

应用生物信息学对玉米泛素C末端水解酶的分析

G10成员： 张桃
 康丹
 唐婵娟
汇报人： 范开建
 2014-1-13

提纲

* 实验背景

* 生物信息技术分析

* 讨论

背景

去泛素化酶

(deubiquitinating enzymes, DUBs)



泛素羧基末端水解酶家族

(ubiquitin C-terminal hydrolases UCHs)

泛素特异性加工酶家族

(ubiquitin-specific proteases, USPs)

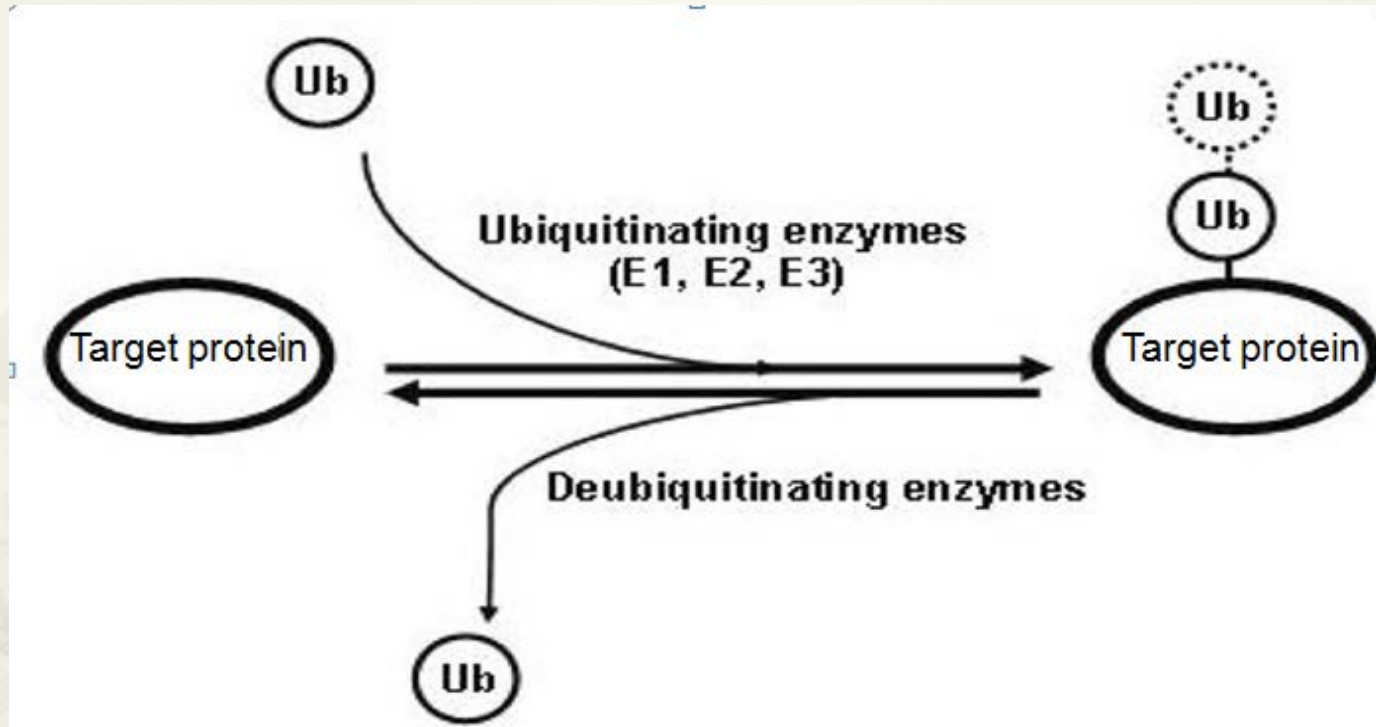


- 1、UCHs属于半胱氨酸蛋白酶。
- 2、它可以通过裂解C末端76位甘氨酸，将泛素分子从小的多肽底物上释放出来。

1、蛋白水解酶中的一大类其催化活性位点含有亲核的Cys 残基

2、成员含有由保守氨基酸残基组成的催化三联体：
Cys-His-Asn / Asp。

泛素酶与去泛素酶功能关系

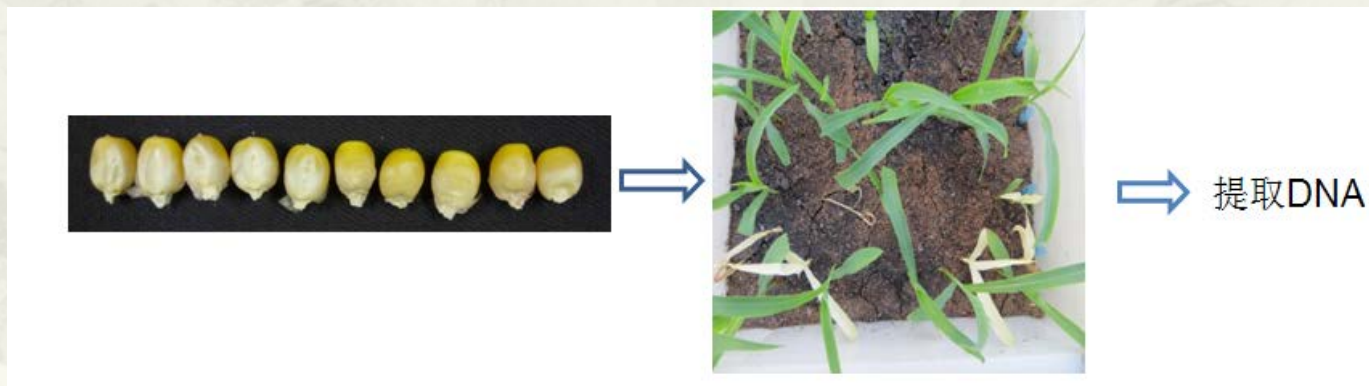


泛素酶与去泛素酶功能关系示意图 (from PubMed)

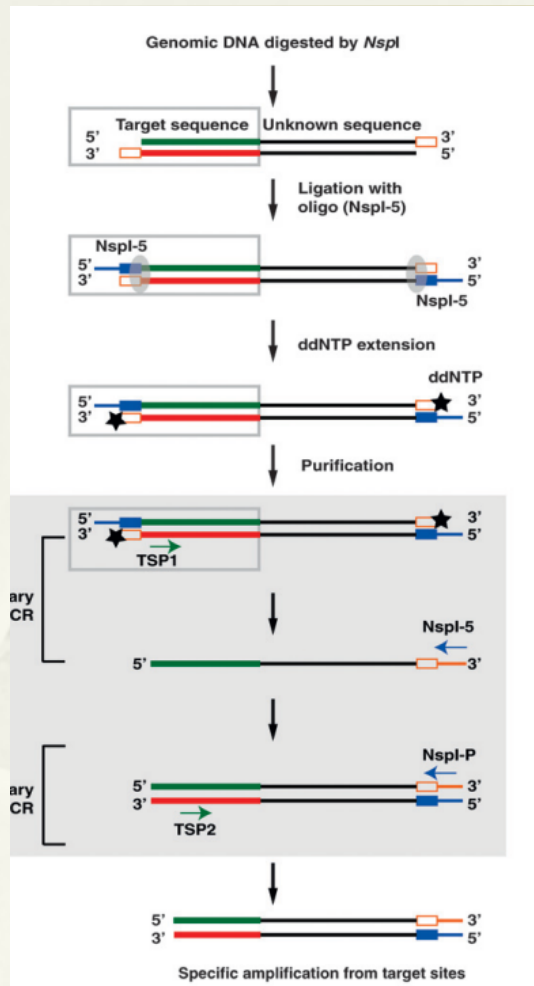
UCH

- * 泛素化酶影响细胞生理活动，包括细胞生长发育的调节、对细胞周期的调节、对信号转导的调节
- * UCHs活性位点上的狭窄裂隙和环状结构直径的限制在一定程度上起到了特异性识别底物的功能，阻止了它对一些大分子泛素化蛋白的结合和催化。

材料



引物设计根据及方法



Primer Premier

Primer: Search Results Edit Primers

Direct Select:

3' TGGAGGAGAGAAGCAGGTATTACCG 5'

5' ACCCTCTCTCTTCGTCCTAATGGCAATTATCTCAGTTCCCGGAAGGCGAGCGCTACTTCGGCCTCGAGAACTTCGGCAACA 3'

T S S L R P - W Q L S Q F P E G E R Y Y F G L E N F G N T

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Δ G [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	86	1	25	66.2	52.0	-47.7	34.4	1	--
Anti-sense	89	25	25	66.2	52.0	-47.7	30.3	1	--
Product	24	--	25	70.4	52.0	--	--	--	44.1

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	Found	Found	None	Found
Anti-sense	None	Found	None	

Most Stable Hairpin:
 ΔG = -0.8 [kcal/mol] (3' Hairpin)

TACCTGCTCTCTCCTCCA 5'
 A ||||
 TATGCC 3'

BLAST

从玉米籽粒突变体中分离得到玉米基因组中一长约150bp的片段，NCBI中BLAST结果为：

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/>	Zea mays putative ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase superfamily protein (LOC100304268), mRNA >gb BT060642.1 Zea mays full-len	141	141	66%	1e-30	100%
<input type="checkbox"/>	Zea mays clone 263504 ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4 mRNA, complete cds	141	141	66%	1e-30	100%

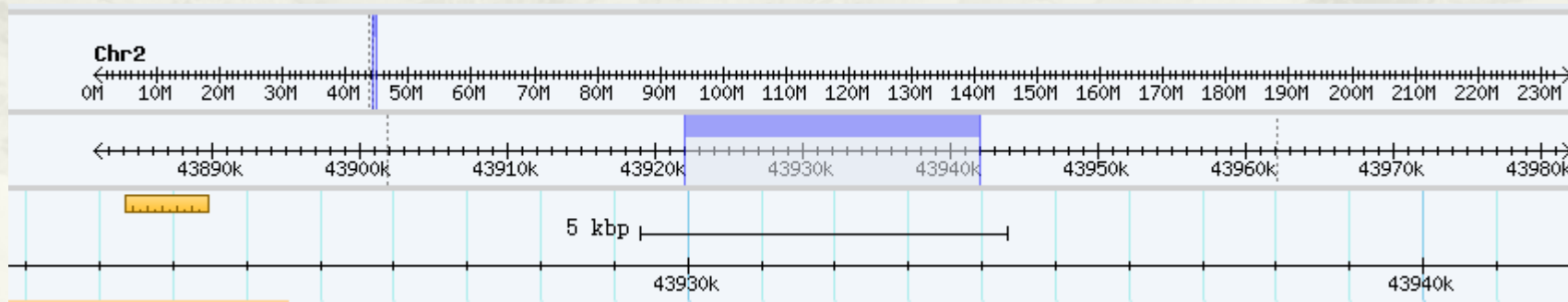
注释信息：长为1714bp的 mRNA，其中3' -UTR和5' -UTR分别为256 bp和351 bp，编码一个 368 aa的蛋白质，为胞内蛋白。

玉米基因组定位

将得到的序列在MaizeGDB中搜索，进行基因组定位：

Target ID	definition	e-value	percent identity
chr2	chr2	7.762e-35	100.00
chr10	chr10	3.611e-33	98.77
chr5	chr5	1.317e-22	92.21
chr1	chr1	1.704e-21	91.03

通过序列比对可知该段基因位于玉米2号染色体大约43,921,000 到 43,941,000bp 处。



氨基酸组成分析

用Pepstats分析其氨基酸组成分析，结果：

Number of amino acids: 368

Molecular weight: 41857.5

Theoretical pI: 5.98

Amino acid composition:

CSV format

Ala (A)	17	4.6%
Arg (R)	12	3.3%
Asn (N)	21	5.7%
Asp (D)	17	4.6%
Cys (C)	11	3.0%
Gln (Q)	17	4.6%
Glu (E)	31	8.4%
Gly (G)	21	5.7%
His (H)	12	3.3%
Ile (I)	12	3.3%
Leu (L)	38	10.3%
Lys (K)	29	7.9%
Met (M)	7	1.9%
Phe (F)	23	6.2%
Pro (P)	14	3.8%
Ser (S)	28	7.6%
Thr (T)	18	4.9%
Trp (W)	1	0.3%
Tyr (Y)	14	3.8%
Val (V)	25	6.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

玉米

Number of amino acids: 371

Molecular weight: 42447.1

Theoretical pI: 6.08

Amino acid composition:

CSV format

Ala (A)	19	5.1%
Arg (R)	12	3.2%
Asn (N)	19	5.1%
Asp (D)	14	3.8%
Cys (C)	10	2.7%
Gln (Q)	16	4.3%
Glu (E)	34	9.2%
Gly (G)	17	4.6%
His (H)	14	3.8%
Ile (I)	15	4.0%
Leu (L)	36	9.7%
Lys (K)	29	7.8%
Met (M)	5	1.3%
Phe (F)	23	6.2%
Pro (P)	12	3.2%
Ser (S)	32	8.6%
Thr (T)	20	5.4%
Trp (W)	2	0.5%
Tyr (Y)	16	4.3%
Val (V)	26	7.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

拟南芥

Number of amino acids: 329

Molecular weight: 37606.8

Theoretical pI: 5.23

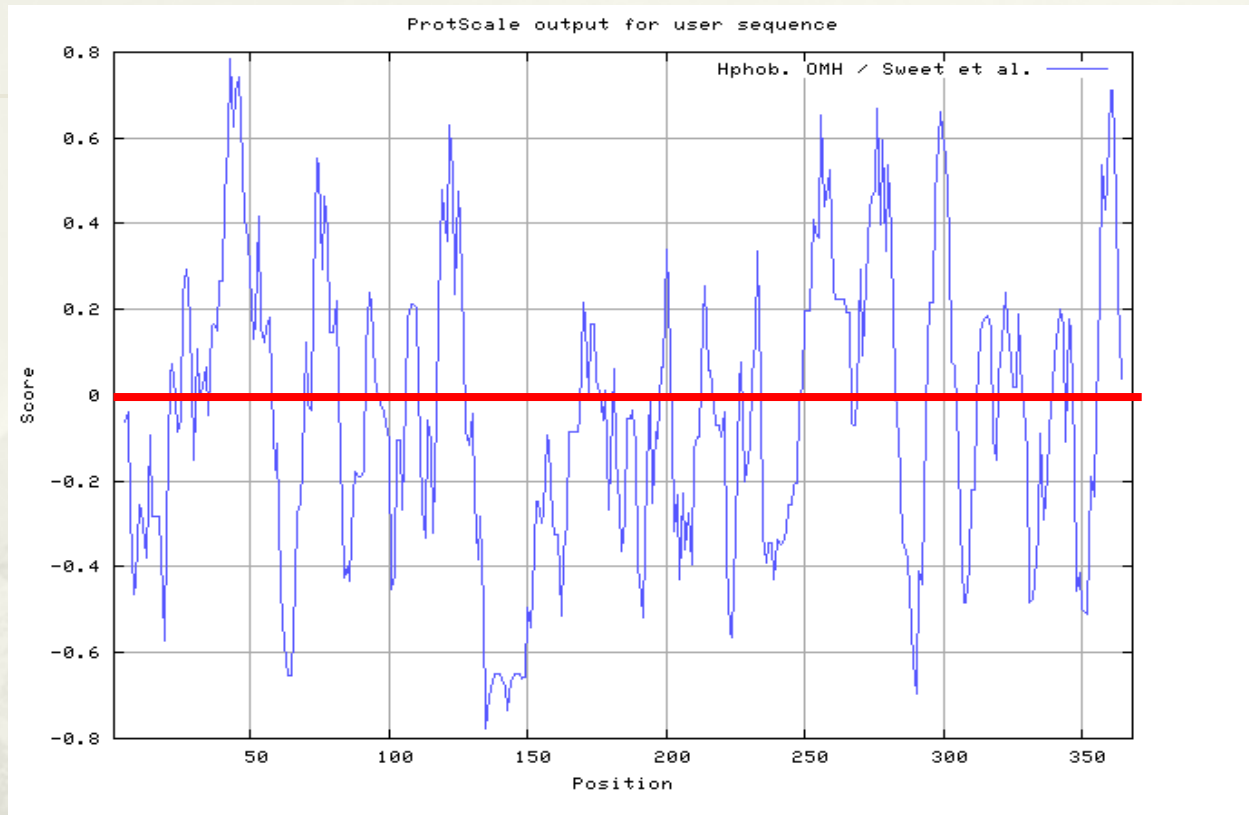
Amino acid composition:

CSV format

Ala (A)	24	7.3%
Arg (R)	14	4.3%
Asn (N)	15	4.6%
Asp (D)	15	4.6%
Cys (C)	5	1.5%
Gln (Q)	23	7.0%
Glu (E)	36	10.9%
Gly (G)	17	5.2%
His (H)	7	2.1%
Ile (I)	21	6.4%
Leu (L)	29	8.8%
Lys (K)	25	7.6%
Met (M)	10	3.0%
Phe (F)	17	5.2%
Pro (P)	11	3.3%
Ser (S)	19	5.8%
Thr (T)	11	3.3%
Trp (W)	4	1.2%
Tyr (Y)	6	1.8%
Val (V)	20	6.1%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

人类

疏水性分析



正值越大说明越疏水，负值越大说明越亲水

亚细胞定位

进行细胞亚单位定位预测，采用TargetP分析，预测转运肽。结果：

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	368	0.044	0.073	0.156	<u>0.949</u>	_	2
cut off		0.000	0.000	0.000	0.000		

cTP: chloroplast transit peptide

mTP: mitochondrial targeting peptide

SP: secretory pathway signal peptide

结果显示定位在线粒体和叶绿体的可能性都不很高

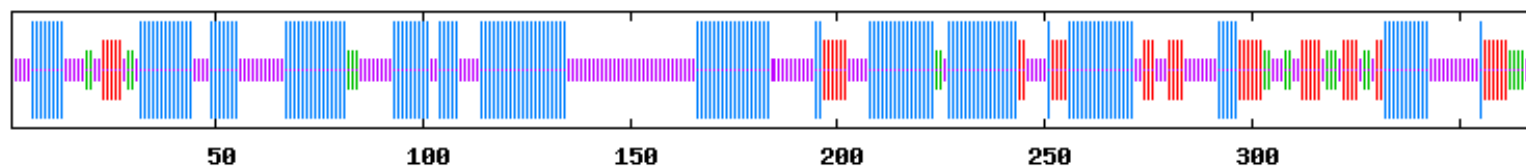
二级结构预测

以数据蛋白序列为模板，用SOPMA做的蛋白质二级结构预测，如下图：

Sequence length : 368

SOPMA :

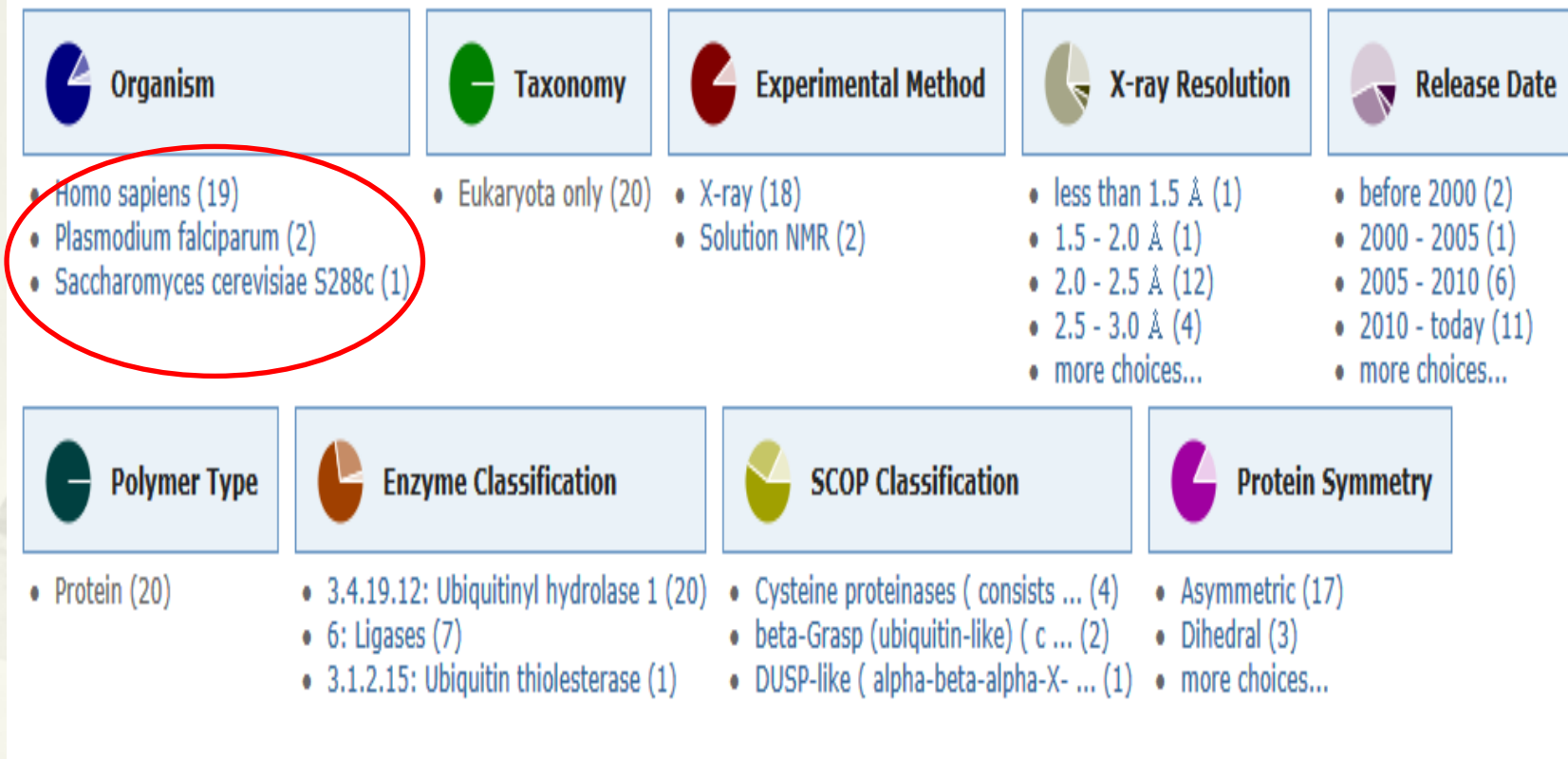
Alpha helix (Hh) :	165 is	44.84%
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand (Ee) :	47 is	12.77%
Beta turn (Tt) :	22 is	5.98%
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%
Random coil (Cc) :	134 is	36.41%
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%
Other states :	0 is	0.00%



α 螺旋与无规则卷曲含量明显多于 β 折叠

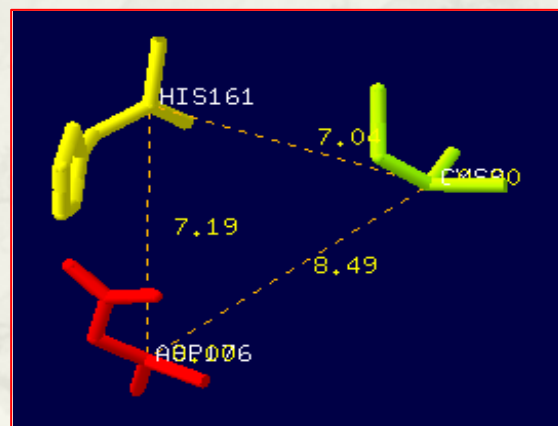
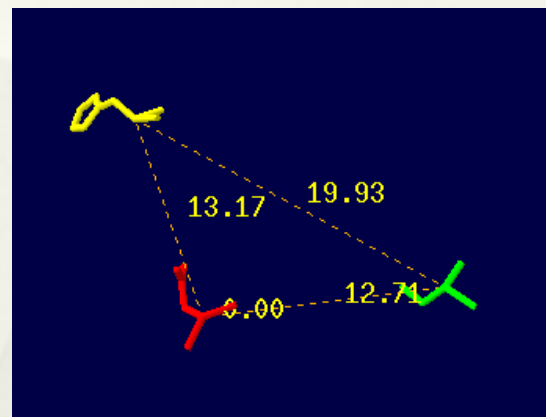
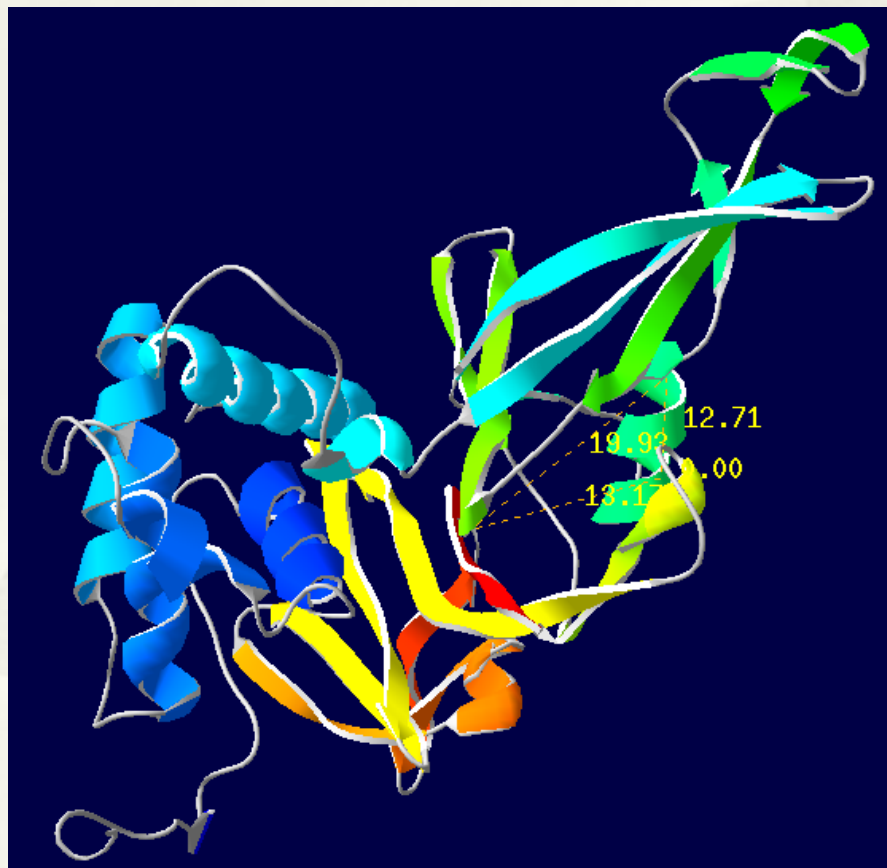
三级结构预测

PDB搜索



三维结构构建

用phyre预测结果：



讨论

- * 植物中泛素C末端水解酶是通过怎样的构象变化来去泛素化？
- * 在玉米突变体中，基因发挥的作用如何与形状关系。

文献引用

- * 黄海杰, 陈雄庭 □ 植物泛素 / 26S 蛋白酶体途径研究进展, 中国生物工程杂志, 2008
- * 闫龙凤, 杨青川. 植物半胱氨酸蛋白酶研究进展, 草业学报, 2005.10
- * 沈子璋, 许啸声. 泛素—蛋白酶体及其抑制剂, MODERN ONCOLOGY, 2006
- * Min xie .Qicai Chen. The Protective Effects of Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 on Neurons, Progress in Biochemistry and Biophysics 2010, 37(10): 1054~1058
- * Olof Emanuelsson . Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. NATURE PROTOCOLS .2007 VOL.2 NO.4 953



谢谢