

# 多聚半乳糖醛酸酶PG8fn结构功能分析

报告人：张亨

G03：赵晓蒙，李敬，邓炎春

指导老师：罗静初

# 目录

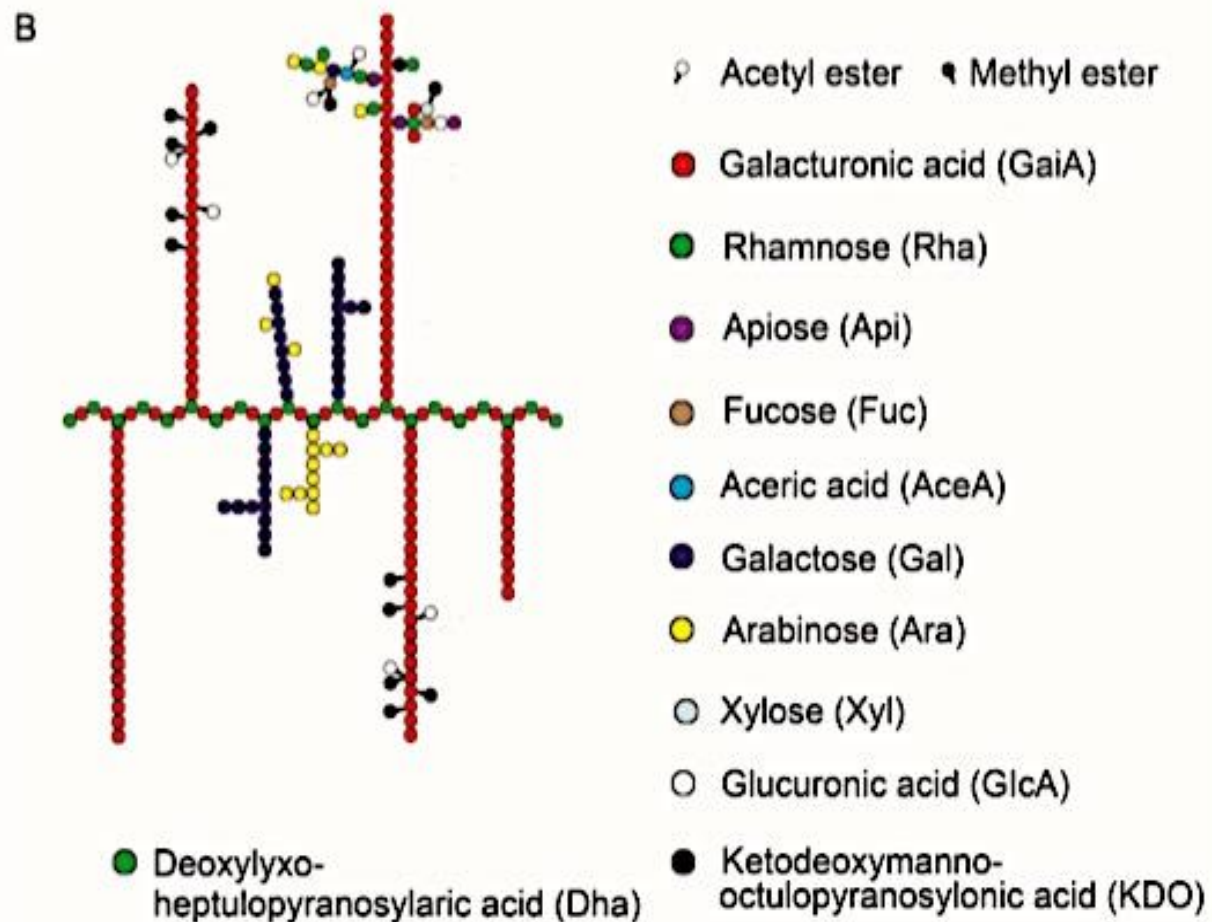
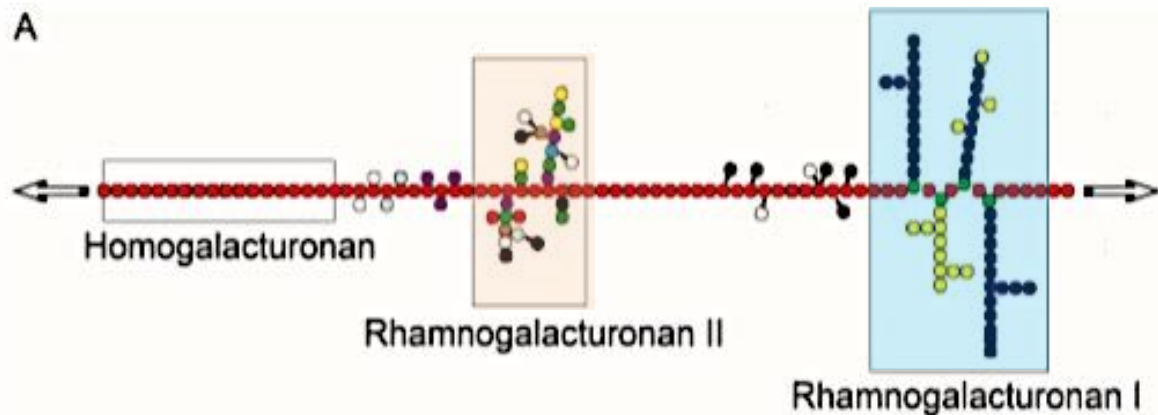
果胶简介

果胶酶分类及应用

PG8fn序列分析

PG8fn同源建模及三级结构分析

# 果胶结构



果胶是一类带负电荷的高分子多糖

平滑区(Smooth region)

须状区(Hairy region)

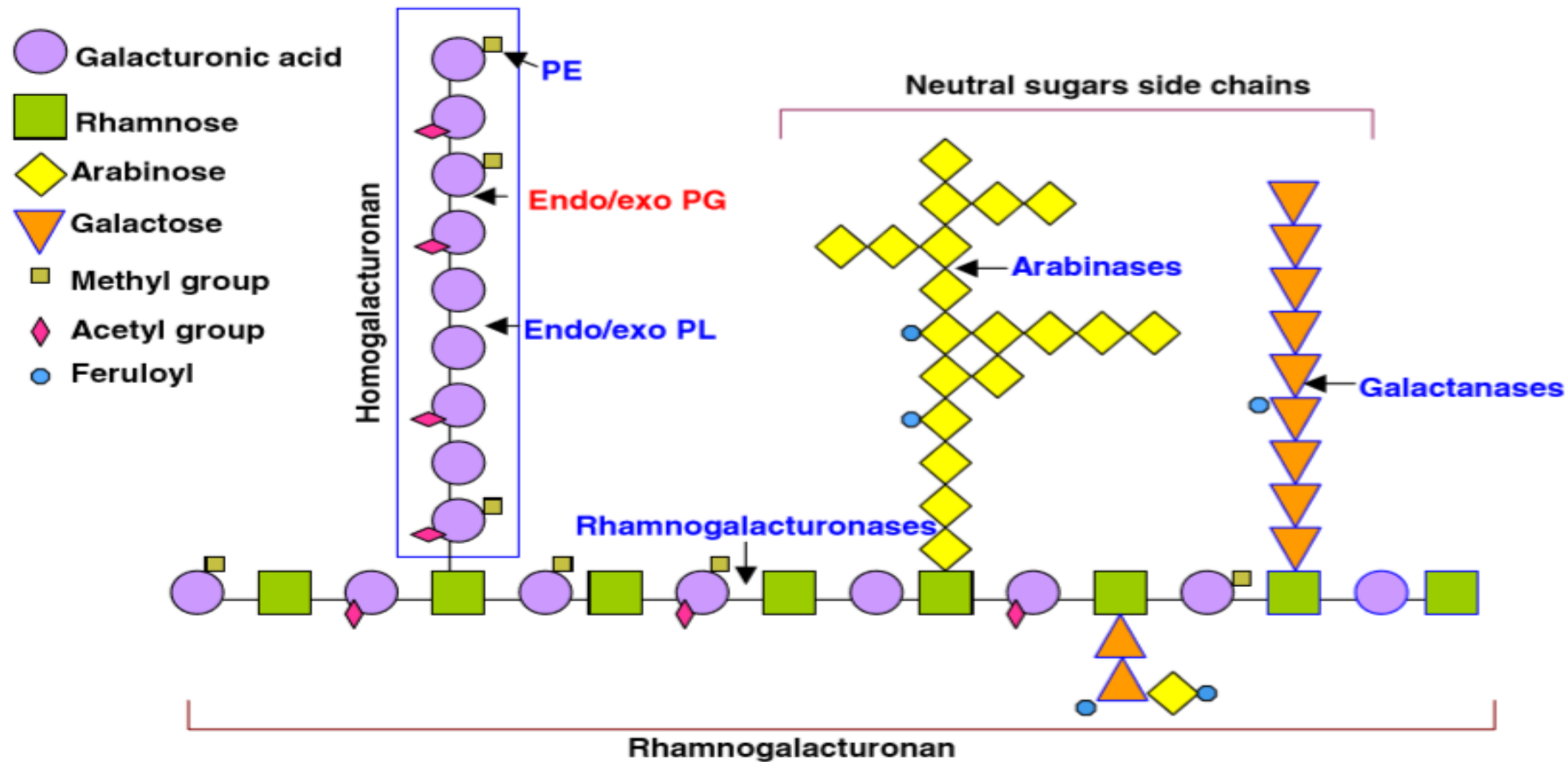
须状区的糖链

鼠李半乳糖醛酸聚糖-I (RG-I)

鼠李半乳糖醛酸聚糖-II (RG-II)

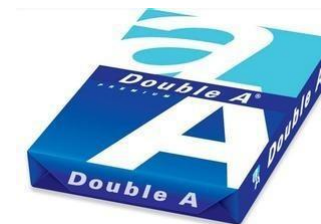
当酯化程度>50%时，形成高酯化程度的果胶。

# 果胶降解酶



酯酶(Esterase)和解聚酶(Depolymerase)  
解聚酶又分为水解酶(Hydrolase)和裂解酶(Lyase)两类

# 果胶酶的应用



果胶酶能有效降解果胶类物质，因而广泛的应用于食品、饲料、纺织、造纸等工业中。

# 多聚半乳糖醛酸酶的性质

多聚半乳糖醛酸酶是果胶酶系中研究最为广泛的酶种，属于糖苷水解酶第 28 家族，特异催化水解多聚半乳糖醛酸链中  $\alpha$ -1,4-糖苷键产生单个或寡聚的半乳糖醛酸。

多聚半乳糖醛酸酶有内切酶(endo-)和外切酶(exo-)之分。

Microorganism	MW (kDa)	pH optimum	Temperature optimum (°C)	pH stability	Thermostability	Specific activity (U/mg) <sup>a</sup>	References
<i>Thielavia arenaria</i> XZ7	35.8	5.0	60	3.0–8.0	>85% activity at 50 °C for 1 h;	34,382	Tu et al., 2014a
<i>Sporotrichum thermophile</i>	ND <sup>b</sup>	7.0	55	ND	~50% at 65 °C for 4 h	ND	Kaur et al., 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43	5.0	60	ND	ND	0.51	Hirose et al., 1999
<i>Physalospora piricola</i>	38	4.9	60	5.0–7.0	ND	129	Miyairi et al., 1994
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	41.7	4.5	55	3.0–5.0	~50% at 50 °C for 14 h	219	Serrat et al., 2002
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	30	5.5	60–65	ND	~30% at 60 °C for 15 min	5000 (Citrus pectin)	Martins et al., 2007
<i>Penicillium</i> sp.	ND	5.5	60	ND	~50% at 60 °C for 2 h	2.5 (Pectin)	Mathew et al., 2008
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	35	4.5	55	ND	ND	ND	Sieiro et al., 2009
<i>Sclerotium rolfsii</i>	39.5	5.0	60	ND	~50% at 50 °C for 48 h	ND	Schnitzhofer et al., 2007

<sup>a</sup> Specific activities were determined using polygalacturonic acid as the substrate except for special cases.

<sup>b</sup> ND, not determined.

## Achaetomium sp. Xz-8 endo-polygalacturonase I gene, complete cds

GenBank: KC633130.1

### endo-polygalacturonase I [Achaetomium sp. Xz-8]

GenBank: AGR51994.1

```
source          1..1190
                /organism="Achaetomium sp. Xz-8"
                /mol_type="genomic DNA"
                /strain="Xz8"
                /db_xref="taxon:1351709"
mRNA            join(<1..371,424..528,584..>1190)
                /product="endo-polygalacturonase I"
CDS             join(1..371,424..528,584..1190)
                /EC_number="3.2.1.15"
                /codon_start=1
                /product="endo-polygalacturonase I"
                /protein_id="AGR51994.1"
```

*PG8fn*基因 (GenBank: KC633130.1)

全长1,190bp

2个内含子

cDNA 1,083bp

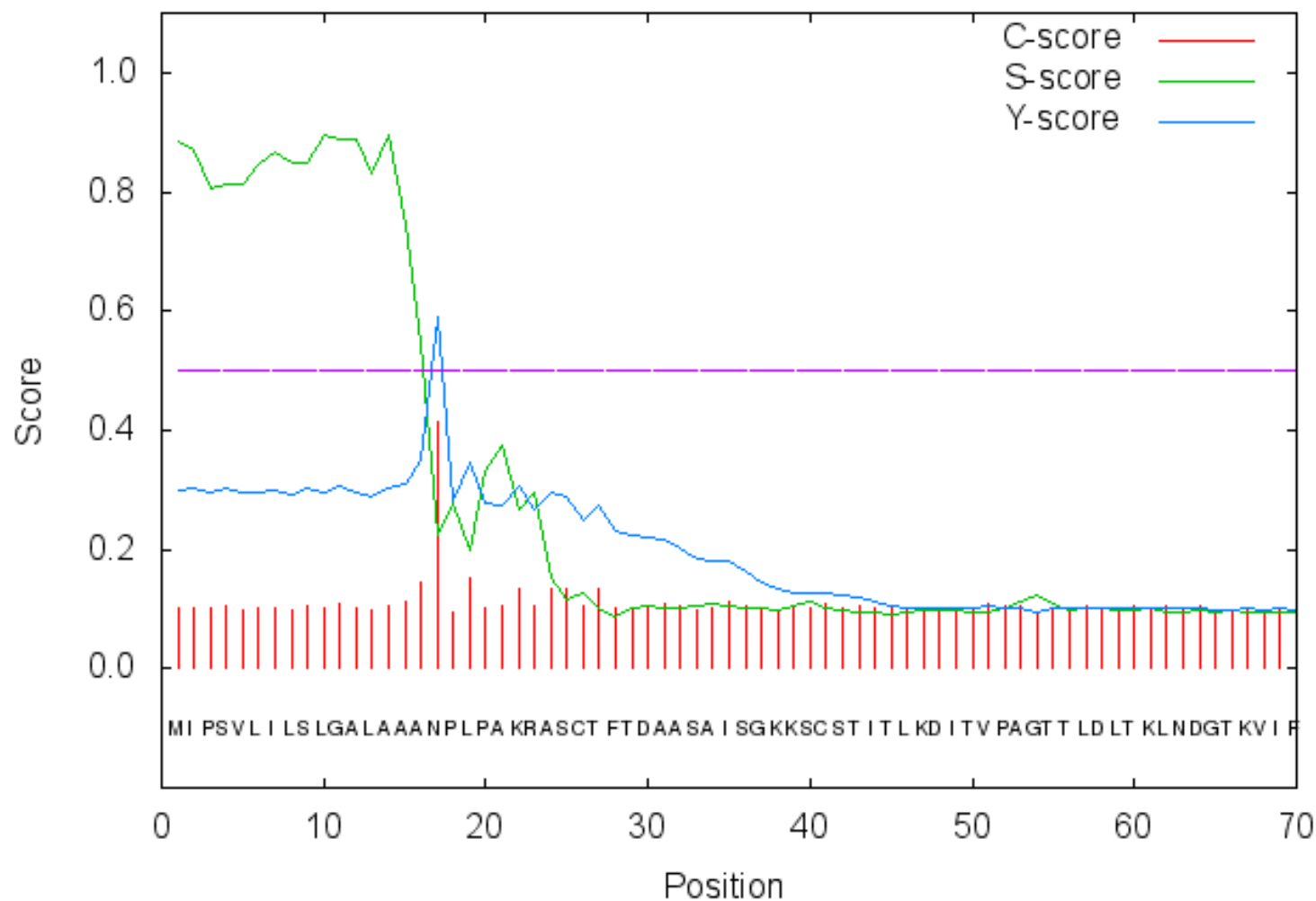
编码360个AA和1个终止子

分子量预测为 35.4 k Da

等电点预测为 9.18

# 信号肽预测

SignalP-4.1 prediction (euk networks): AGR51994.1



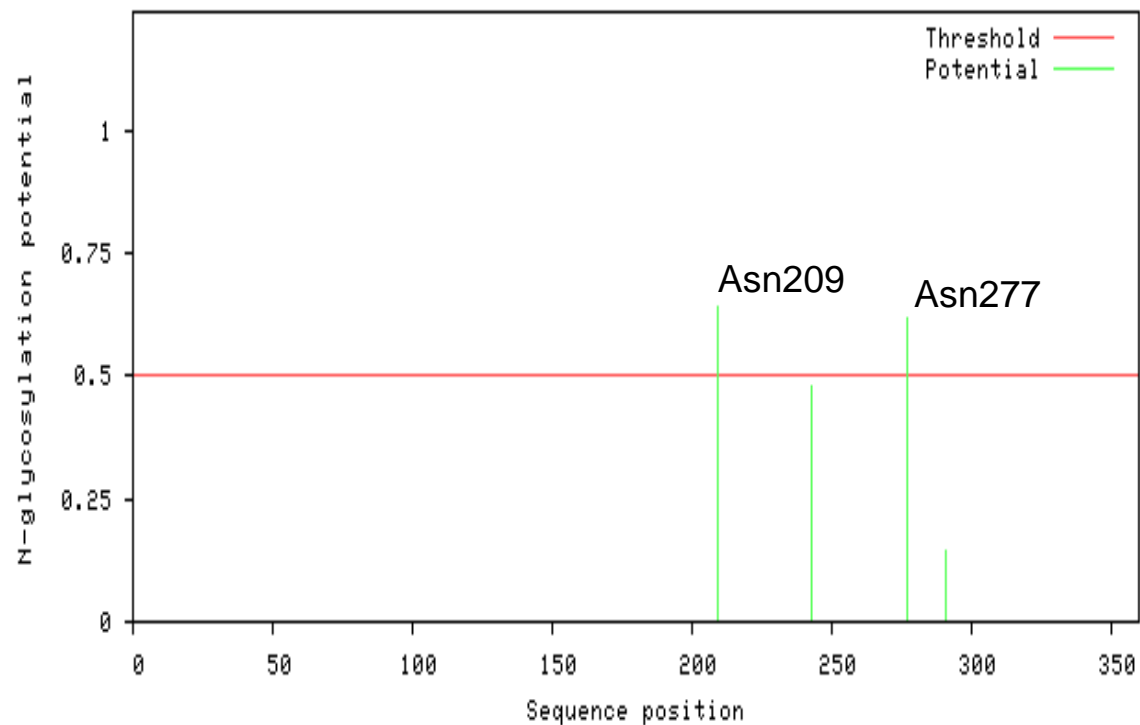
1-16 个氨基酸为信号肽序列



# 糖基化位点预测

2个潜在的 **N-糖基化** 位点(Asn209 和 Asn277)

NetNGlyc 1.0: predicted N-glycosylation sites in AGR51994.1

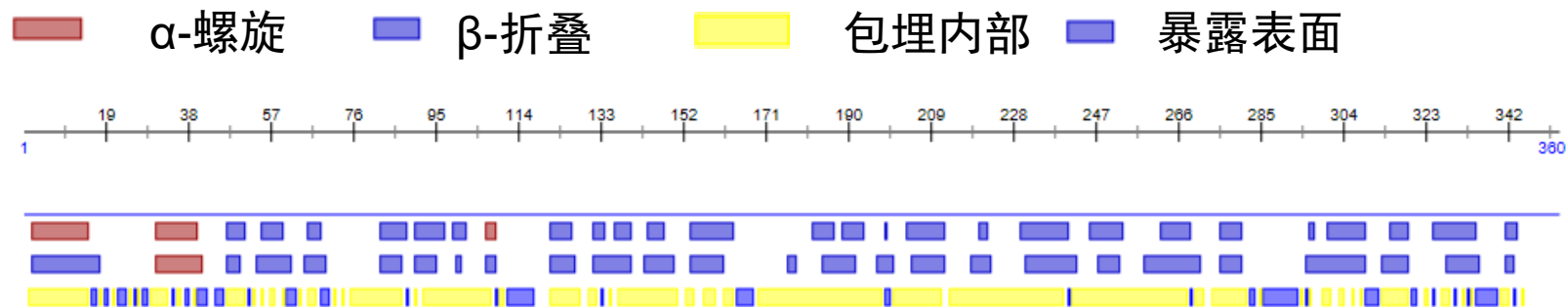


1个潜在的 **O-糖基化** 位点( Ser25)

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 18-11-6
##Type Protein
#seqname      source feature start  end  score  strand  frame  comment
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  4    4    0.0710963  .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  9    9    0.132336   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  25   25   0.57817   .    .    #POSITIVE
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  27   27   0.182077   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  29   29   0.447814   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  33   33   0.480095   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  36   36   0.216155   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  40   40   0.416225   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  42   42   0.255924   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  43   43   0.183913   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  45   45   0.0961188  .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  50   50   0.290987   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  55   55   0.140747   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  56   56   0.340759   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  60   60   0.103003   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  66   66   0.172196   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  71   71   0.093013   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  74   74   0.087751   .    .
AGR51994_1    netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  75   75   0.109201   .    .
```

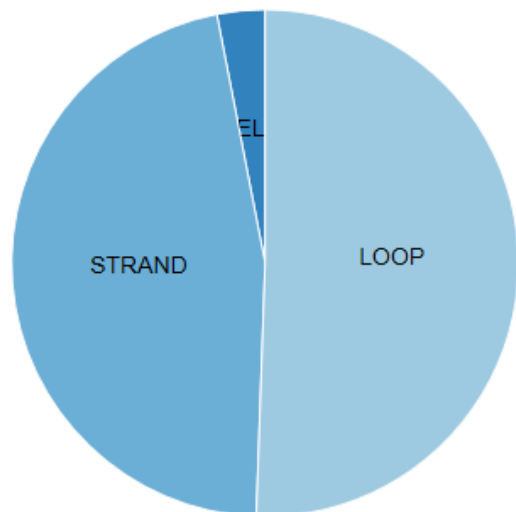


# 二级结构预测

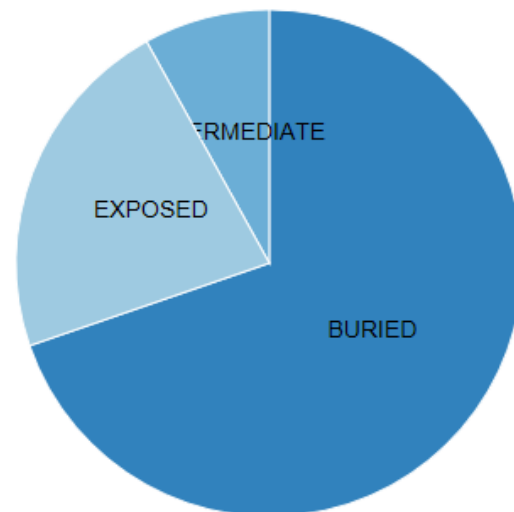


LOOP结构占50.56 %  
β-折叠结构占46.39 %  
α-螺旋结构占3.06 %

Secondary Structure Composition

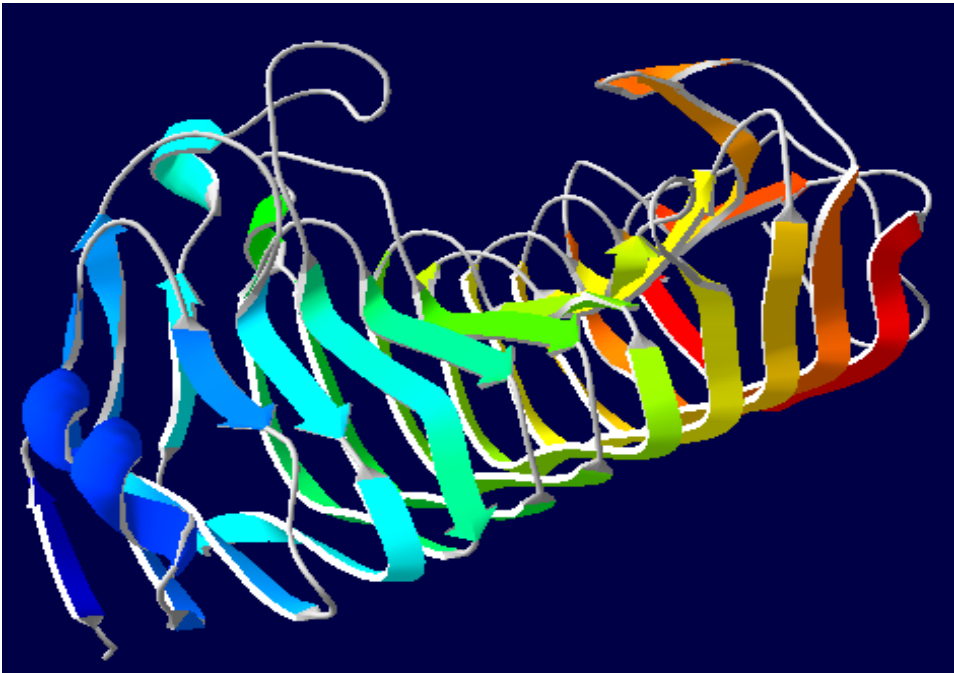


Solvent Accessibility

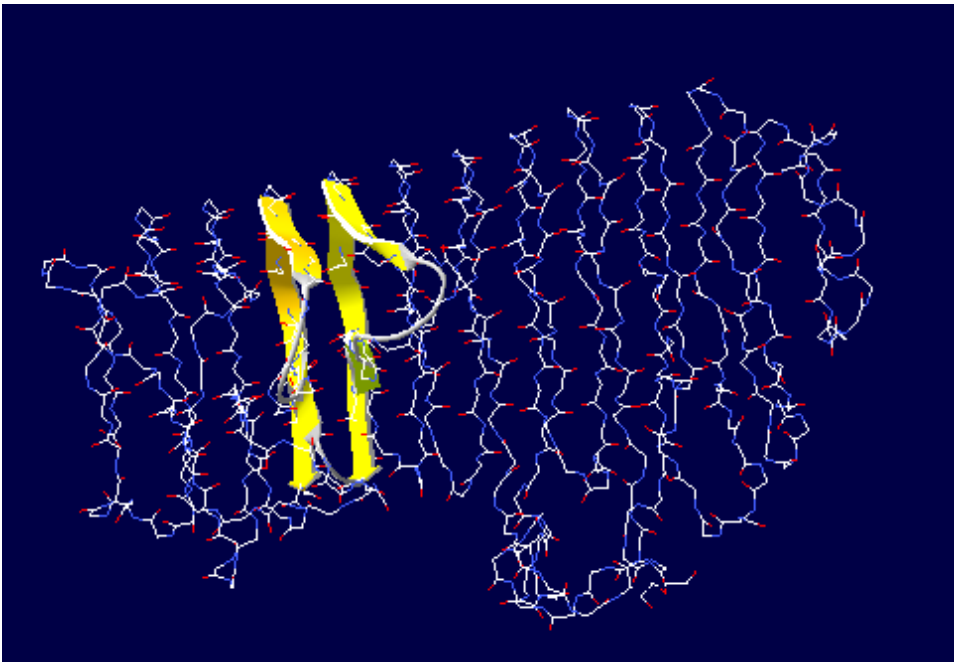


包埋的氨基酸残基占 69.72 %  
分子表面的氨基酸残基占 22.22 %  
介于中间的氨基酸残基占 8.06 %

# 2IQ7结构

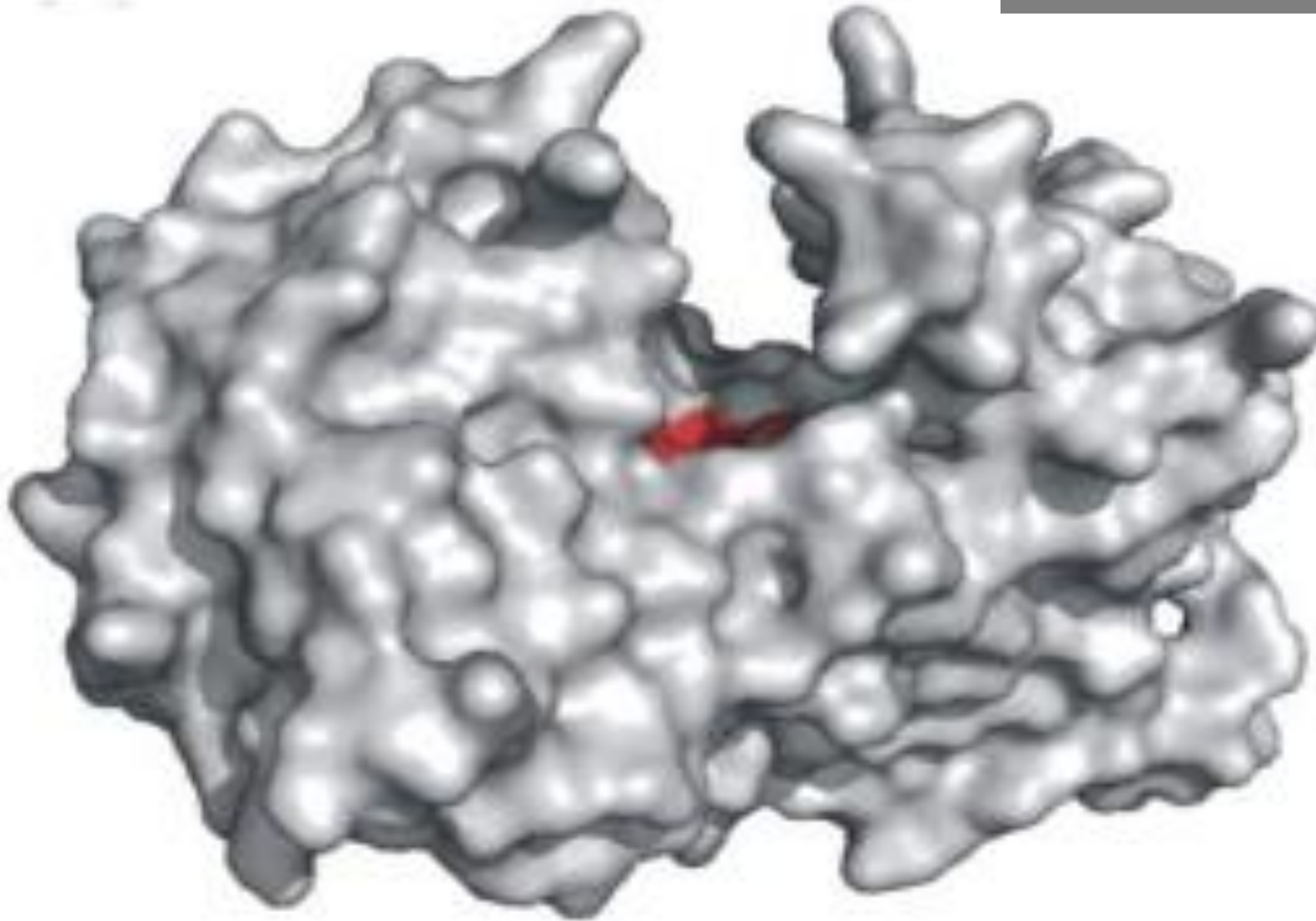


内切多聚半乳糖醛酸酶呈典型的右手状  $\beta$ -螺旋平行结构，含有 10 个完整的螺旋圈。



第七、八、九行的转角和第三、四、五行的转角向外延伸，分别形成一个大的 loop 区，与平行  $\beta$ -螺旋结构的折叠片相结合，组成底物催化口袋。

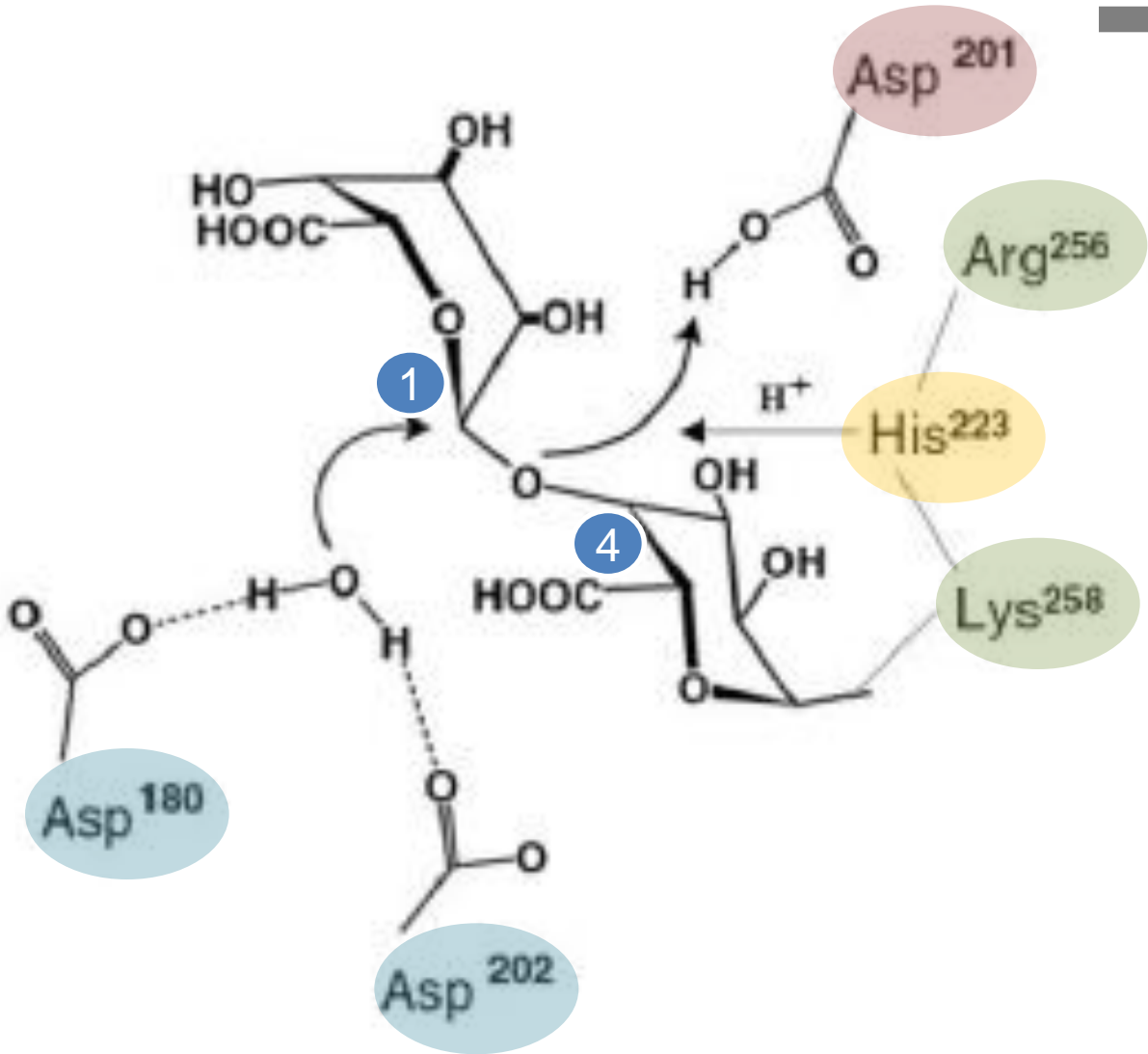
# 2IQ7催化中心



多聚半乳糖醛酸链的  $\alpha$ -1,4-D-糖苷键，发生水解反应，产生单个或寡聚的半乳糖醛酸。



# 作用机理



残基 Asp180 和 Asp202 负责激活水分子去亲和攻击异头碳,

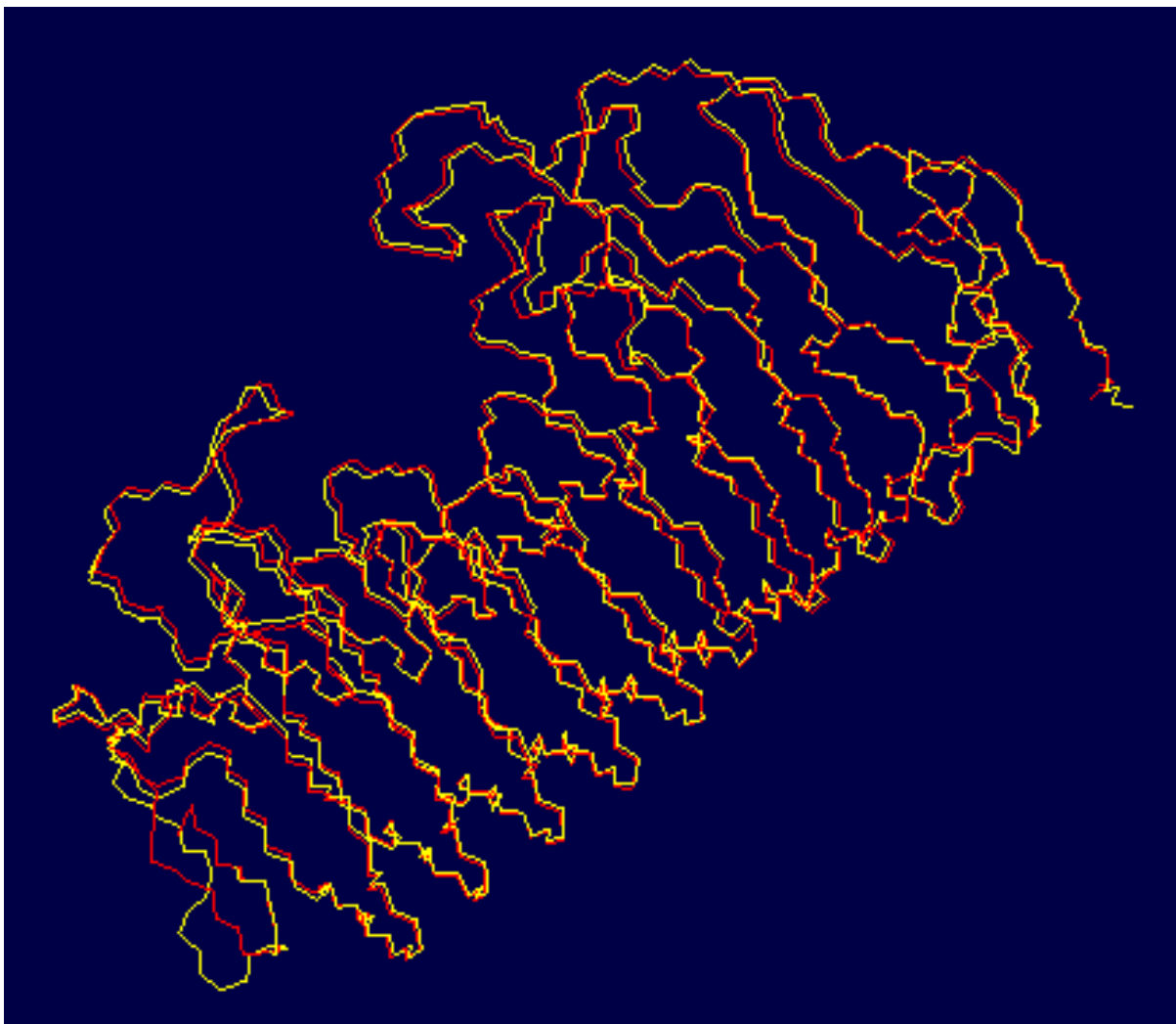
残基 Asp201 提供质子给糖苷氧

残基 Arg256 和 Lys258 则与底物结合相关或者起到维持残基 His223 的电离状态的作用。

Swiss-pdbviewer用模板本地建模

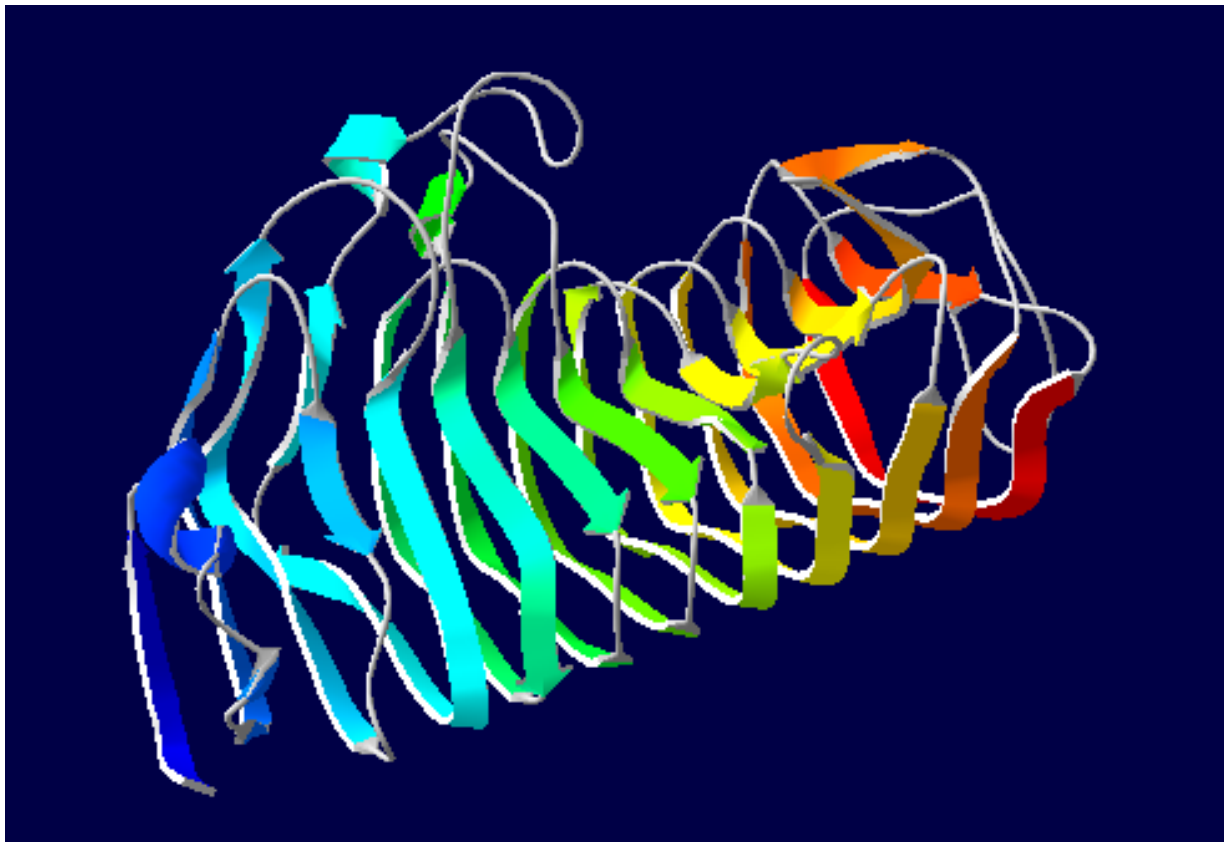
Phyre网站在线建模

fit →

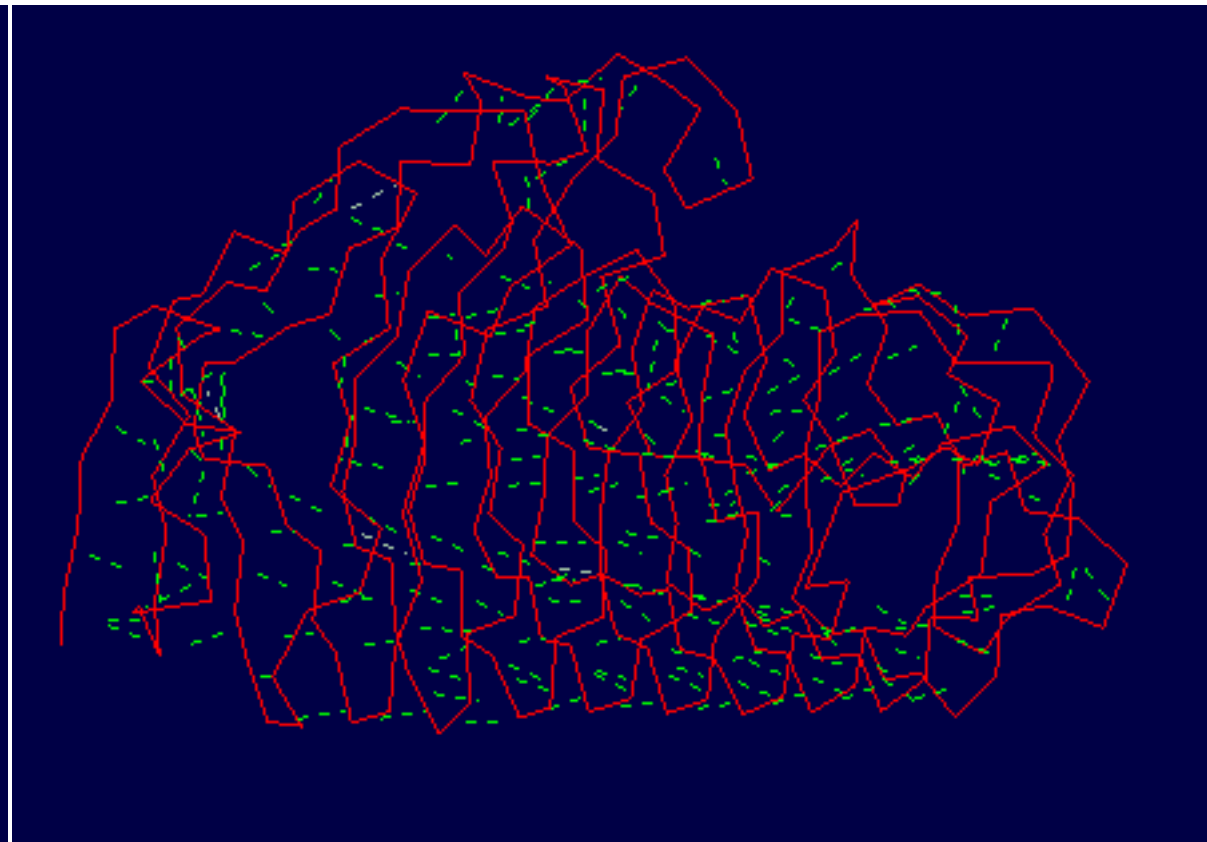


# PG8fn三维结构 (预测)

---

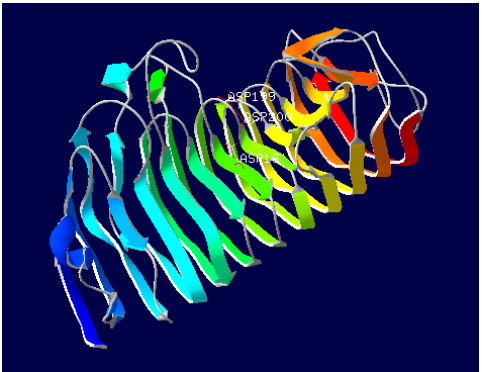


**Secondary Structure Succession**

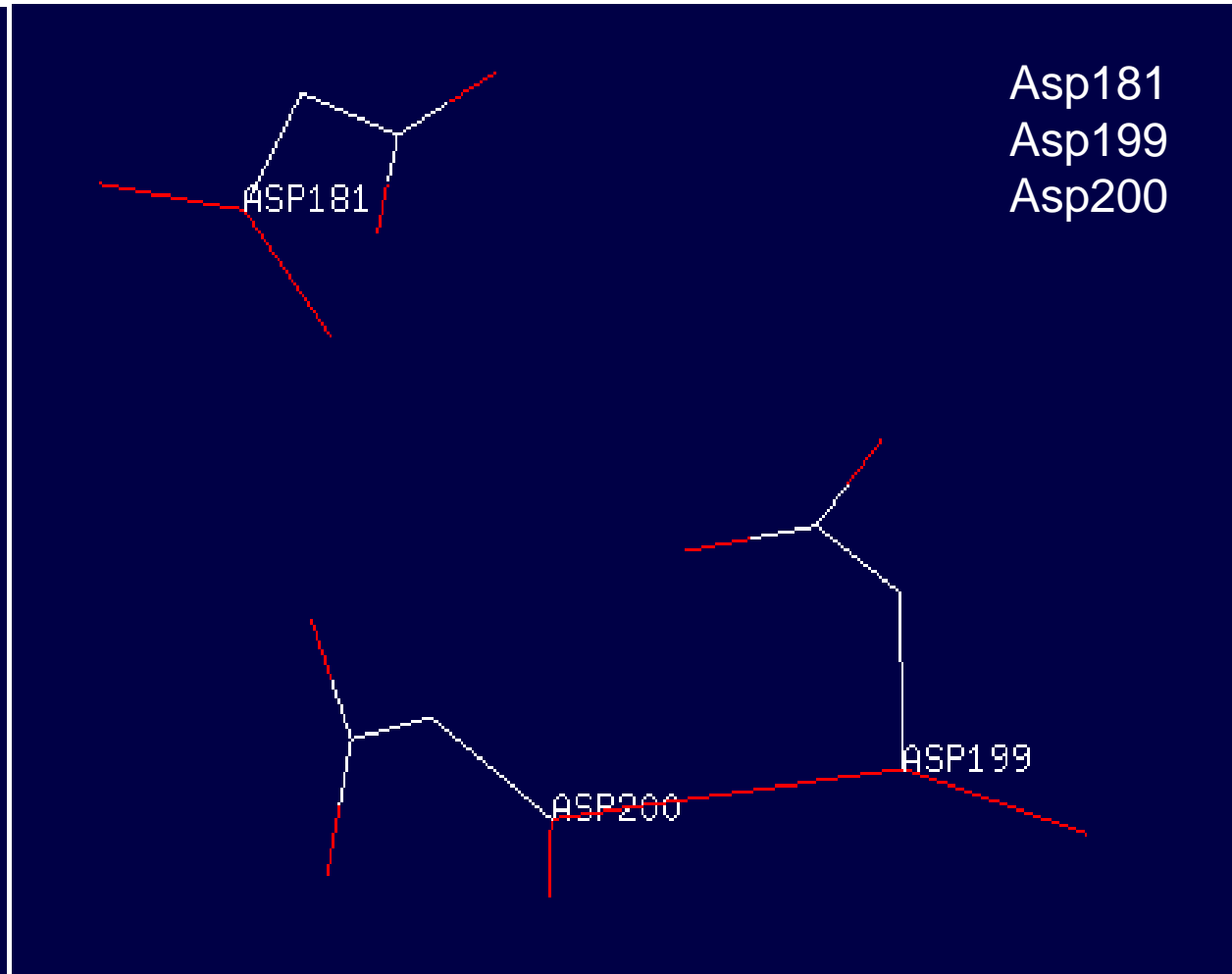
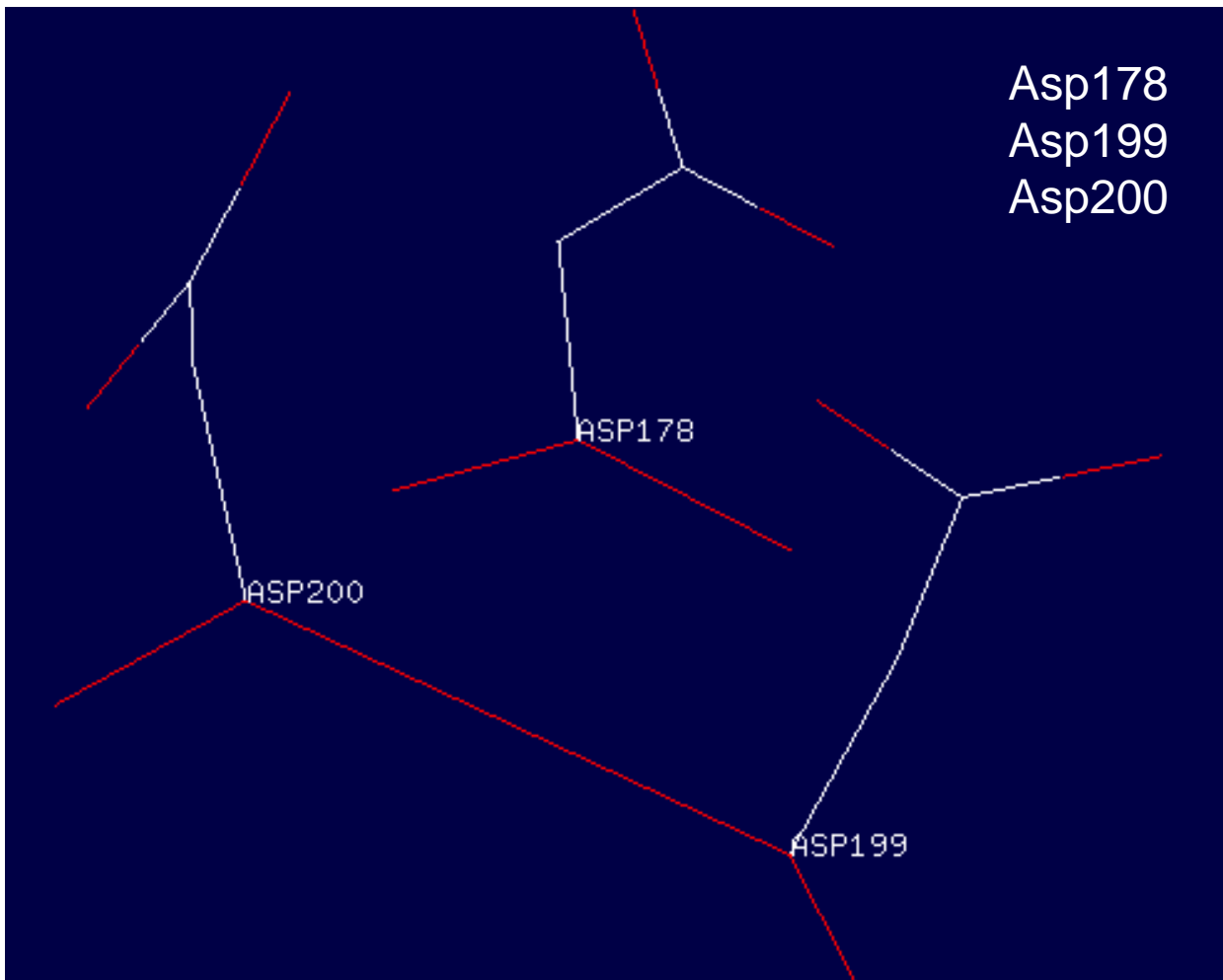


**H-bond**





# PG8fn作用机理 (预测)



# 密码子偏好

## *PG8fn*基因

#CdsCount: 4

#Coding GC 62.12%  
 #1st letter GC 52.78%  
 #2nd letter GC 73.74%  
 #3rd letter GC 59.85%

#Codon	AA	Fraction	Frequency	Number
GCA	A	0.218	30.303	12
GCC	A	0.273	37.879	15
GCG	A	0.364	50.505	20
GCT	A	0.145	20.202	8
TGC	C	0.556	12.626	5
TGT	C	0.444	10.101	4
GAC	D	0.714	12.626	5
GAT	D	0.286	5.051	2
GAA	E	0.833	12.626	5
GAG	E	0.167	2.525	1
TTC	F	0.750	7.576	3
TTT	F	0.250	2.525	1
GGA	G	0.045	2.525	1
GGC	G	0.682	37.879	15

## *pPIC9* 载体

#CdsCount: 141

#Coding GC 46.49%  
 #1st letter GC 46.62%  
 #2nd letter GC 48.26%  
 #3rd letter GC 44.58%

#Codon	AA	Fraction	Frequency	Number
GCA	A	0.351	22.255	60
GCC	A	0.175	11.128	30
GCG	A	0.175	11.128	30
GCT	A	0.298	18.917	51
TGC	C	0.453	14.466	39
TGT	C	0.547	17.433	47
GAC	D	0.625	12.982	35
GAT	D	0.375	7.789	21
GAA	E	0.456	17.433	47
GAG	E	0.544	20.772	56
TTC	F	0.422	17.062	46
TTT	F	0.578	23.368	63

A	GCG	0.364
	GCA	0.351
L	CTC	0.348
	CTT	0.233
T	ACG	0.327
	ACT	0.375
V	GTC	0.6
	GTT	0.404

*PG8fn*基因  
*pPIC9*载体

## *PG8fn*基因

I	ATA	0
R	CGA	0
V	GTA	0

## 结论

1. PG8fn 由360 个氨基酸组成, 预测分子量和等电点分别为 35.4 k Da 和 9.18。
2. PG8fn 预测为由16个氨基酸组成的信号肽, 可能有两个N-糖基化位点和一个O-糖基化位点。
3. PG8fn 与2IQ7相似性较高, 可能的催化机制是三个Asp参与的单亲核取代反应。

## 下一步计划

1. 克隆, 表达 *PG8fn* 基因。表达菌株为毕赤酵母, 载体为pPIC9。
2. 纯化PG8fn蛋白检测酶活性, 测定基本性质。
3. 结晶, 优化结晶条件, 解析晶体。
4. 根据PG8fn晶体结构理性改造蛋白, 提高酶活剂热稳定性。

THANK YOU