

亚油酸及其甲酯与大豆脂氧酶的分子对接

曹明辉¹, 陆益鑫², 郭旭¹, 田丹^{1*}, 葛存旺^{1*}

¹南通大学化学化工学院, 江苏 南通

²南通市海门实验学校, 江苏 南通

收稿日期: 2023年8月10日; 录用日期: 2023年11月1日; 发布日期: 2023年11月8日

摘要

采用Discovery Studio软件, 选取大豆脂氧酶LOX-1为模板和代表性底物亚油酸及其甲酯进行分子对接, 得到对接之后的结合能等变化的具体数据, 观察甲酯基的引入对底物分子与脂氧酶蛋白质受体的相互作用的改变, 并与实验结果进行比较, 为脂氧酶与底物分子的结合模式研究积累数据。氢过氧化亚油酸的产率在pH9和pH6条件下分别为58.6%和28.5%, 而氢过氧化亚油酸甲酯的产率分别为14.2%和16.8%。分子对接结果表明LOX-1与亚油酸结合更稳定, 反应活性更高, 与实际实验结果相符。

关键词

脂氧合酶, 分子对接, 分子模拟, 亚油酸

Molecular Docking of Linoleic Acid and Its Methyl Ester with Soybean Lipxygenase

Minghui Cao¹, Yixin Lu², Xu Guo¹, Dan Tian^{1*}, Cunwang Ge^{1*}

¹School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

²Nantong Haimen Experimental School, Nantong Jiangsu

Received: Aug. 10th, 2023; accepted: Nov. 1st, 2023; published: Nov. 8th, 2023

Abstract

Using Discovery Studio software, soybean lipoxygenase-1 was selected as a template, along with the representative substrate linoleic acid and its methyl ester, for molecular docking. Specific data on changes in binding energy and other parameters after docking were obtained. The changes in the interaction between substrate molecules and lipoxygenase protein receptors caused by the

*通讯作者。

introduction of methyl groups were observed and compared with experimental results, accumulating data for the study of the binding mode between lipoxygenase and substrate molecules. The yield of hydrogen peroxide linoleic acid was 58% and 27% under pH 9 and pH 6 conditions, respectively, while the yield of methyl hydrogen peroxide linoleic acid was 11% and 15%, respectively. The molecular docking results indicate that LOX-1 binds more stably to linoleic acid and has higher reaction activity, which is consistent with the actual experimental results.

Keywords

Lipoxygenase, Molecular Docking, Molecular Simulation, Linoleic Acid

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脂肪氧合酶是一种能催化氧化多不饱和脂肪酸(亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸)及其酯的普遍存在于真菌、动植物界的酶,其催化过程的产物是氢过氧化脂肪酸或酯[1]。脂氧合酶是机体的一部分,它对促进炎症的反应起着关键的作用,而炎症是一种与癌症、脑卒中、心血管及神经退化有关的病症[2] [3]。脂氧合酶在植物贮存过程中会产生能改变食品特性的芳香化合物,进而可能会引起食物的变质[4] [5]。

亚油酸是脂氧酶最为理想的底物,主要的催化机理也是基于亚油酸提出的,并且获得了优化的反应条件和满意的产率。对亚油酸以外的可识别底物(如甘油酯、磷酸酯和油酸等),研究只是证实了 LOX 催化它们的可行性,多作为动植物体内的一种代谢路线进行研究。至于脂氧酶对这些底物的催化活性和最终产率,则少有研究或结果很不理想[6] [7]。脂氧酶与这些底物分子的结合模式和催化机理尚不明确,这些限制了脂氧酶催化机理的进一步阐明和更好的利用[8] [9]。

Discovery Studio 是一款综合应用于生命科学预测领域的软件,集成了目前分子模拟领域的各种经典、先进算法及高质量的图形界面。在 DS 软件中,最适合于酶这类生物大分子与底物小分子进行分子对接的为 CDOCKER 模块[10] [11] [12]。CDOCKER 模块是基于 CHARMm 的柔性对接程序,利用软核和选择性重定向技术,实现配体与受体之间的连接。先将小分子结构采用分子动力学的方法进行随机搜索,再在受体的活性位置对小分子的结构构象进行处理,这样使得分子对接的结果越加精确。该软件的 View Interaction 模块可以查看底物分子与脂氧酶蛋白质受体的相互作用方式。

本文选择大豆脂氧酶 LOX-1 为研究模板。LOX-1 不仅纯度高,而且热稳定性相对较好。脂肪氧合酶 LOX-1 的 3D 结构如图 1 所示。选择亚油酸、亚油酸甲酯为底物,考察两者与脂氧酶反应的活性差异。利用计算模拟技术将亚油酸、亚油酸甲酯与大豆脂氧酶 LOX-1 进行分子对接,得到对接之后的结合能等变化的具体数据,观察甲酯基的引入对底物分子与脂氧酶蛋白质受体的相互作用方式的改变,为脂氧酶与底物分子的结合模式研究积累数据。

2. 实验部分

2.1. 实验试剂与仪器

大豆脂肪氧合酶 LOX-1 (70,600 U/mg, Sigma); 亚油酸(苏州乳化剂厂, 66.7%), 亚油酸乙酯(99%); 二甲酚橙(AR, 上海试剂三厂); 过氧化氢异丙苯(80%, Sigma); 硼酸, 硼砂, 氢氧化钠, 2,6-叔丁基-4-甲

基酚(BHT), 邻苯二甲酸氢钾(基准试剂), 浓硫酸(98%), 乙醚, 无水乙醇, 甲醇, 六水合硫酸亚铁铵, 均为 AR 级(国药集团化学试剂有限公司), 紫外可见分光光度计(TU-1901, 北京普析通用)。

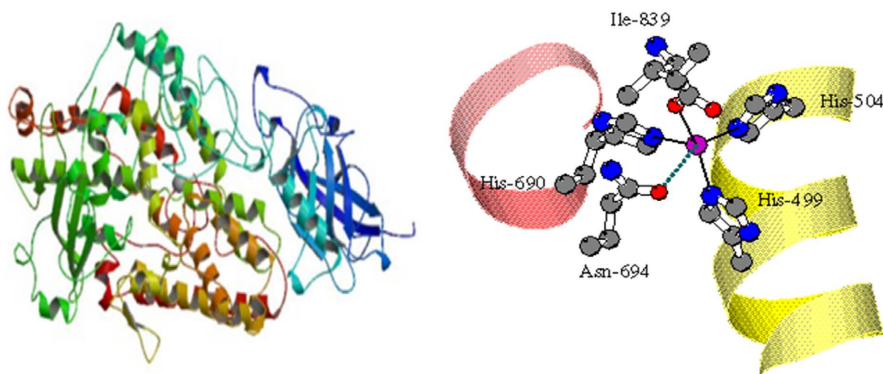


Figure 1. Schematic diagram of the three-dimensional structure and active centers of soybean lipoxygenase-1 (PDBID: 1YGE)
图 1. 大豆脂肪氧合酶 LOX-1 的三维结构和活性中心示意图(PDBID: 1YGE)

2.2. 实验方法

2.2.1. 脂氧酶活测定

LOX 活性在 234 nm 处用分光光度法测定。根据 Surrey 方法制备底物亚油酸溶液[13]。酶活定义为在 25℃, pH9.0 条件下, 以亚油酸为底物, 3 mL 反应体系每分钟在 234 nm 处增加的吸光度 0.001 对应一个酶活单位。

2.2.2. 脂氧酶好氧催化反应

在气/液反应器中以 0.5 mL 乙醇和 pH9 的磷酸缓冲液稀释 1.5 g 亚油酸, 于 15℃ 恒温水浴中预热 5 min 后, 通入 15 mL/min 氧气 5 min, 再加入 8 mL 酶活为 1.5×10^5 的 LOX-1 溶液(溶解于 0.1 M pH9 的硼砂缓冲液)。反应 120 min 后用 1 mol/L 硫酸调节 pH 至 3, 用乙醚萃取三次得粗产物。空白样品(自动氧化)是在相同的条件下, 利用不含底物的脂氧酶溶液进行反应。每个转化反应重复进行两次, 结果取两个独立实验的平均值。考察 pH6 下的脂氧酶催化反应时, 采用 0.1 M pH6 的磷酸缓冲液, 其余条件不变。采用二甲酚橙法测定氢过氧化亚油酸和氢过氧化亚油酸甲酯的含量[14]。

2.2.3. 分子对接

从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)上下载得到底物亚油酸和亚油酸甲酯的 SDF 结构式。用 Discovery Studio 对亚油酸、亚油酸甲酯进行补全 H 原子和施加力场等优化。通过 PDB 蛋白质数据库得到脂氧酶 1YGE 的三维结构数据, 去除蛋白质当中的结晶水, 自动补全缺失的 H。确定最终活性位点并利用 CDOCKER 模块对底物小分子和脂氧酶进行对接, 获得对接数据。实验记录 CDOCKER-ENERGY、是否存在氢键作用以及氢键的键长和键角。采用 3D 条带图和 2D 显示图将对接结果可视化。

3. 实验结果

3.1. 脂氧酶 LOX-1 催化亚油酸及其甲酯的反应

以亚油酸为底物时脂氧酶 LOX-1 催化反应的最佳 pH 范围为 9~10。而亚油酸酯为底物的情况下, LOX-1 的最佳反应 pH 为 6~7。说明 pH 的改变导致酶蛋白的微环境发生了改变, 致使 LOX 催化行为也发生了变化。体系 pH 值会影响酶的构象以及解离状态, 酸性条件下 LOX 的构象更有利于与脂肪酸酯类底物的结合[8]。本实验在 pH 6 和 pH 9 的条件下考察了脂氧酶催化亚油酸、亚油酸甲酯的反应, 结果如

图 2 所示。pH 9 时氢过氧化亚油酸的产率为 58.5%，而氢过氧化亚油酸甲酯的产率为 14.2%。pH 6 时氢过氧化亚油酸的产率大幅下降为 28.6%，而氢过氧化亚油酸甲酯的产率略升高为 16.8%。亚油酸较亚油酸甲酯与 LOX-1 的反应活性更强，推测其与 LOX-1 络合成的反应中间体更为稳定。

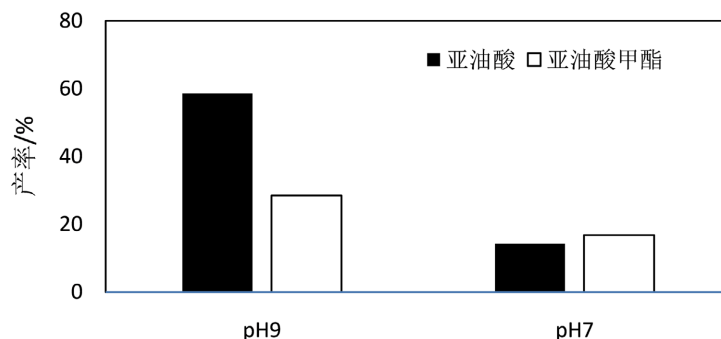
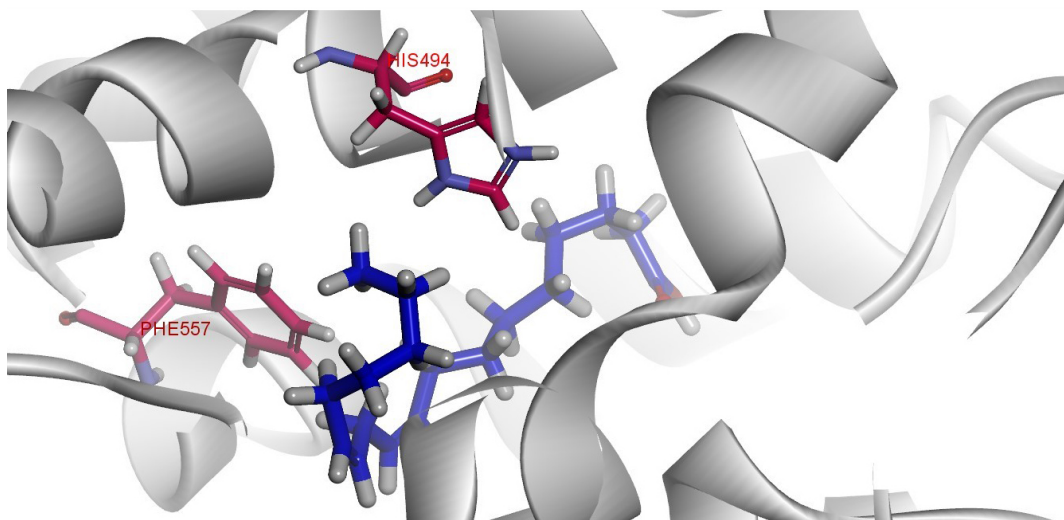


Figure 2. Lipoxygenase-1 catalyzes the reaction of linoleic acid and methyl linoleic acid
图 2. 脂氧酶 LOX-1 催化亚油酸、亚油酸甲酯的反应

3.2. 亚油酸与脂氧酶 LOX-1 的分子对接图

使用 Discovery Studio 2019 软件中的 CDOCKER 模块完成分子对接。首先将亚油酸载入到 DS 软件中，将大豆脂氧酶蛋白质 LOX-1 定义为受体分子，利用 Tools 模块寻找受体中的结合位点。通过 View Interaction 模块查看亚油酸小分子与蛋白质受体 LOX-1 的相互作用方式。

亚油酸与大豆脂氧酶 LOX-1 的分子对接结果如图 3 (3D 条带显示图)和图 4 (2D 作用图)所示。绿色部分为参与范德华力作用的氨基酸，亚油酸与脂氧酶 LOX-1 的 VAL354, GLN697, HIS499, LEU546, HIS504 和 TRP500 等 22 个氨基酸残基有范德华相互作用。SER491 和 GLN697 参与极性作用，ARG707 和 HIS494 参与电荷作用。LOX-1 和亚油酸复合物的稳定性由上述这些作用力共同维系。该结果与之前文献报道基本相符[7]。



红色结构模型为脂氧合酶上的氨基酸残基，由红色字体标注出氨基酸残基名称；蓝绿色部分为脂氧合酶大分子模型；蓝色部分为亚油酸结构模型。

Figure 3. Structural model of soybean lipoxygenase-1 and linoleic acid complex
图 3. 大豆脂氧合酶 LOX-1 和亚油酸复合物的结构模型

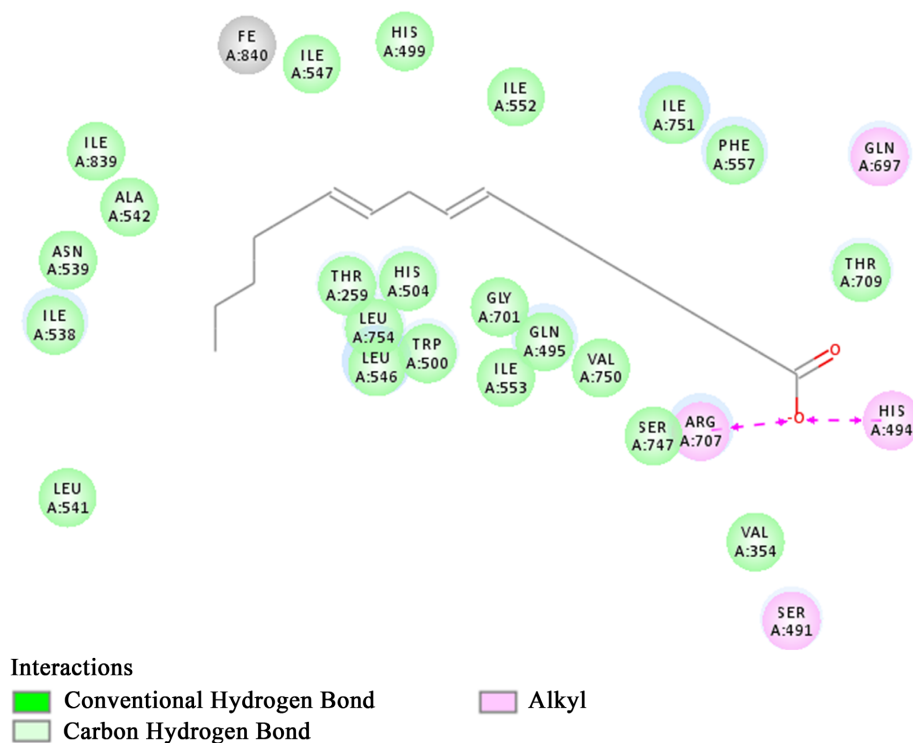
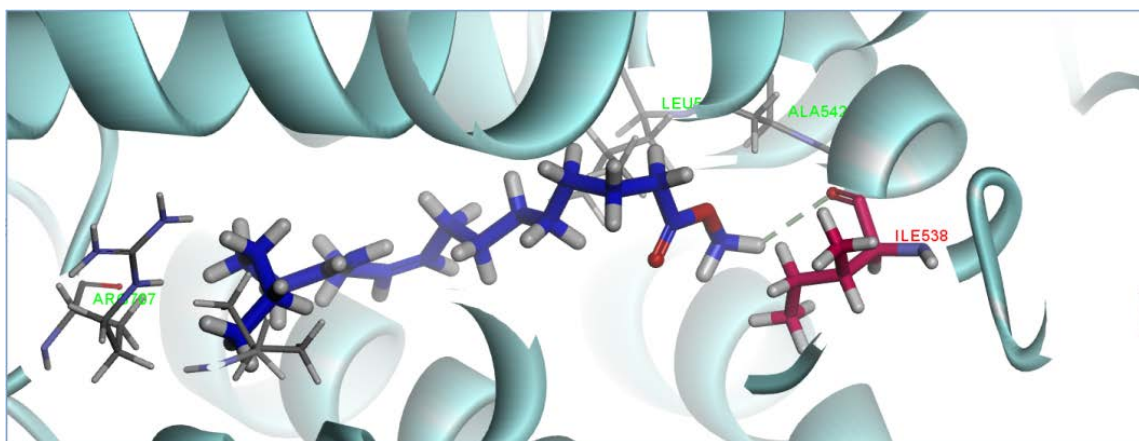


Figure 4. 2D docking diagram of soybean lipoxygenase-1 and linoleic acid

图 4. 大豆脂氧酶 LOX-1 和亚油酸的 2D 对接作用图

3.3. 亚油酸甲酯与脂氧酶 LOX-1 的分子对接图

亚油酸甲酯与大豆脂氧酶 LOX-1 的分子对接结果如图 5 (3D 条带显示图)和图 6 (2D 作用图)所示。在亚油酸甲酯与 LOX-1 发生相互作用的过程中,有 LEU541、HIS499 和 GLY701 等 24 个氨基酸残基与亚油酸甲酯之间存在范德华相互作用力,氨基酸残基 SER491、HIS494 和 ARG707 与亚油酸甲酯之间存在碳氢键,氨基酸 ARG707 与其存在氢键作用。



红色结构模型为脂氧合酶上的氨基酸残基,由红色字体标注出氨基酸残基名称;蓝绿色部分为脂氧合酶大分子模型;蓝色部分为亚油酸结构模型。

Figure 5. Structural model of soybean lipoxygenase-1 and methyl linoleate complex

图 5. 大豆脂氧酶 LOX-1 和亚油酸甲酯复合物的结构模型

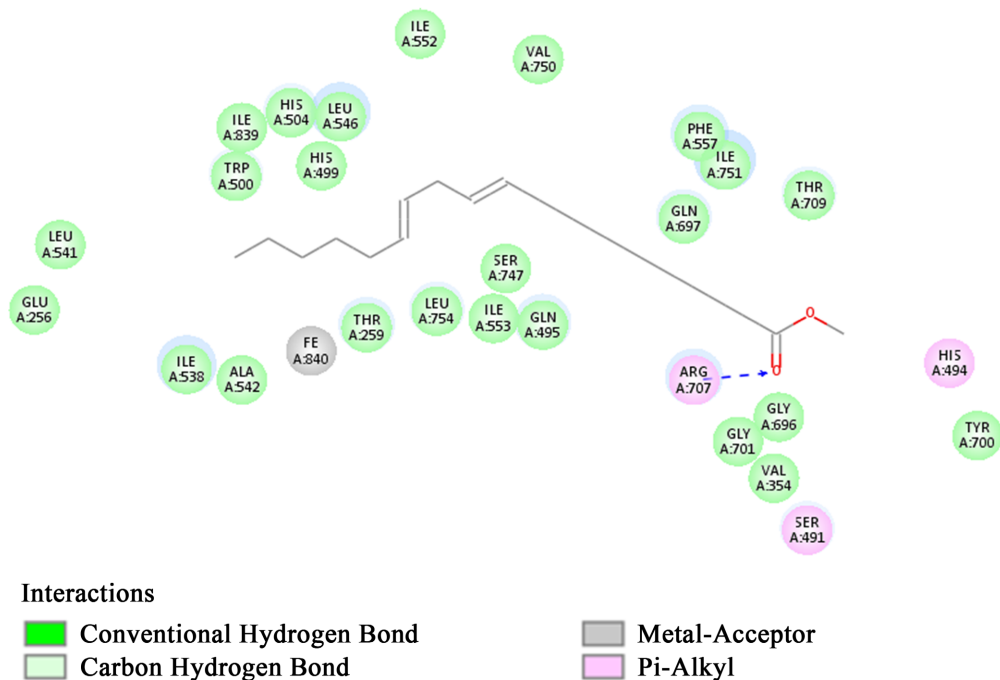


Figure 6. 2D docking diagram of soybean lipoxygenase-1 and methyl linoleate
图 6. 大豆脂氧酶 LOX-1 和亚油酸甲酯的 2D 对接作用图

3.4. 对接结果分析

表 1 为亚油酸、亚油酸甲酯与亚油酸与 LOX-1 的对接结果，包括 CDOCKER 结合能、氢键的键长和键角。亚油酸与 LOX-1 分子形成的复合物具有的 CDOCKER 能为-37.60 kJ/mol，并在活性点位产生 1 个分子间氢键。通过调出 Ligand Interactions 功能，打开键的类型与键长显示，亚油酸上的 O1 作为电子供体与 ARG707 上的 H 原子形成的氢键键长为 1.98 Å，键角为 157.4°。亚油酸甲酯与脂氧酶蛋白发生相互作用具有的 CDOCKER 能为-57.69 kJ/mol，有 2 个分子间氢键，亚油酸甲酯上的 O2 作为电子供体与 ARG707 上的 H 原子形成的氢键键长分别为 1.85 Å 和 1.96 Å，键角分别为 141.1°和 137.5°。这些氢键作用力可以很好帮助底物小分子结合在脂氧酶蛋白上。

Table 1. Docking results of linoleic acid, methyl linoleate and soybean lipoxygenase LOX-1
表 1. 亚油酸、亚油酸甲酯与大豆脂氧酶 LOX-1 对接结果

对接物质	CDOCKER-energy (kJ/mol)	氢键	键长(Å)	键角(θ)
亚油酸	-37.60	A:ARG707:HH21 - Lonleic acid:O1	1.98	157.4
		A:ARG707:HE - Methyl lionleate:O2	1.85	141.3
亚油酸甲酯	-57.69	A:ARG707:HH21 - Methyl lionleate:O2	1.96	137.5

4. 结论

本实验在 pH6 和 pH9 的条件下考察了脂氧酶催化亚油酸、亚油酸甲酯的反应。氢过氧化亚油酸的产率在 pH9 和 pH6 条件下分别为 58.5%和 28.6%，而氢过氧化亚油酸甲酯的产率分别为 14.2%和 16.8%。运用 Discovery Studio 2.5 的 CDOCKER 分子对接模块研究 LOX-1 与亚油酸、亚油酸甲酯的对接情况，两

者的 CDOCKER 结合能分别为-37.60 kJ/mol 和-57.69 kJ/mol。说明 LOX-1 与亚油酸结合更稳定, 反应活性也更高, 与实际实验结果相符。此外, 亚油酸及其甲酯与脂氧酶 LOX-1 作用过程产生氢键。

参考文献

- [1] Offenbacher, A.R. and Holman, T.R. (2020) Fatty Acid Allosteric Regulation of C-H Activation in Plant and Animal Lipxygenases. *Molecules*, **25**, Article 3374. <https://doi.org/10.3390/molecules25153374>
- [2] Dominik, K., Martin, G. and Martin, R. (2021) Engineering a Lipxygenase from Cyclocybe Aegerita towards Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *AMB Express*, **11**, Article No. 37. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01195-8>
- [3] Perry, S.C., Kalyanaraman, C., Tourdot, B.E., et al. (2020) 15-Lipxygenase-1 Biosynthesis of 7S,14S,-Dihdha Implies 15- Lipxygenase-2 in Biosynthesis of Resolvin D5. *Journal of Lipid Research*, **61**, 1087-1103. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000777>
- [4] Tsai, W.-C., Kalyanaraman, C., Yamaguchi, A., et al. (2021) In Vitro Biosynthetic Pathway Investigations of Neuroprotectin D1 (NPD1) and Protectin DX (PDX) by Human 12-Lipxygenase, Lipxygenase-1, and 15-Lipxygenase-2. *Biochemistry*, **60**, 1741-1754. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00931>
- [5] 高雨婷, 钱建瑛, 史劲松, 等. 大豆脂肪氧合酶的粗提取及其强化乳香风味的研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(21): 90-96. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030445>
- [6] Lončarić, M., Strelec, I., Moslavac, T., et al. (2021) Lipxygenase Inhibition by Plant Extracts. *Biomolecules*, **11**, Article 152. <https://doi.org/10.3390/biom11020152>
- [7] Zaragoza, J.P.T., Nguy, A., Minnetian, N., et al. (2019) Detecting and Characterizing the Kinetic Activation of Thermal Networks in Proteins: Thermal Transfer from a Distal, Solvent-Exposed Loop to the Active Site in Soybean Lipxygenase. *Journal of Physical Chemistry B*, **123**, 8662-8674. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07228>
- [8] Jin, J., Boeglin, W.E. and Brash, A.R. (2021) Analysis of 12/15-Lipxygenase Metabolism of EPA and DHA with Special Attention to Authentication of Docosatrienes. *Journal of Lipid Research*, **62**, Article 100088. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100088>
- [9] Pang, C., Liu, S., Zhang, G., et al. (2022) Enhancing Extracellular Production of Lipxygenase in Escherichia Coli by Signal Peptides and Autolysis System. *Microbial Cell Factories*, **21**, Article No. 42. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01772-x>
- [10] Fox, J.M., Zhao, M., Fink, M.J., et al. (2018) The Molecular Origin of Enthalpy/Entropy Compensation in Biomolecular Recognition. *Annual Review of Biophysics*, **47**, 223-250. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033743>
- [11] Tsai, W.-C., Aleem, A.M., Whittington, C., et al. (2021) Mutagenesis, Hydrogen-Deuterium Exchange, and Molecular Docking Investigations Establish the Dimeric Interface of Human Platelet-Type 12-Lipxygenase. *Biochemistry*, **60**, 802-812. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00053>
- [12] Abdelsattar, A.S., Dawoud, A. and Helal, M.A. (2021) Interaction of Nanoparticles with Biological Macromolecules: A Review of Molecular Docking Studies. *Nanotoxicology*, **15**, 66-95. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1842537>
- [13] Surrey, K. (1964) Spectrophotometric Method for Determination of Lipxygenase Activity. *Plant Physiology*, **39**, 65-70. <https://doi.org/10.1104/pp.39.1.65>
- [14] Gay, C., Collins, J. and Gebicki, J.M. (1999) Hydroperoxide Assay with the Ferric Xylenol Orange Complex. *Analytical Biochemistry*, **273**, 149-155. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4208>