

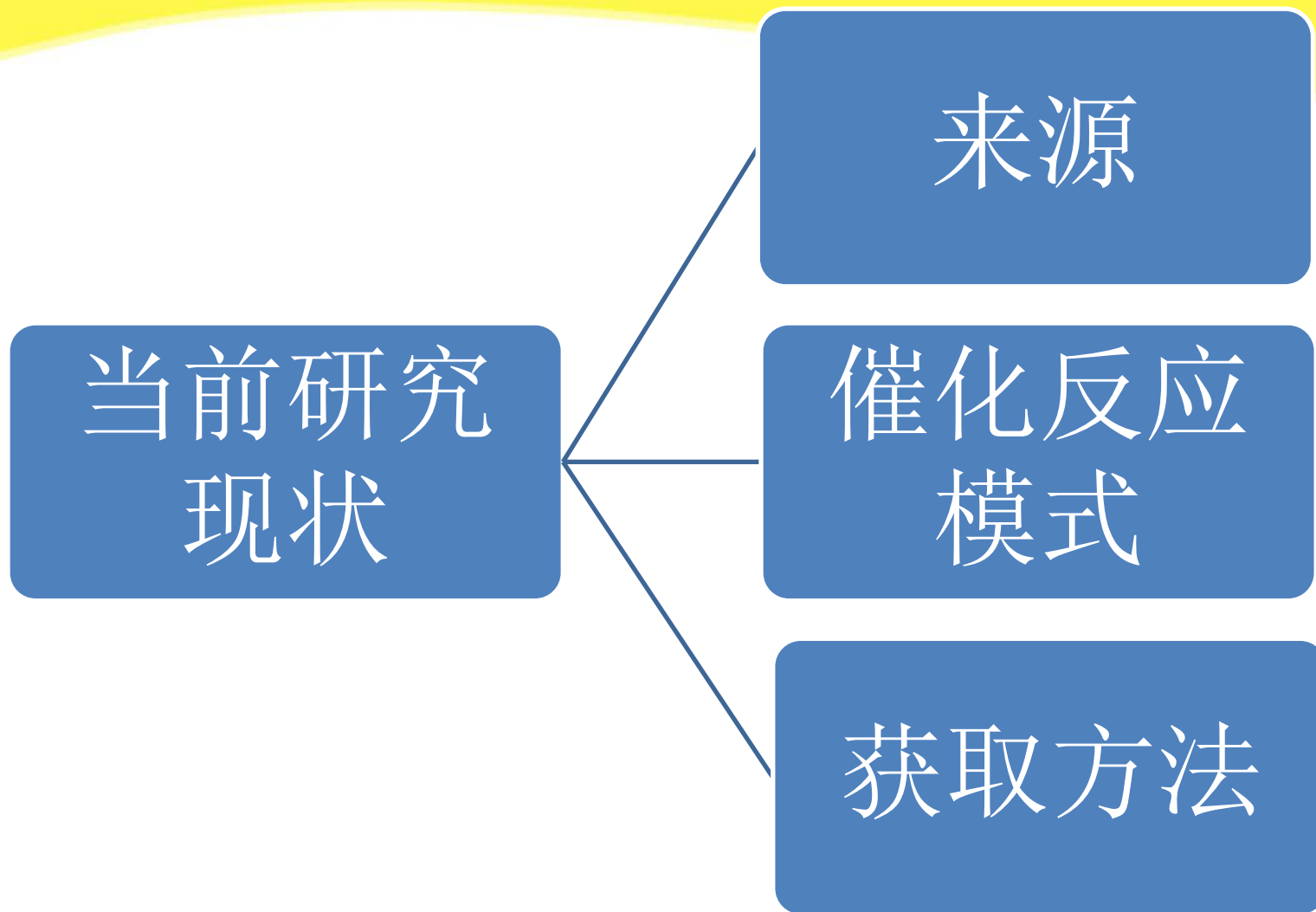
葡萄糖脱氢酶新型基因的获取与酶性质的改良

第七组报告人：游帅

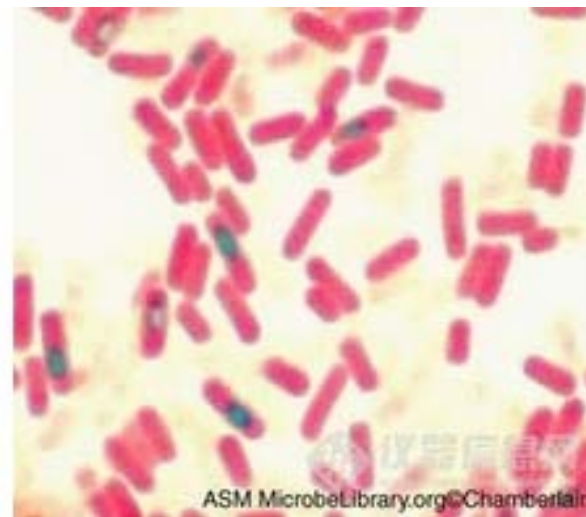
小组成员：杨连 杨虹 王培立

研究所：饲料研究所

研究背景



来源和催化反应



转酮酶缺陷型枯草芽孢杆菌来源的**GDH**以其产酶量高、纯化方便而被人们广泛的接受和应用。





获取方法


目标基因克隆

真核生物表达和诱导





应用状况

- 食品行业
 - 医药卫生领域
 - 生物科技领域
 - 我们的研究与目前生产与应用的切合点
- 



- >FRI
- agactactgactcagtgccgcaatatgactttgttattggtggcggggcactgctggacttgctgtcgccaacagactctcagaaatgctagata
- tcaccgtggccgtaatcgagacgggagactccgttttcaacaatcacaacgttactcatatcacaggttatggcttgagcttcggaacagcaatcg
- actgggcctacgaaactgagaaccagacatatgccggagggtcaaagcagattatgcgcgctggaaaggcgattggaggaacgagcactatcaatg
- gtatgtcatatactcgagcccaatccgtacagattgatgcttgggaattggtggggaacgagggtggaactggaacaacctctcccatattataa
- gaagtcggaaggatttcaggtcccactctgggcccagattgataatggcgccgactatatttagatatcatggggaggatggccagtcaaagtg
- ggctggccgaatgcaatgacgaattccagcttgcttctgtgctcgacgaaaccctgtcgggactcgggtgtcccttataaccgtgacgttaatgatg
- gtaacatgatcgggctcatatcccatccagacactatcgacagagacgccaatattcgccatgacgcagcgagggttactactggccttacgagaa
- taggtcaaatctcaagatcatctcaaacaccgggcaacaagatcattgggctgaagggtctcagagtgaggccatcgcgattggagtcgaggtt
- actggtggtgatggacctgaagtgatacacgcttcgaaggaggtgatcctctcagctggttctctgagatccccttactcctagagttatctggca
- ttgaaaccggatatactcaaaaagttcgacatccccgtaaggttaacatttctactgtgggcgaaaacttgaggatcagacaaataatgaatt
- gtcttatgacgggagagaatcttgggtcggttcgccaacttcgcggttctcccgtcagtcgagcatatatacggcgacaatgtttcttcgattgca
- tctttgtcaactcaagtctcgctgactatgcaaaggctgatccaattttcaaatggagcagtagtgaagctaattggtcaggccgcttccaac
- tcagtatgatttagtcttcaagatcgagttccatgacagagattgctttatcccgtcgcgattcattcatgtctgaatactggcctctgctg
- ccgtttcaagaggcagtagtccatggcctcctcggatccatctcatccgccttctatcaaccxaaattttatgttcgagcaggatctcaaca
- gtcaggctgatgtagctcgatataccgcaagatattagagcaagtcctctaaggagccttgaggagacgagcttgaccgggactggacgttct
- ccctgaagacgcaccagagtccaaatacacaagctgggttaagtcaacatatcgatcgaactccaccctgttggtacagccagcatgcttctcga
- gagaaaggtggcgttgttggccccgacctcaaggttatggcacggaaaatgttcggttggatgcttctgtcttccgttccaggctgtggcc
- acttgacaagcactatctacgcagtgccgaaagagcatcagacatcatcaagaagaagtatacatga

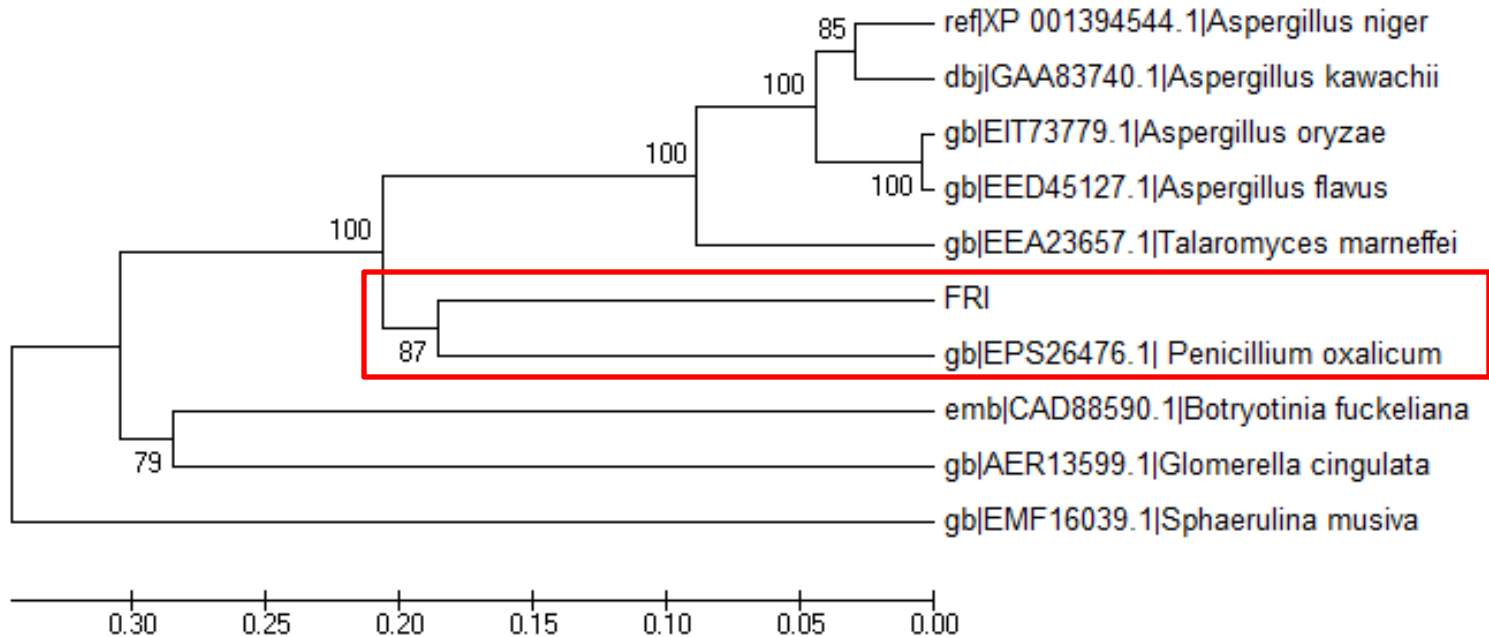




- >Translation of FRI
- ttdsvpqydfvivgggtaglavanrlsemlditvavietgdsvfnnhvnthitgyglsgftaidwayetenqtyaggskqimragkaiggtstingmsytraqsvqidawelvgnegwnwnnllpnykksegfqvptlgqidngadyfiryhgedgpvkvgnamntsslplvldetlsglgvpyrdrvndgnmiglishpdtidrdanirhdaarayywpypenrsnlkiisntrankiiwaegsqseaiaigvevtgvdgpevihaskevilsagslrsplllelsgignpdilkkfdipvkvnistvgenlqdqtnnelsydgreswvgsptfavlpsvehiygdnvssiasfvnssladyakavsnfsngavleanvqaafqtqydlvfkdrvpypaeivfipvahsfmseywpllpfsgsihmassdpshppsinnpnyfmfeqdlnsqadvaryirkifr asplrs lagdelapglvlpedapeskytswvkstyrsnfhpvgtasmlprekggvvgpdlkvvygtenvrvvdasvfpfqvcghltstiyavaerasdiikkkyt*



利用MEGA分析几条来源不相同的葡萄糖脱氢酶的相似性





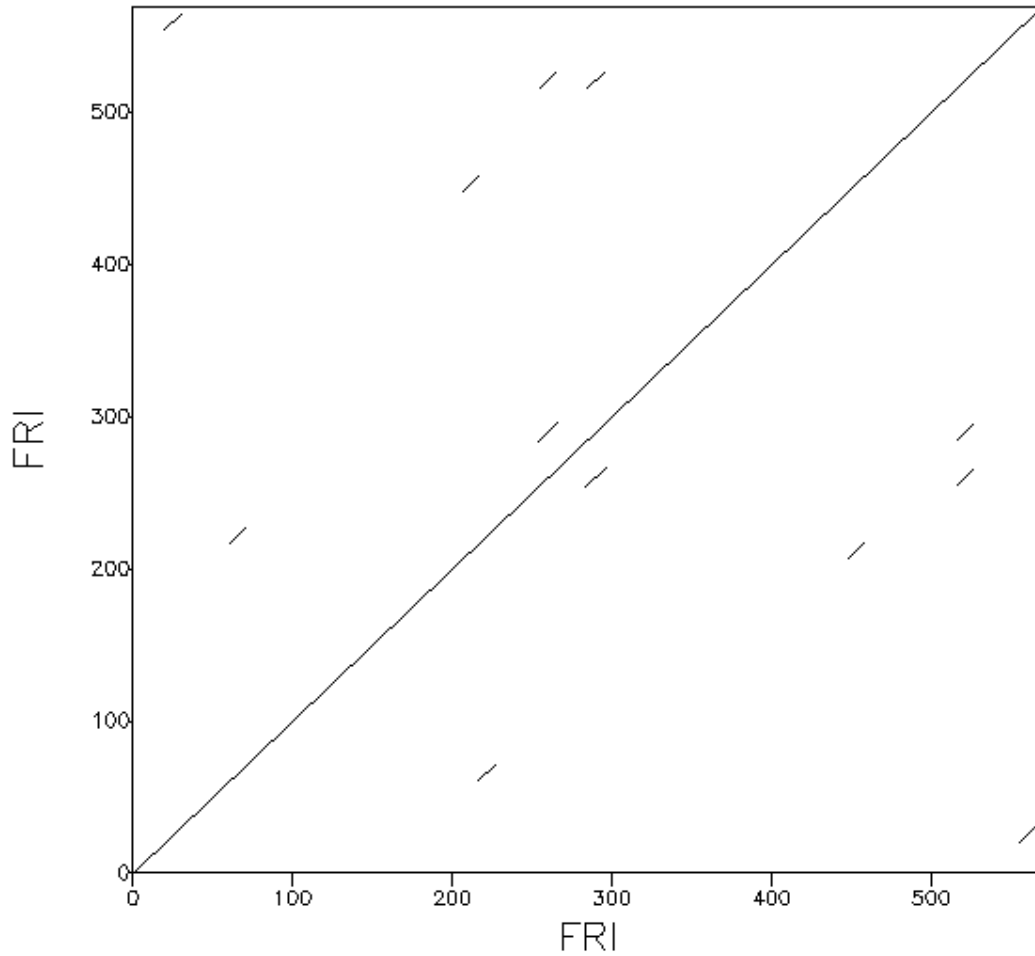
利用needle将FRI和1GPE进行比对分析相似性

Pairwise Alignment Result

LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
608	774.5	196/608 (32.2%)	301/608 (49.5%)	59/608 (9.7%)

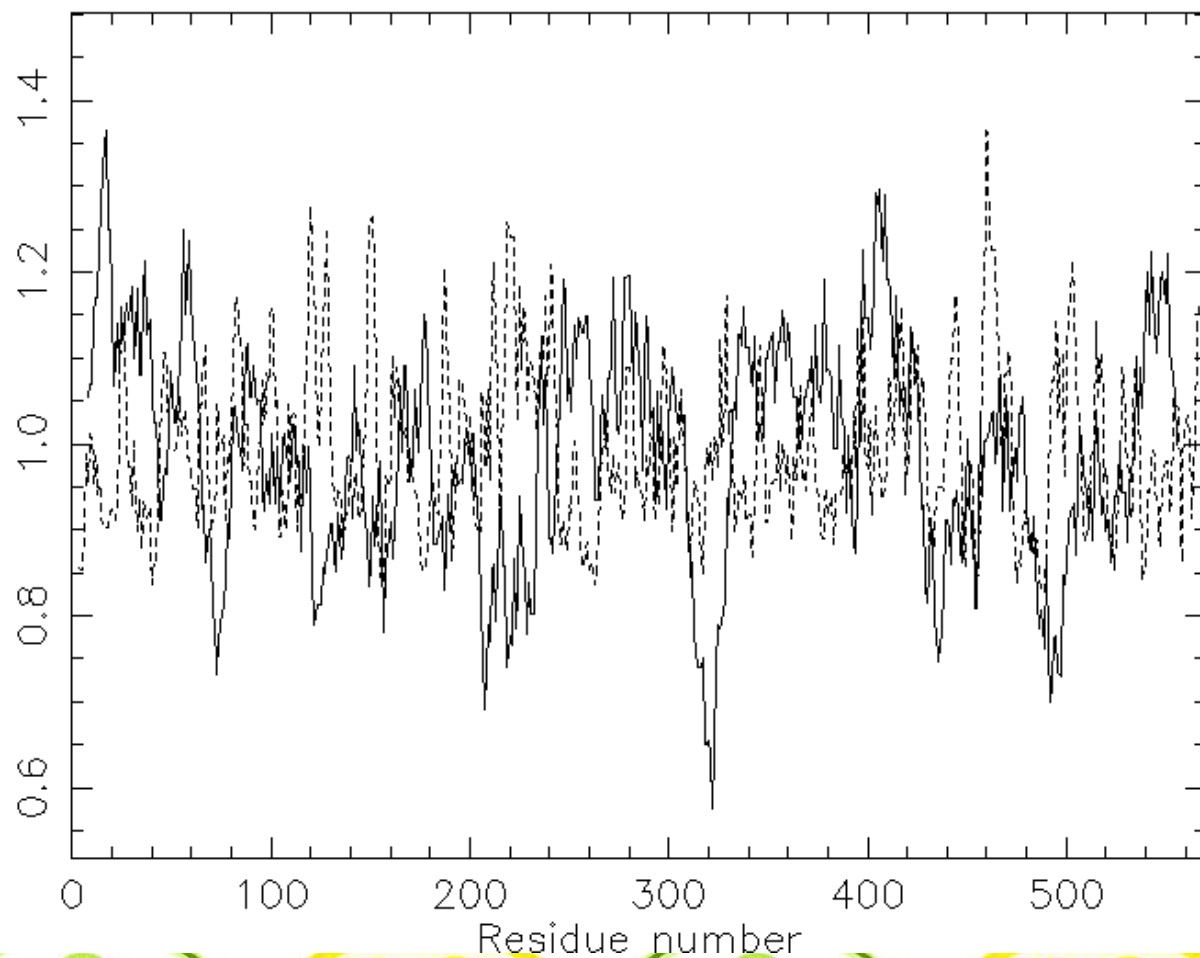


利用**Dotmatcher**分析氨基酸的相似性，链内氨基酸相似程度较低

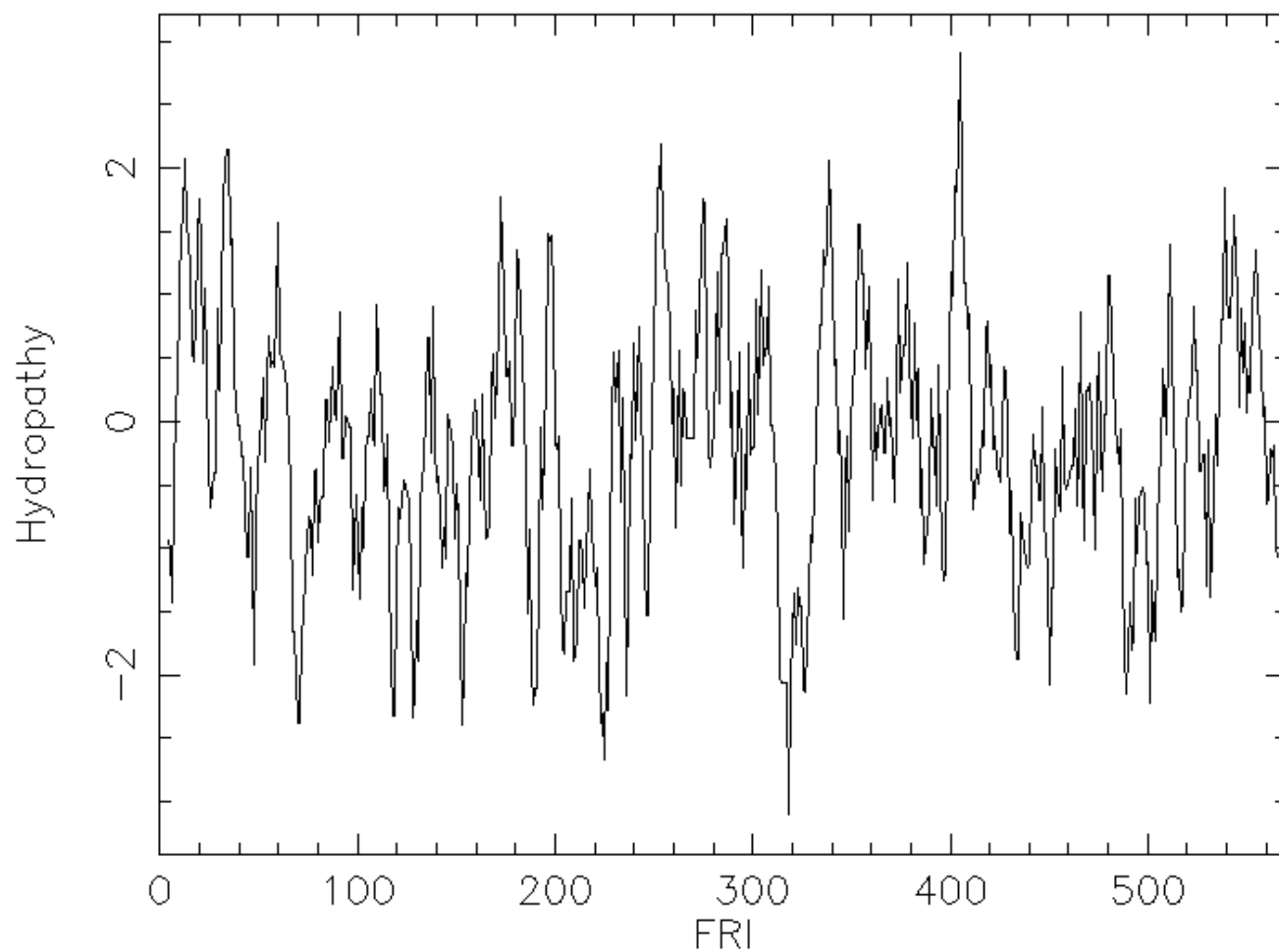


Dotmatcher: fasta::696970:FRI vs fasta::696970:FRI

利用Tmap分析对蛋白质FRI进行跨膜螺旋分析



亲水性分析：采用软件pepwindow





分析了**EcoRI**, **pstI**, **HindIII**等几个常用的酶切位点,
在我们序列中只有**EcoRI**

```
                EcoRI
                \
tgggctggccgaatgcaatgacgaattccagcttgcttctgtgctcgacgaaacctgt
      490      500      510      520      530      540
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
acccgaccggcttacgttactgcttaaggtcgaacgaaggacacgagctgctttgggaca
                /
                EcoRI
```



利用Sigcleave分析其信号肽，推测此蛋白N端无信号肽序列

(1) Score 3.292 length 13 at residues 350->382

Sequence: vssiasfvnssla

350 362

mature_peptide: DYAKAVSNFSENGAVLEANVQAAFQTQYDLVFKDRVPIAEIVFIPVAHSFM

(2) Score 1.708 length 13 at residues 536->548

Sequence: vvdasvfpfqwgc

536 548

mature_peptide: HLTSTIYAVAERASDIKKKYT

(3) Score 1.669 length 13 at residues 11->23

Sequence: vivgggtaglava

11 23

mature_peptide: NRLSEMLDITVAVIETGDSVFNHNVTHITGYGLSPGTAIDWAYETENQT

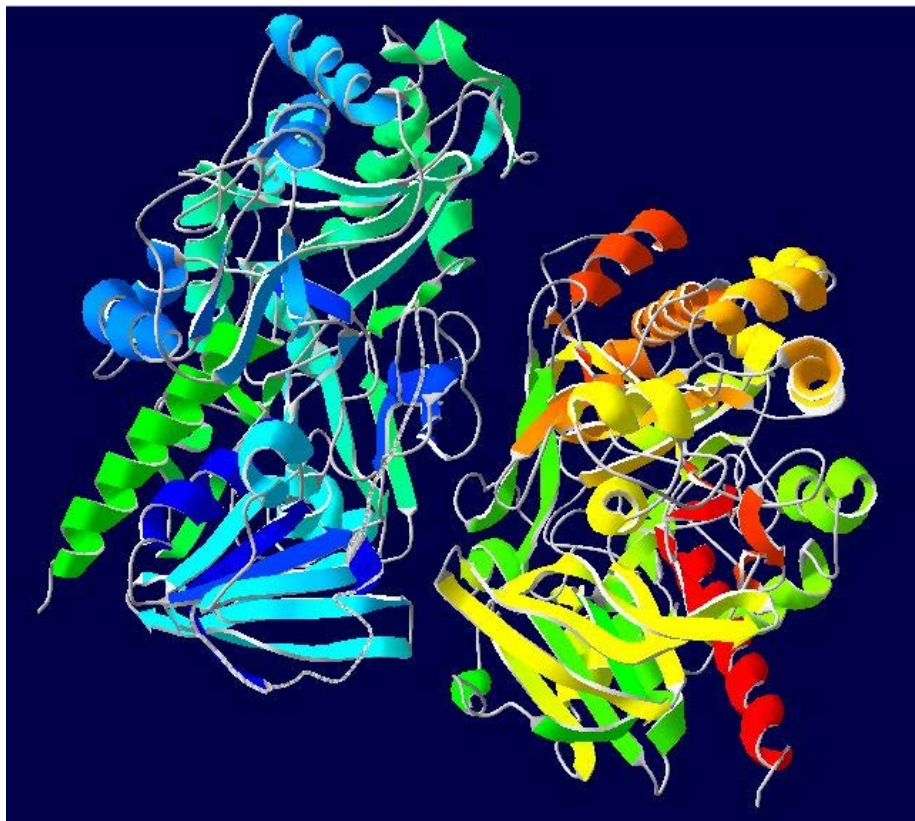
(4) Score 1.044 length 13 at residues 171->183

Sequence: llpvldeqlsllg

171 183

mature_peptide: VPYNRDVNDGNMIGLISHPDTIDRDANIRHDAARAYYWPYENRSNLKIIS

Swiss-PDB viewer 分析了与FRI最相似蛋白的二级结构，PDB ID: 1GPE




分析了半胱氨酸的含量共含有**6**个半胱氨酸，在**A、B**链各**3**个

然后分析其二硫键：
无二硫键形成

蛋白是以二聚体的形式发挥生物活性的



突变模拟：嗜酸嗜碱

- 将多肽链侧链基团表面**231**位的丝氨酸残基分别代之以半胱氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、天门冬氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和赖氨酸, 都使酶的PH耐受范围有一定提高, 其中以**Ser231Lys**在保持高活力的前提下稳定性增加最明显
- 



突变模拟：耐高温

- 8种氨基酸的变化
 - H35和H39,由Glu-96变成Gly;F18和F191,由Glu-96变成Ala;F20,Gln-252变成Leu;F192,Gln-252变成Leu,Ala-258变成Gly;N1,Glu-96变成Lys,Val-183变成Ile;N13和N14,Glu-96变Lys,Val-112变成Ala,Glu-133变成Lys,Tyr-217变成His;N28,Glu-96变成Lys,Asp-108变成Asn,Pro-194变成Gln,Glu-210变成Lys;N71和N72,Tyr-253变成Cys
- 



谢谢

