

油茶 14-3-3 蛋白基因的 cDNA 克隆及序列分析

刘巧¹, 谭晓风^{1,2,3*}, 胡孝义¹, 田晓明¹

(1. 中南林业科技大学 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南 长沙 410004; 2. 中南林业科技大学 林学院, 湖南 长沙 410004; 3. 国家油茶科学中心生物技术实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要:以构建的油茶近成熟种子 cDNA 文库和 EST 文库为基础, 采用分子克隆技术, 分离克隆 1 个 14-3-3 蛋白的全长 cDNA 序列, 由 1 156 个核苷酸组成, 5' 非编码区 57 bp, 3' 非编码区 301 bp, 开放阅读框长 777 bp, 编码 259 个氨基酸。该基因编码蛋白的分子质量为 29.466 ku, 等电点 4.78, 无信号肽序列, 是非分泌蛋白, 命名为 Co-14-3-3a。推测的二级结构有 9 个 α -螺旋, 1 个反平行的 β -折叠, 位于 C 和 D 之间。

关键词:油茶; 14-3-3 蛋白; 基因克隆; 序列分析; 结构预测

中图分类号: Q513.13; S794.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)03 - 0541 - 06

Cloning and Sequence Analysis of a 14-3-3 Protein Gene from *Camellia oleifera*

LU Qiao¹, TAN Xiao-feng^{1,2,3*}, HU Xiao-yi¹, TIAN Xiao-ming¹

(1. The Key Lab of Non-wood Forest Product of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 3. The Biotechnology Lab of National *Camellia oleifera* Science Centre, Changsha 410004, China)

Abstract: A cDNA library and an EST library of *Camellia oleifera* were constructed. A 14-3-3 protein gene was cloned from *Camellia oleifera*. This gene is 1 156 bp in length, including 57 bp of 5' untranslated region and 301 bp of 3' untranslated region. It has an open reading frame of 777 bp, encoding a protein of 259 amino acid residues with protein molecular weight of 29.466 ku and isoelectric point of 4.78. No signal peptide sequence was found, which shows it's a non-secreted protein. This gene is named Co-14-3-3a. The speculated secondary structure of Co-14-3-3a consists of nine helices and an extended β -sheet located between C and D.

Key words: *Camellia oleifera*; 14-3-3 protein; cloning; sequence analysis; structure prediction

1967年在牛脑细胞中发现^[1]的 14-3-3 蛋白是一类磷酸化丝氨酸结合蛋白, 它们以同源或异源二聚体形式, 通过蛋白质-蛋白质之间的相互作用调节多种靶蛋白的活性, 在信号转导途径、细胞周期以及生物与非生物胁迫应答中发挥着重要作用。而由于 14-3-3 蛋白调控靶蛋白的机制主要取决于所

收稿日期: 2010 - 04 - 20 修回日期: 2010 - 05 - 04

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD18B0204, 2006BAD01A1706)、国家自然科学基金(30371184)和湖南省科学技术厅科技计划项目(06FJ4111)

作者简介: 刘巧(1985 -), 女, 硕士生, 主要从事分子遗传学研究; *通讯作者: 谭晓风, 教授, 博士生导师, 主要从事经济林栽培育种和林业生物技术研究, E-mail: tanxiaofengcn@126.com.

结合蛋白的磷酸化状态,其调控作用很大程度上受到蛋白激酶和蛋白磷酸酶所控制的磷酸化作用的调节。目前植物中 14-3-3 蛋白功能研究取得了许多成果,例如调节大麦种子萌发,参与拟南芥营养信号途径,调节拟南芥钙依赖蛋白激酶 CDPK 信号转导途径的活性,通过调节硝酸还原酶(NR)以及蔗糖磷酸合成酶(SPS)的活性从而调节植物碳氮代谢,通过壳梭孢素(FC)与质膜 H^+ -ATPase 结合并激活质子泵,影响离子泵和离子通道^[2-3]。

14-3-3 家族各成员之间氨基酸序列高度相似和保守,均为分子质量约 30 ku 的酸性蛋白,等电点 4~5,无跨膜片段序列,在细胞中主要定位于胞浆,也有少数存在于细胞膜、细胞核以及高尔基体、线粒体、叶绿体、中心体等细胞器,有组成型表达也有组织特异性表达,在所有真核生物中广泛存在。已知的 14-3-3 蛋白的三维结构均很相似,哺乳动物 14-3-3 蛋白是由 2 个单体组成的二聚体结构,每个单体含 9 个螺旋,反向平行排列成 L 型结构。其他物种 14-3-3 蛋白的三维结构尚不清楚^[3-7]。

本重点实验室于 2003—2004 年以油茶优良无性系湘林 1 号和湘林 4 号近成熟种子为材料,构建了油茶 cDNA 文库^[8]和 EST 文库^[9],目前已克隆了该时期油茶种子一些重要基因并对部分基因做了较深入研究^[10-18]。发现了 1 条 14-3-3 基因,通过分子克隆的方法首次获得了油茶 14-3-3 蛋白的全长 cDNA,并进行了初步的序列特征分析。

1 材料和方法

1.1 材料

油茶近成熟种子 cDNA 文库、EST 文库由经济林育种与栽培国家林业局重点实验室构建^[8-9],油茶优良无性系湘林 1 号和湘林 4 号的近成熟种子采自湖南省林业科学研究院油茶采穗圃。

1.2 质粒 DNA 提取

参照《分子克隆实验指南(第三版)》中 SDS 碱裂解少量制备质粒 DNA 法进行。

1.3 cDNA 文库中目的基因片段长度的检测

PCR 反应体系(20 μ L): ddH₂O 14.4 μ L, 10 × PCR buffer 2.0 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 0.4 μ L, T₃、T₇引物各 0.8 μ L, 质粒模板 0.2 μ L, Taq(5 u) 0.2 μ L。

PCR 扩增条件: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 58 退火 30 s, 72 延伸 90 s, 35 个循环; 72 继续延伸 5 min; 4 保存。取 5 μ L 扩增产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,于自动凝胶成像仪上检测结果。

1.4 cDNA 序列测定及分析

对含有目的基因的质粒 DNA 进行 T₃ 和 T₇ 双向测序(上海英俊生物技术有限公司),用 Vector NTI 软件拼接校正得到的序列信息,然后用 GenBank 在线数据库,采用 Blast 方法对该序列进行比对分析。

1.5 生物信息学分析与理化性质的预测

用 Vector NTI Advance 9.0 软件进行多序列比对分析;用 MEGA 4.0 软件的 NJ (Neighbor - Joining) 方法并进行 10 000 次抽样,做系统进化树分析;用 AN-THPROT 2000 V6.0 软件进行蛋白质理化性质分析;通过 SWISS - MODEL workspace 做空间结构预测。

2 结果与分析

2.1 Co-14-3-3a 基因 cDNA 克隆及序列分析

油茶 EST 文库中,目的基因的 EST 序列大小约为 400 bp;而实际片段大小电泳检测结果为 1 000 ~ 1 500 bp (图 1),除去载体序列后仍远大于 400 bp,因此,已知的这段 EST 序列未反映该克隆的全部信息,故需重新双向测序,以得到该克隆的全部序列信息。用 Vector NTI 软件将重新测序后的结果与原 EST 序列进行拼接校正,并经 NCB I - vecscreen 分析去除载体,再用 NCB I - blastx 对该序列进行测定分

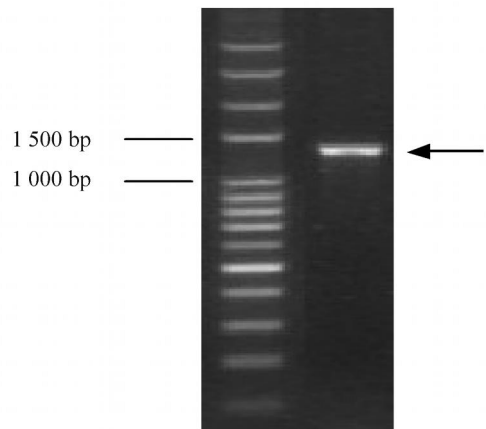


图 1 cDNA 序列长度的 PCR 检测

Fig 1 The conformation for the length of cDNA sequence by PCR

析,结果表明以下序列即 cDNA 全长(图 2)。

Co-14-3-3a 基因完整 cDNA 序列 1 156 bp。用 NCBI-ORF Finder 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)分析结果表明,该 cDNA 序列有一个完整的开放阅读框(open reading frame, ORF)(5'~837 bp Frame +1),长度为 780 bp(含终止密码子),编码 259 个氨基酸。其中 5'-UTR 与 3'-UTR 分别长 57 bp、301 bp,3'-UTR 末端有含 21 个多聚腺苷酸的 poly(A)尾。起始密码子 ATG 与终止密码子 TGA 均用方框表示,poly(A)以下划线表示。

```

1   ATTCGCACG   GAAAGAGGA   GAGATAAGG   AGCAAGTGA   GCTCCGATCG   ATCAACT[ATG]   GCCTCTCCA   AAGACCCTGA   GACCTTCGTC   TACATCGCCA
101  AGCTCGCCGA   CCAAGCCGA   CCTATGACG   AGATGGTGA   TGCGATGAAG   AAGGTTCGGA   A TCTGGATGT   GGAAGTACT   GTTGAAGGA   GGAAGTCTCT
201  TICTGTGGGG   TATAAGAACG   TGGTGTGGTC   TCGGAGGGCG   TCGTGGAGGA   TCTGTCTCTC   GATTGACAG   AAGGAGGAGT   CTAAAGGAA   CGAAGTGAAC
301  GCCAAGCGGA   TCAAGGATG   CAGGCAAGG   GAGGAGTGG   AGCTTACTGA   GATTTGCGGT   GATAATATG   CTGTCAATGA   TGAACAATCT   ATTCCTTCTT
401  GTTCTGGTGG   AGAGTCCACT   GTTTTCTACT   AGAAAAAGG   AGGAGACTAT   TATCGGATCT   TTGCAAGATT   CAAAGCTGGT   AATGAGAAAG   AAGAAGCTCC
501  TGA TCTGICA   CTCAGGCAAT   ACCAGATGGC   TTCTGTGACT   GCGGATCTG   ACTTACCTCC   CACTCACCC   A TTCGACTGG   GTTTGGCTTT   AAATTACTCC
601  GICTTCTATT   ATGAAATTA   GAACTCGCCT   GAAAAGGCCT   GCCACCTGGC   GAAAGCAAGCT   TTTGATGAA   CTA TTTCTGA   ACTGGAATCC   CTGAAATGAG
701  AA TCTTACAA   AGATAACACC   TTAAATATG   AACTTTTGA   GGA TAACTTT   ACTTTGTGGA   CTTCTGACAT   CCCTGAAGAT   GGAGAGACC   AAAAGTGA
801  GATCTCTGCC   AAA TCTGGAG   TTGA TGA AAC   CGA G TGA   AGT   TGCA TGGAA G   ACCCCCTTCT   CTCCTCTTCT   TICTTAA TGA   TCGACTTGGT   GAGGATGATT
901  CCGTTTCTGT   TCTTTGGTGA   TGTGTGTTA   AT TAA GTTCA   GAGAGAA TCC   AGAAACCTTT   TCTGTAA TTG   TICTGTGATCA   TTGCTGGTCT   TTGTGCACT
1001 GTTACTGACA   TATAATGTA   A TGGCAAGT   CCGTTCATT   TGEATGGCC   TA GCTGTCCC   CGCTATCTG   TTGTCAATCG   ATATACCTTT
1101 A TACTTATT   ACGTGAAGG   ACTCGCTATT   ATCTCAAAA   AAAAAAAA   AAAAAA
    
```

图 2 Co-14-3-3a 的全长 cDNA 序列

Fig 2 Full-length cDNA sequence of Co-14-3-3a

将该 ORF 通过 NCBI-blastp 与 Swissprot 数据库中序列进行比对,发现其与 14-3-3 superfamily 具有同源性,与 GeneBank 中其它生物的 14-3-3 蛋白基因的 CDS 序列一致性高达 89%,该 ORF 应为 Co-14-3-3a 基因的完整 CDS,其翻译得到氨基酸序列 259aa(图 3)。

```

1   MASSKDRRETF   VYAKLAIEQA   ER YDMVDAM   KKVANLOVEL   TVEERNLLSV   GYRNVVGRRR   ASWR LSSIE   QKEESKQNEV   NAKR KEYRH   KVESLTELK
101  GM TIV DEH   L IFCSSGGES   TV FYYRM KGD   YRYLAIEFKA   GNEKKEAADL   SLKAYQMASS   TADIDLPPHT   PRLGLALNY   SVFYEMNS   PERACHLAKQ
201  AHDEA BSLD   TLNEESYKDS   TLMQLLRDN   LTLWTSKEPE   DGHQIMIES   AKSGVDETE*
    
```

*表示翻译终止。

* means the end

图 3 油茶 14-3-3 蛋白氨基酸的序列

Fig 3 Amino acid sequence of *Camellia oleifera* 14-3-3 protein

2.2 同源性与相似性分析

表 1 油茶 14-3-3 蛋白与其它物种的相似性

Tab 1 The identity of 14-3-3 protein among *Camellia oleifera* and other species

名称	核苷酸数 / 个	分值 / bit	E 值	相似度 / %
乳浆大戟 (<i>Euphorbia esula</i>)	259	477	4E - 133	89
蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	260	475	2E - 132	88
银灰杨 (<i>Populus xcanescens</i>)	260	461	2E - 128	86
朝鲜槐 (<i>Maackia amurensis</i>)	261	442	2E - 122	84
蚕豆 (<i>Vicia faba</i>)	261	453	7E - 126	84
大豆 (<i>Glycine max</i>)	261	451	2E - 125	83
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	261	451	4E - 125	82
番茄 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	261	437	7E - 121	83
鹰嘴豆 (<i>Cicer arietinum</i>)	259	410	8E - 113	80
麝香百合 (<i>Lilium longiflorum</i>)	260	418	3E - 115	77
茶树 (<i>Camellia sinensis</i>)	260	347	2E - 100	68

将 Co-14-3-3a 推导的氨基酸序列通过 NCBI-Blast 进行分析,结果表明油茶与 GeneBank 中其它物种的 14-3-3 蛋白的氨基酸序列之间具有很高的相似性(表 1),推测它们亲缘关系较近,具有同源性。但 Co-14-3-3a 与同为山茶属的茶树 14-3-3 蛋白^[19]相似性并不高,仅有 68%。

通过 Vector NT 的 AlignX 软件对 Co-14-3-3a 蛋白质序列与相似性最高的 10 个物种以及同属植物茶树序列做多重比对,不同来源的 14-3-3 蛋白除了 N-末端与 C-末端部分残基在种间呈现差异性之

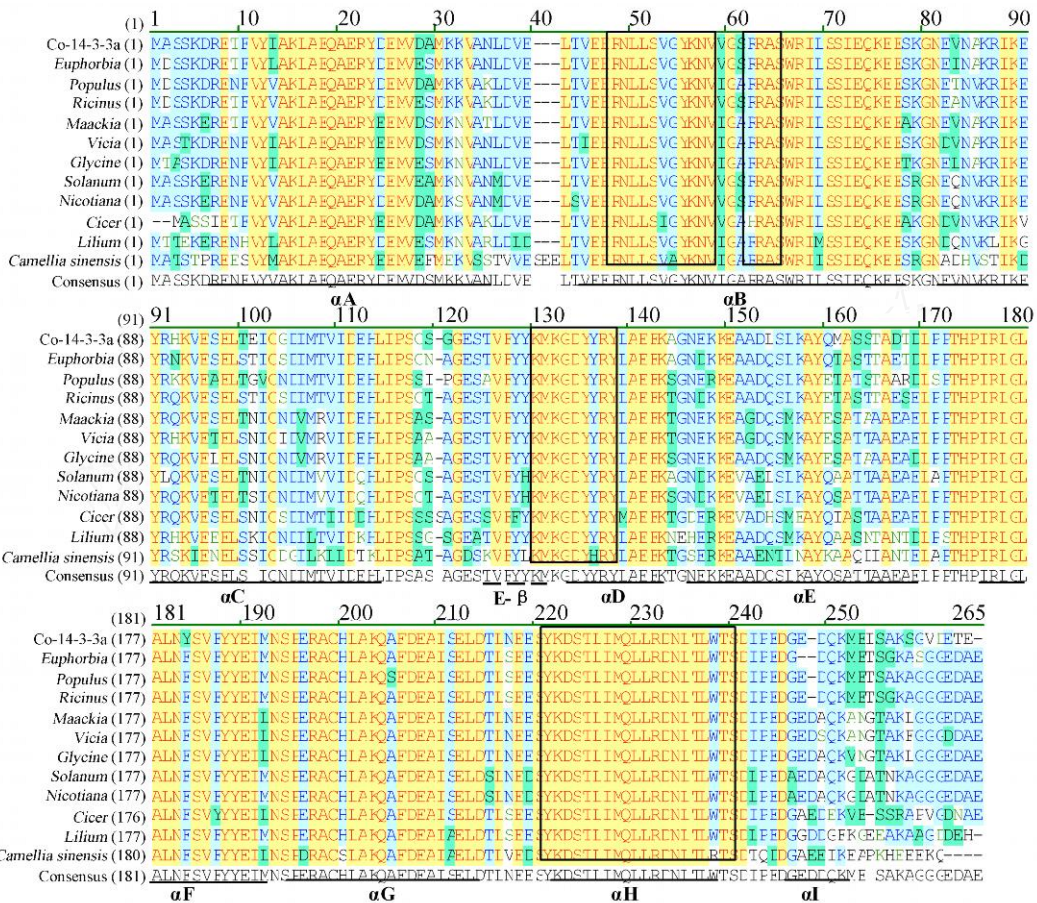


图 4 油茶与其它物种 14-3-3 蛋白质序列比对结果及 Co-14-3-3a 蛋白二级结构

Fig 4 Alignment of 14-3-3 protein sequences in *Camellia oleifera* and other spices and secondary structure

外,其余序列保守性均较高(图 4)。从图 4 中我们可以清楚地看到 14-3-3 蛋白的氨基酸序列在不同物种中均具有相似的特征序列: cAMP 或 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 (cAMP- and cGMP- dependent protein kinase phosphorylation site) 62 ~ 65; 酪氨酸激酶磷酸化位点 (tyrosine kinase phosphorylation site) 130 ~ 138; 以及分别位于 N-末端和 C-末端的两段 14-3-3 蛋白信号基序 (14-3-3 proteins signatures) 48 ~ 58, 221 ~ 240, 在图 4 中均以黑色实线框标出。此外,还有 6 个蛋白激酶 C (PKC) 磷酸化位点 (protein kinase C phosphorylation site) 和 10 个酪蛋白激酶 II (CK-2) 磷酸化位点 (casein kinase II phosphorylation site) 未在图 4 中标出。至此,认为该 cDNA 编码油茶 14-3-3 蛋白基因家族成员蛋白之一,命名为 Co-14-3-3a (*Camellia oleifera* 14-3-3 protein gene)。

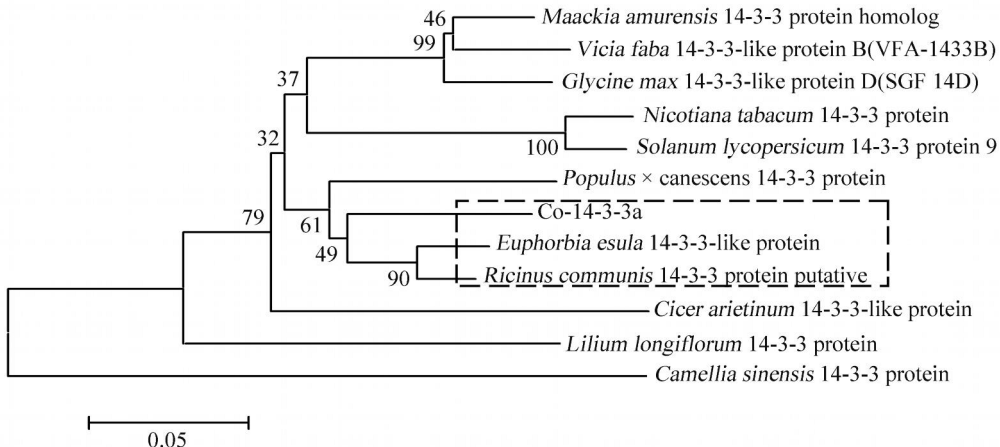


图 5 油茶与其他物种 14-3-3 蛋白系统进化树

Fig 5 Phylogenetic tree of 14-3-3 proteins in *Camellia oleifera* and other spices

2.3 系统进化树分析

在序列比对的基础上,采用 MEGA4 软件的 NJ (neighbor-joining) 法构建系统进化树,以确定 Co-14-3-3a 在系统进化中的地位 (图 5)。由 NJ 法构建的系统树,枝长代表分歧度,枝上的数字为 Bootstrap 10 000 次的支持率。图中可以看出油茶与乳浆大戟和蓖麻聚为一小类,用黑色虚线框标出,这个分类与多序列比对结果是大致相同的。

2.4 理化性质分析、结构预测

运用在线分析软件 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析 Co-14-3-3a 蛋白质的理化性质,结果如下:分子质量为 29.466 ku;理论等电点为 4.78,其中负电荷氨基酸残基数目 (Asp + Glu) 为 49,正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 的数目为 32;含量较高的残基有 Glu (31, 12.0%)、Leu (23, 8.9%)、Ala (21, 8.1%)、Lys (20, 7.7%);不稳定系数为 46.03,属不稳定蛋白。用 ANTHEPROT 2000 V6.0 软件分析得知该蛋白无信号肽,是非分泌蛋白;无跨膜结构区域。

通过 SWISS-MODEL workspace 在线预测二级结构^[20-23]和三维结构^[20,24-25] (图 6)。Co-14-3-3a 二级结构包括 9 个 α -螺旋 (helix) (有文献称为 A ~ I^[5]) 和 1 个反向平行的 β -折叠 (extended-beta), 在图 4 中螺旋和折叠位置分别以下划实线 (A ~ D) 和下划虚线 (E ~) 标出。各个螺旋的氨基酸残基数依次为: 29、34、33、10、24、17、20、17、6, 螺旋 B 最长, I 最短。 β -折叠的残基数为 7, 位于 C 和 D 之间, 据此推测 Co-14-3-3a N 末端的 3 个螺旋 (A ~ C) 位于同一个平面上, 其余 6 个螺旋位于另一平面上。Co-14-3-3a 与人 14-3-3 蛋白 epsilon (PDB # 2br9A) 序列相似性 76.087%, 期望值 $4.05e-91$, 预测模型残基范围 Co-14-3-3a 第 6 ~ 235 号碱基。



图 6 人 14-3-3 蛋白 epsilon 三维结构

Fig 6 Ribbon drawing of 14-3-3 protein epsilon (human)

3 结论与讨论

(1) 首次从油茶所建立的 cDNA 文库中鉴定出了 1 条 14-3-3 蛋白基因的全长 cDNA, 是山茶属植物中目前已克隆到全长的第 2 条 14-3-3 基因。该基因长度为 1 156 bp, 完整编码框的长度为 777 bp, 编码含 259 个氨基酸的蛋白质, 我们将其命名为 Co-14-3-3a; Co-14-3-3a 与其它物种具有较高的相似性, 表明 14-3-3 蛋白在进化上高度保守, 其保守基序中众多的蛋白激酶磷酸化位点, 说明了 14-3-3 蛋白的调控机制必定与磷酸化作用息息相关, 位于 C-末端和 N-末端的两段信号基序功能尚不清楚, 文献中多将其作为 14-3-3 蛋白的标签序列, 这也从一个侧面证明 Co-14-3-3a 确为 14-3-3 蛋白家族成员之一。系统进化树分析显示其与乳浆大戟以及同为油料作物的蓖麻的进化关系较近, 而与同属植物山茶 14-3-3 蛋白分歧年代久远。

(2) Co-14-3-3a 二级结构与哺乳动物相似, 均有 9 个 α -螺旋, 其中靠近 N-末端的 A、B 和 C 最长, 位于同一平面, I 最短。与哺乳动物不同的是, Co-14-3-3a β -折叠在 C 和 D 之间, 而哺乳类的 A ~ D 是同一平面上的, 并且 9 个螺旋中, C 和 D 的最长^[5]。

(3) 目前对于 14-3-3 蛋白功能的研究在拟南芥、大麦、番茄等植物不同时期不同组织中均有文献报道, 功能涉及调节植物种子萌发、信号转导途径和碳氮代谢, 调控质膜 H^+ -ATPase 的活性并影响离子泵和离子通道。Co-14-3-3a 能在油茶近成熟种子中表达, 因此, 寻找并鉴定其靶蛋白功能将为进一步研究油茶 14-3-3 蛋白所调节的生理过程提供线索。

参考文献:

- [1] Moore B W, Perez V T. Specific acidic proteins of the nervous system [C] // Francis D Carlson. Physiological and biochemical aspects of nervous integration. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1967: 343-359.
- [2] B·B·布坎南, W·格鲁依森姆, R·L·琼斯. 植物生物化学与分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 98-99.

- [3] 崔娜,李天来,李悦.植物中 14-3-3 蛋白的主要功能 [J].生物技术,2007,17(2):86-89.
- [4] 潘伟男,陈锋,封芬,等.14-3-3 蛋白的研究进展 [J].国际病理科学与临床杂志,2007,27(3):262-265.
- [5] 潘伟男,陈临溪.14-3-3 蛋白 [J].中华医学研究杂志,2006,6(10):1103-1106.
- [6] Isobe T, Khimura T, Sunaya T, et al Distinct forms of the protein kinase - dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases[J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 217(1): 125 - 132.
- [7] M B Y. How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis[J]. FEBS Lett, 2002, 513(1): 53 - 57.
- [8] 胡芳名,谭晓风,石明旺,等.油茶种子 cDNA 文库的构建 [J].中南林学院学报,2004,24(5):1-4.
- [9] 谭晓风,胡芳名,谢禄山,等.油茶种子 EST 文库构建及主要表达基因的分析 [J].林业科学,2006,42(1):43-48.
- [10] 谭晓风,张党权,陈鸿鹏,等.油茶查尔酮合酶和异构酶基因的 cDNA 克隆 [J].中南林业科技大学学报,2007,27(1):9-13.
- [11] 张党权,谭晓风,陈鸿鹏.油茶 SAD 基因的全长 cDNA 克隆及生物信息学分析 [J].林业科学,2008,44(2):155-159.
- [12] 谭晓风,王威浩,刘卓明.油茶 ACP 基因的全长 cDNA 克隆及序列分析 [J].中南林业科技大学学报,2008,28(4):8-14.
- [13] 胡孝义,谭晓风,田晓明,等.油茶脱水素样蛋白的基因克隆与序列分析及其生理功能预测 [J].西北植物学报,2008,28(8):1541-1548.
- [14] 谭晓风,陈鸿鹏,张党权.油茶 FAD2 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析 [J].林业科学,2008,44(3):70-75.
- [15] 胡孝义,谭晓风,田晓明,等.油茶种子水通道蛋白 CoPIP1-1 的鉴定与分析 [J].林业科学,2008,44(12):48-56.
- [16] 田晓明,谭晓风,胡孝义,等.油茶苯丙氨酸解氨酶基因的 cDNA 克隆与序列分析 [J].南京林业大学学报,2009,33(4):24-28.
- [17] 陈鸿鹏,谭晓风.超氧化物歧化酶 (SOD) 研究综述 [J].经济林研究,2007,25(1):59-65.
- [18] 蒋瑶,谭晓风,张党权,等.一个油茶金属硫蛋白基因的克隆与序列分析 [J].江西农业大学学报,2009,31(4):699-705.
- [19] 涂梅,江昌俊,房婉萍,等.茶树花蕾 14-3-3 蛋白基因的分子克隆及差异表达分析 [J].中国农业科学,2008,41(10):2983-2991.
- [20] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195 - 201.
- [21] Zdobnov EM, Apweiler R. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro[J]. Bioinformatics, 2001, 17(9): 847 - 848.
- [22] Jones D. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 292(2): 195 - 202.
- [23] Ward J J, Sodhi J S, McGuffin L J, et al Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 337(3): 635 - 645.
- [24] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381 - 3385.
- [25] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling [J]. Electrophoresis, 1997, 18(15): 2714 - 2723.