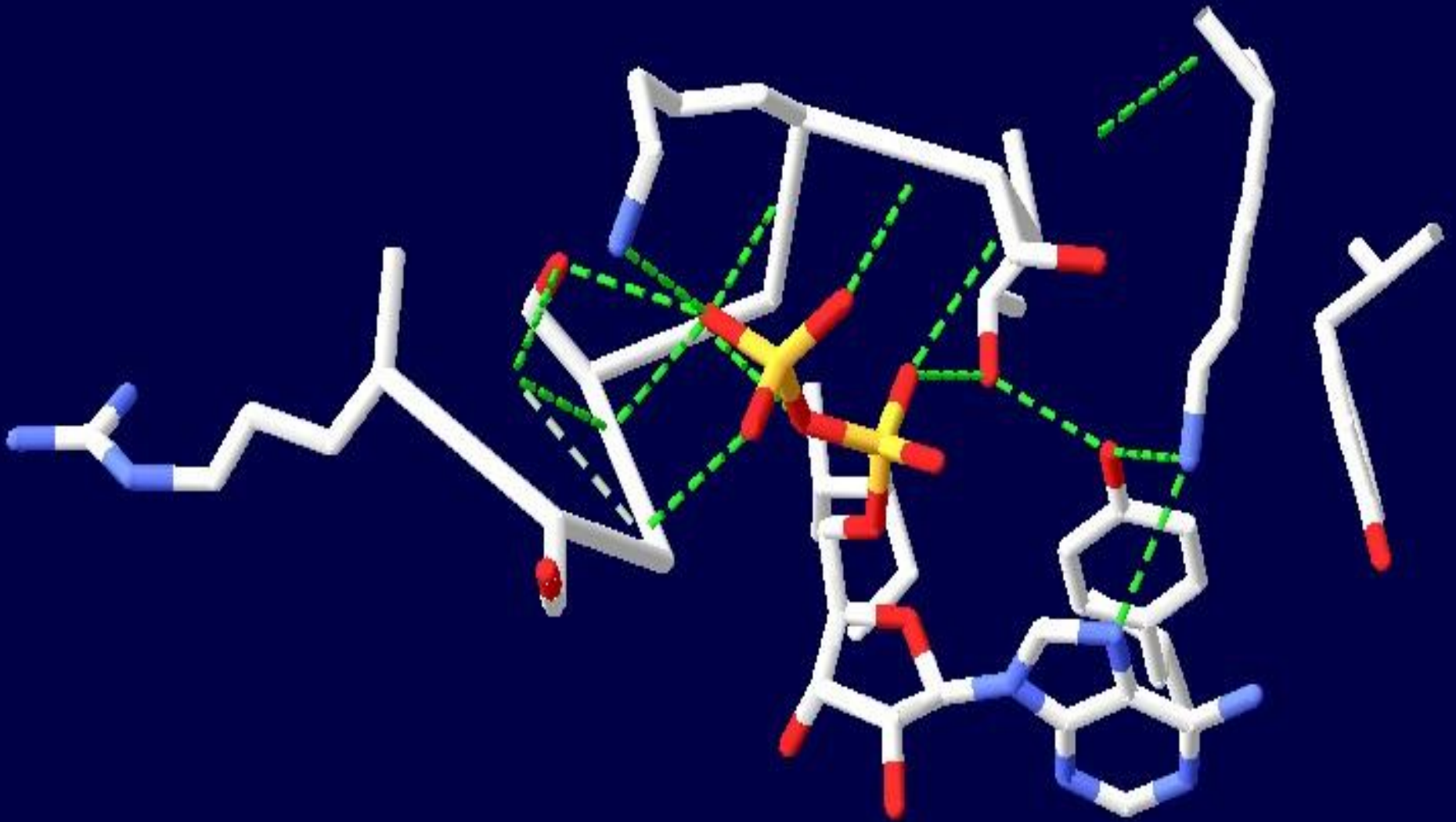
Dotmatcher: fasta::509405:MDR65-DROME vs fasta::509405:M..
(window size = 10, threshold = 23.00 18/02/12)



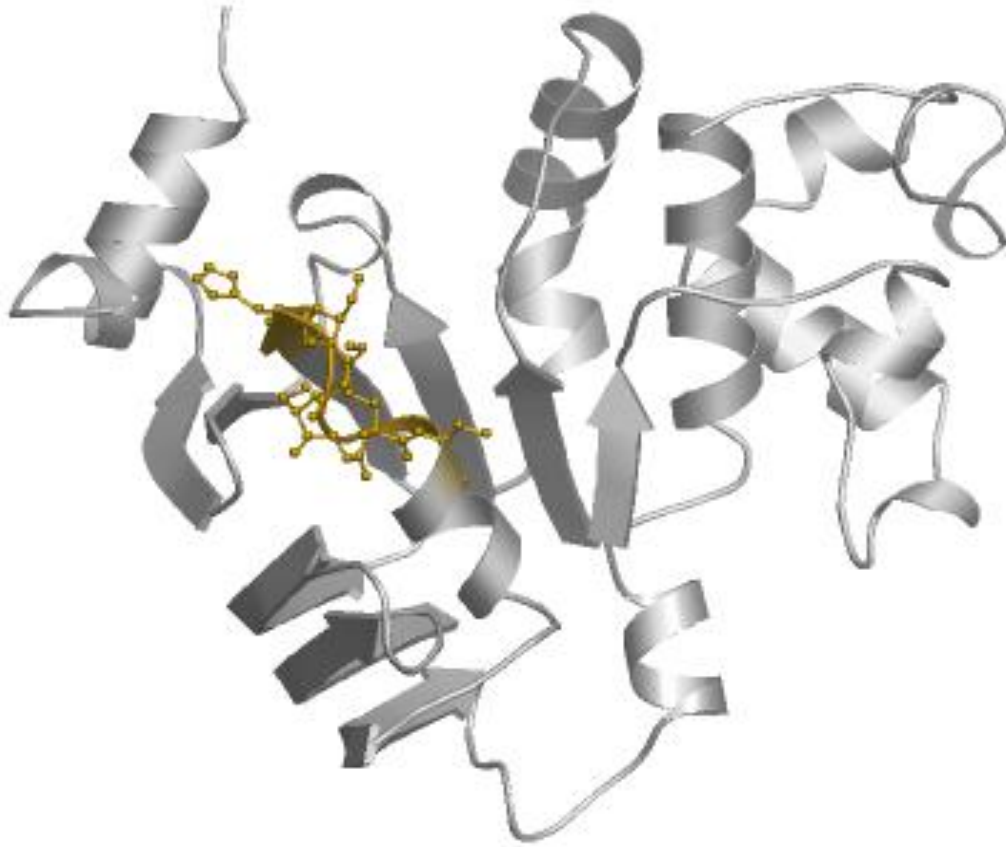
PDBSUM

pdb号: 2ff7

Swiss-Pdbviewer



SWISS-MODEL



Based on template: 2ff7
Sequence identity: 45%



3 The first stage of experiment

- 由于小菜蛾的Pgp基因序列未知，所以采用同源克隆此基因。
- 在UniProt、NCBI中获得已知昆虫的Pgp氨基酸和核酸序列，通过ClustalX、MEGA、DNAMAN多个软件进行比对，获得保守区，进而设计简并引物，用于扩增cDNA。

Mode: Multiple Alignment Mode Font: 18

- Chrysomela
- Tribolium
- Camponotus
- Drosophila
- Onchocerca

..* : :* * *****:::* ***** ** ** * . **:::**

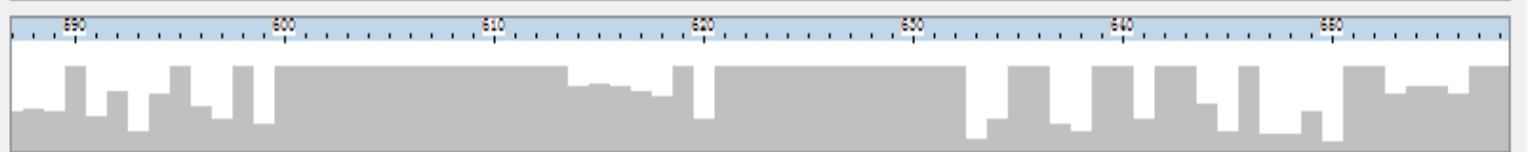
PNGYNTLVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRKPSILLLDEATSALDNNSEAKVQAALDSASVDC TTVIVAHR

PSGYDTLVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPAILLLDEATSALDTNSEAKVQAALDKASKGCTTVIVAHR

PEGYDSPVGERGSQLSGGQKQRIAIARALVRNPAILLLDEATSALDVHSEATVQKALDAAAKGRTTIIIVSHR

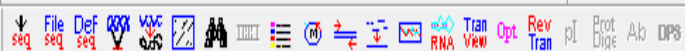
PESYRSMIGERGSQLSGGQKQRIAIARALIQNPKILLLDEATSALDYQSEKQVQALDLASKGRTTIVVSHR

SEGYDTMIGAGGIQLSGGQKQRIAIARTIVRNPRILLLDEATSALDAESEVIVQNALKKAFVGR TTI I I AHR



Data Display Search Highlight Statistics Help

	G	S	Q	L	S	G	G	Q	K	Q	R	I	A	I	A	R	A	L	V	R	N	P	A	I	L	L	L	D	E	A	T	S	A	L	D	V	H	S	E	A	T	V	C											
<input checked="" type="checkbox"/> 1. <i>Camponotus_floridanus</i>				
<input checked="" type="checkbox"/> 2. <i>Chrysomela_tremula</i>	.	A	K	.	S		
<input checked="" type="checkbox"/> 3. <i>Drosophila_melanogaste</i>	I	Q	.	.	K		
<input checked="" type="checkbox"/> 4. <i>Onchocerca_volvulus</i>	.	I	T	I		
<input checked="" type="checkbox"/> 5. <i>Tribolium_castaneum</i>	.	A



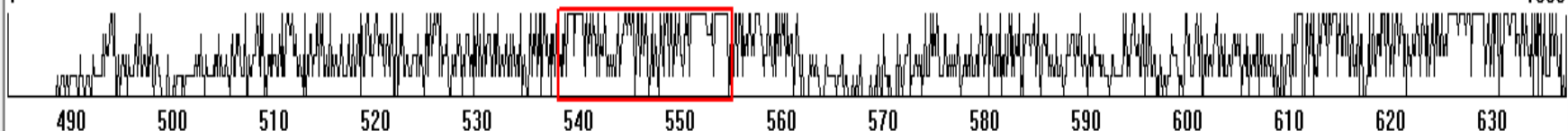
DNAMAN2.seq DNAMAN2.seq_Translation DNAMAN2.seq_Translation 多序列比对 多序列比对

选项

输出

一致性= 56.45%

1368



ADC97877.1	LDIRAGDTVALVGS SGGCKSTVIQLIQRFYDFVAGEVSLDGKNIKDLDLTWMRTNIEVVGQEPVLEGGTTIMENIKYGNADATEDDVVVAARKKAHTFIKSLPNGYNTLVGERGQLSGGQKQRIAIARALVRKESILLLDEATSALDNNSEAK
001810982.1	LDIKAGDTVALVGS SGGCKSTCIQLIQRFYDFVAGEVSLDGKNLKFDDLTLWRNNIEVVGQEPVLEGGTTIAENIRYGNASKTDEEIKNAIKAAHEFIKSLPSCYDILVGERGQLSGGQKQRIAIARALVRNEAILLLDEATSALDINSBAK
EFN62270.1	LKINRGETVALVGS SGGCKSTCIQLIQRFYDFVAGEVSLDGADVSTLNVCWLRSHIEVVGQEPVLEGGTTIRENIRYGNDSITEEMIRAAKKAHTFIKSLPSCYDILVGERGQLSGGQKQRIAIARALVRNEAILLLDEATSALDVHSEAT
AAF69147.1	IRIRAGDTVALVGS SGGCKSTCVQLIQRFYDFVAGEVSLDLDIRKYNIQWLRSNIAVVGQEPVLEGGTTIAQNISYCKPGETQKEIEAATQAGAHDFITNLPESYRSMIGERGQLSGGQKQRIAIARALIQNEKILLLDEATSALDYQSEKQ
AAD49436.1	WTAKGDTVALVGS SGGCKSTSTGLLIRLYNCNSGAILLDGINICDINIHTLRNIEVVGQEPVLEGGTTIKENIRLGLDLTDQEIIDACKIAVAHDFINRSLSEYDITMIGAGGQLSGGQKQRIAIARTIVRNERILLLDEATSALDAESBVI

- **More work in the lab is needed.**
- **Experiment is on the way.**



致 谢

首先，感谢罗老师对我们的指导！

其次，感谢师兄师姐对于我们的帮助！

最后，感谢班里各位同仁的交流和帮助！

感谢十组的全体组员

大家辛苦了，也进步了！

Thank you for your attention !

