



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103755790 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201310752496. 3

(22) 申请日 2013. 12. 31

(73) 专利权人 深圳大学

地址 518060 广东省深圳市南山区南海大道
3688 号

(72) 发明人 刘昀 郑易之 石晓英 吴佳辉
胡莹莹

(74) 专利代理机构 深圳市恒申知识产权事务所
(普通合伙) 44312

代理人 陈健

刘昀等. 胚胎晚期富集蛋白与生物的干旱胁迫耐受性. 《生物工程学报》. 2010, 第 26 卷 (第 5 期), 第 569-575 页.

Alsheikh M. K. 等. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. 《Plant, Cell and Environment》. 2005, 第 28 卷 (第 9 期), 第 1114-1122 页.

审查员 蔡苗

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

C12N 9/96(2006. 01)

C12N 9/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1204364 A, 1999. 01. 06, 全文.

CN 1277259 A, 2000. 12. 20, 全文.

权利要求书1页 说明书4页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种磷酸化修饰 LEA 蛋白及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物医药领域,公开了一种磷酸化修饰 LEA 蛋白及其制备方法和应用。该磷酸化修饰 LEA 蛋白在 Ser、Thr 和 Tyr 位点连接有磷酸基团,其制备方法包括以下步骤:克隆 LEA 蛋白基因;构建原核表达载体,将所述 LEA 蛋白基因连接到原核表达载体上;将所述原核表达载体转化到大肠杆菌中,诱导 LEA 基因在大肠杆菌中表达合成 LEA 蛋白,收集纯化所述 LEA 蛋白;利用酪蛋白激酶磷酸化修饰所述 LEA 蛋白。所制得磷酸化修饰 LEA 蛋白对蛋白类产品的保护作用显著增强,可广泛应用于制备蛋白质类产品的保护剂。

1. 磷酸化修饰 LEA 蛋白的应用,其特征在于,磷酸化修饰 LEA 蛋白用于制备蛋白质类产品的保护剂;所述蛋白质类产品为酶制剂;所述磷酸化修饰 LEA 蛋白在 Ser、Thr 和 Tyr 位点连接有磷酸基团;所述 LEA 蛋白为大豆 PM18 蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的磷酸化修饰 LEA 蛋白的应用,其特征在于,所述蛋白质类产品为乳酸脱氢酶制剂。

一种磷酸化修饰 LEA 蛋白及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,尤其涉及一种磷酸化修饰 LEA 蛋白的制备方法及其用于制备蛋白质类产品的保护剂的应用。

背景技术

[0002] LEA (late embryogenesis abundant, 胚胎晚期富集) 蛋白家族有 800 多个成员,存在于植物、细菌、酵母、线虫、真菌和摇蚊等 200 多个生物体中。在植物发育晚期种子中大量积累,与植物的抗逆能力密切相关。LEA 家族基因的表达调控不同,有的 LEA 基因的表达是不受外界因素影响的,而有的 LEA 基因的表达受干旱、低温、高盐等逆境胁迫的诱导。

[0003] 根据 LEA 蛋白的保守序列,可将其分为 7 组。其中,LEA3 蛋白在生物界中的分布最广泛。LEA3 蛋白不仅广泛分布在植物细胞内,而且在非植物物种中发现的 LEA 蛋白多为 LEA3 类似蛋白,如原核生物、摇蚊。尤其是在几乎可耐受完全干燥环境的脱水休眠生物(Anhydrobiotes, 如卤虫、线虫和轮虫等) 中均存在 LEA3 类似蛋白 (Hand S C, et al, 2011; Hinch DK, et al, 2012)。大量实验证据表明,LEA3 蛋白可对脱水胁迫下的蛋白、植物、脱水休眠生物起到很好的保护效果,并可以用于人肝癌细胞的保存 (Li S et al, 2012)。此外,与其他组 LEA 蛋白不同的是,LEA3 蛋白的表达受脱落酸(ABA)的诱导。因此,从 LEA3 蛋白的起源早、高保守性、分布的广泛性分析,LEA3 蛋白是一类具有生物抗脱水保护功能的重要 LEA 蛋白。

[0004] 现有研究表明,LEA3 蛋白序列中存在多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸,这些均为可发生磷酸化修饰的氨基酸。然而,目前还不清楚 LEA3 蛋白是否可被磷酸化修饰及磷酸化修饰后的 LEA3 蛋白具有哪些功能。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种磷酸化修饰 LEA 蛋白的制备方法及其应用。

[0006] 本发明所采用的技术方案是提供一种磷酸化修饰 LEA 蛋白,在 Ser、Thr 和 Tyr 位点连接有磷酸基团。

[0007] 本发明还提供一种磷酸化修饰 LEA 蛋白的制备方法,包括以下步骤:克隆 LEA 蛋白基因;构建原核表达载体,将所述 LEA 蛋白基因连接到原核表达载体上;将所述原核表达载体转化到大肠杆菌中,诱导 LEA 基因在大肠杆菌中表达合成 LEA 蛋白,收集纯化所述 LEA 蛋白;利用酪蛋白激酶(Casein Kinase II, CKII) 磷酸化修饰所述 LEA 蛋白。

[0008] 本发明还提供一种磷酸化修饰 LEA 蛋白的应用,将所述磷酸化修饰 LEA 蛋白用于制备蛋白质类产品的保护剂。

[0009] 本发明的有益效果在于:通过基因克隆原核表达 LEA 蛋白,再利用 CKII 进行磷酸化制备磷酸化修饰 LEA 蛋白,生产效率高,成本较低。所制得磷酸化修饰后 LEA 蛋白对蛋白质类产品的保护作用显著增强,可有效保护酶制剂的活性。磷酸化修饰 LEA 蛋白可广泛应

用于制备蛋白质类产品的保护剂,利于产品的稳定及保存。

附图说明

- [0010] 图 1 是本发明实施例 1 大豆 PM18B 双向电泳图谱 ;
[0011] 图 2 是本发明实施例 PM18B 基因 PCR 产物电泳图 ;
[0012] 图 3 是 PM18 基因与本文克隆的 PM18B 基因的碱基序列比对图,其中,
[0013] NCBI PM18 为 NCBI 公布的大豆 PM18 碱基序列 ;PM18B 为本发明中克隆
[0014] 的 PM18B 基因 ;
[0015] 图 4 是 BL21-pET-28a-PM18B 菌液 PCR 鉴定电泳图 ;
[0016] 图 5 是 PM18B 蛋白 SDS-PAGE 电泳图 ;
[0017] 图 6 是本发明实施例 1 大豆 PM18B 蛋白对 LDH 酶的保护作用

具体实施方式

[0018] 为了使本发明所要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0019] 本发明实施例提供了一种磷酸化修饰 LEA 蛋白的制备方法,包括以下步骤:克隆 LEA 蛋白基因;构建原核表达载体:将所述 LEA 蛋白基因连接到原核表达载体上;表达获得所述 LEA 蛋白:将所述原核表达载体转化到大肠杆菌中,诱导 LEA 基因在大肠杆菌中表达合成 LEA 蛋白,收集纯化所述 LEA 蛋白;利用蛋白激酶 CKII 磷酸化修饰所述 LEA 蛋白。

[0020] 其中,所述 LEA 蛋白为大豆 PM18B 基因,所述 PM18B 基因经过磷酸化修饰后,可明显增强其对酶的保护效果。

[0021] 本发明中还提供一种磷酸化 LEA 蛋白,所述磷酸化 LEA 蛋白为磷酸化 PM18B 蛋白。

[0022] 本发明还提供一种磷酸化修饰 LEA 蛋白的应用,将所述磷酸化修饰 LEA 蛋白用于制备蛋白质类产品的保护剂。

[0023] 本发明方法生产效率高,成本较低,所制得磷酸化修饰 LEA 蛋白可应用于制备蛋白质类产品的保护剂,尤其可应用于作为酶制剂的保护剂,可有效保持酶的活性,延长保存期限。以下列举 LEA3 族的大豆 PM18 基因为例结合具体参数进一步说明。

[0024] 实施例 1 大豆 PM18 蛋白存在磷酸化修饰

[0025] 采用 Hepes 等缓冲液和热处理的方法提取了萌发后,胚根未突破种皮的大豆胚根的热稳定蛋白质,定量后运用双向电泳技术将热稳定蛋白质组进行双向电泳,电泳图谱如图 1 所示。实验结果表明,PM18 共含有 5 个异构体,它们的分子量一致($M_r=35\text{kDa}$),而等电点不一致($\text{PI}=6.2、6.0、5.8、5.6$ 和 5.4)。

[0026] 运用 MALDI-TOF/TOF MS 进一步鉴定了 PM18 蛋白的准分子离子峰的理论值和测量值($m/z [M+H]^+$),结果显示,PM18 Tyr-136 的准分子离子峰的理论值和测量值($m/z [M+H]^+$)(500.3130Da 与 402.2715Da)之间相差 98.04Da ,为一个磷酸分子的分子量(98Da)。由此可见,PM18 的 Tyr-136 发生了磷酸化修饰。

[0027] 实施例 2 磷酸化修饰 LEA 蛋白的制备

[0028] (1) 大豆 PM18B 基因的克隆

[0029] 制备培养 24 小时的大豆种子(白农六号)胚根的总 cDNA。以 cDNA 为模板,PM18AF 和 PM18AR 为引物,PCR 扩增得到约 970bp 的特异片段,与理论值一致,如图 2 所示。将基因片段与 pMD18-T(simple)载体连接,连接产物转化大肠杆菌 TOP10。将阳性重组菌测序,结果表明所克隆得到大豆 PM18B 基因与 NCBI 上登录的 pGmPM18 基因(GenBank:AF009953.1)相比,结果如图 3 所示,在第 712bp 至第 732bp(包括这两个碱基)处缺少 21bp,我们暂时将克隆得到的该基因命名为 PM18B 基因。

[0030] 引物序列如下所示:

[0031] PM18AF:5' -CCGTCATGAGGCATCATCATCATCATCACATGGCGTCAAGACAGCAAT-3' PM18AR:5' -CACGGAATTCTCACATTTTCTCCCTACGA-3'

[0032] (2) 原核表达载体 pET-28a-PM18B-His 的构建及鉴定

[0033] 利用 pag I 和 EcoR I 双酶切克隆有 PM18B 基因的 T 载体,回收约 1000bp 的酶切产物,并与经过 Nco I (pag I 的同尾酶)和 EcoR I 双酶切过的 pET-28a 连接,连接产物转化 TOP10。提取菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌的质粒 pET-28a-PM18B,转化大肠杆菌 BL21。菌液 PCR 法鉴定重组菌 BL21-PM18B,结果表明前者的 PCR 产物中有特异的条带,分子量约 960bp,与理论值相符。

[0034] (3) 大肠杆菌原核表达的 PM18B 蛋白的获得

[0035] 挑取 BL21-PM18B 菌株的单克隆进行过夜培养。扩大培养至 OD600 值约为 0.6 ~ 0.8,加入终浓度为 0.1mM 的 IPTG,诱导外源蛋白质在大肠杆菌中表达。8h 后收集菌体,利用快速蛋白液相色谱系统对这两个蛋白进行纯化,得到 PM18B 蛋白。

[0036] (4) 大豆 PM18B 蛋白磷酸化处理

[0037] 真核生物发生磷酸化修饰的位点为 Ser, Thr 和 Tyr。而原核生物大肠杆菌表达的蛋白质在 Ser 位点发生磷酸化修饰, Thr 和 Tyr 位点不发生磷酸化修饰。因此,我们利用 CKII 对原核表达的 PM18B 蛋白进行磷酸化修饰。取 2 支 EP 管,分别加入 0.94 μ l Tris Buffer, 0.1 μ l 100mM ATP, 1 μ l 浓度为 100 μ M 的 PM18 蛋白;然后一管加入 0.1 μ l CKII, 一管不加 CKII, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5h, 加入 26 μ l PBS buffer, 4 $^{\circ}$ C 保存过夜。

[0038] 实施例 3 磷酸化修饰对大豆 PM18B 蛋白保护 LDH 酶活性的影响

[0039] 将磷酸化前后的 PM18B 蛋白与 LDH 酶(50 μ g/ml),按照摩尔比(蛋白:LDH 酶)为 1:1、4:1 和 8:1 的比例配制成 40 μ l 的酶溶液。将酶溶液放入液氮速冻 1min。然后放置于 25 $^{\circ}$ C 恒温器中复性 5min。反复冻融 3 次。取 5 μ l 酶溶液加入到 2ml 底物中(10mmol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄, PH7.5, 7.5mmol/L 丙酮酸, 0.1mmol/L NADH),利用紫外分光光度计测定反应体系在起始 2min 内 A₃₄₀的减少值。每个反应重复 2 次。每次 2 个平行。综合 4 次实验结果,计算平均值和标准差。根据以下公式计算出残留酶活。LDH 酶残留酶活(%)=(待测样品冻融后 Δ A₃₄₀/冻融前 Δ A₃₄₀) $\times$ 100%。以残留酶活为纵座标,蛋白与 LDH 酶的质量比为横坐标,绘制出 LDH 酶的残留酶活柱形图。以溶菌酶作为阴性对照组。

[0040] 结果如图 6 所示,当加入溶菌酶即摩尔比为 0:1 的时候, LDH 酶在冻融后残留活性为 2.1%;当 PM18B 蛋白与 LDH 酶的摩尔比为 1:1 时, LDH 酶冻融后的残留活性在 PM18B 蛋白磷酸化前为 2.6%,磷酸化后为 3.9%;在 PM18B 蛋白与 LDH 酶的摩尔比为 4:1 时, LDH 酶的残留活性在 PM18B 蛋白磷酸化前为 9.1%,磷酸化后为 17.9%,二者达到极显著性差异(P<0.01);当 PM18B 蛋白与 LDH 酶摩尔比为 8:1 时, LDH 酶的残留活性在 PM18B 蛋白磷酸化

前为 15%，磷酸化后为 21.1%，二者达到显著性差异 ($P < 0.05$)。

[0041] 综上所述，磷酸化修饰后 LEA 蛋白对酶活性的保护作用显著增强，可应用于制备蛋白质类产品的保护剂，尤其是酶制剂存放及稳定的保护剂。

[0042] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 深圳大学

<120> 一种磷酸化修饰 LEA 蛋白及其制备方法和应用

<130> 13PA00812CN

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 930

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 1

atggcgctcaa gacagcaatt caaggaagac agagccgagg cagctgcaa actcgagcg 60

aaagacatcg gcgacatcaa cagaacaaac gagcgcgacg aggggtacga ctgcacgac 120

gaagccaact tcaagcaagc acgagctgaa gcagctgcaa agctggcggc caaggatctg 180

gaggacgcta acagattaag agacaacact ttcaacacat ggaaagagca acatcagcat 240

gatgagaaca aaccgggtgt gatagggtcc atgtttagag ccgccaagga agccgtggtt 300

gggaagcctc accacgagga agtttatgca aaggaaacaa agatgggtga atattcagat 360

tatgcgactc agaagcgag ggaaacgaag cagaaggctg gggagtatac agactatgcg 420

gctcagaag caaaagaac caaagactat gctgctgaga aggctaagaa tgctaaagat 480

accactgtgc agaaagctgg agagtacaag gattataccg ctgagaaggc taagaatgct 540

aaagatacca ctgtgcagaa agctggagaa tacaaggatt ataccgctga gaaggcaatt 600

gaagggaagg acagtgcagt ggggaagctt ggggagctaa aggaatctgc tgctgatgct 660

gctaaaaggg ctatgggttt cttcacgggt ggcaacaaag accaaactag agaggaggag 720

gaggaaacga ggcggagtat gcaggagggtg aggggtgcaag ataaggagta tggaacggga 780

[0002]

cggtgtactg gagagaagtt ggtgataaaa atggaagagt cgcggccagg agcgggtggcg	840
gatgcgctca aagcagcgaa tagggccatg gacggcgata tggaggagga aggcgtgctt	900
catgtggagc gtcgtaggga gaaaatgtga	930

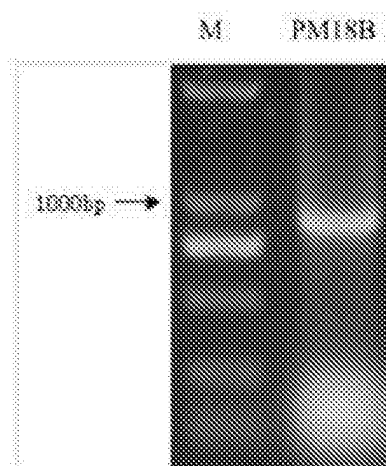


图 4

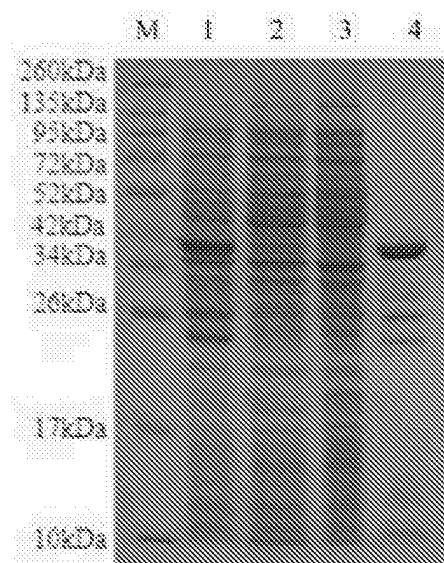


图 5

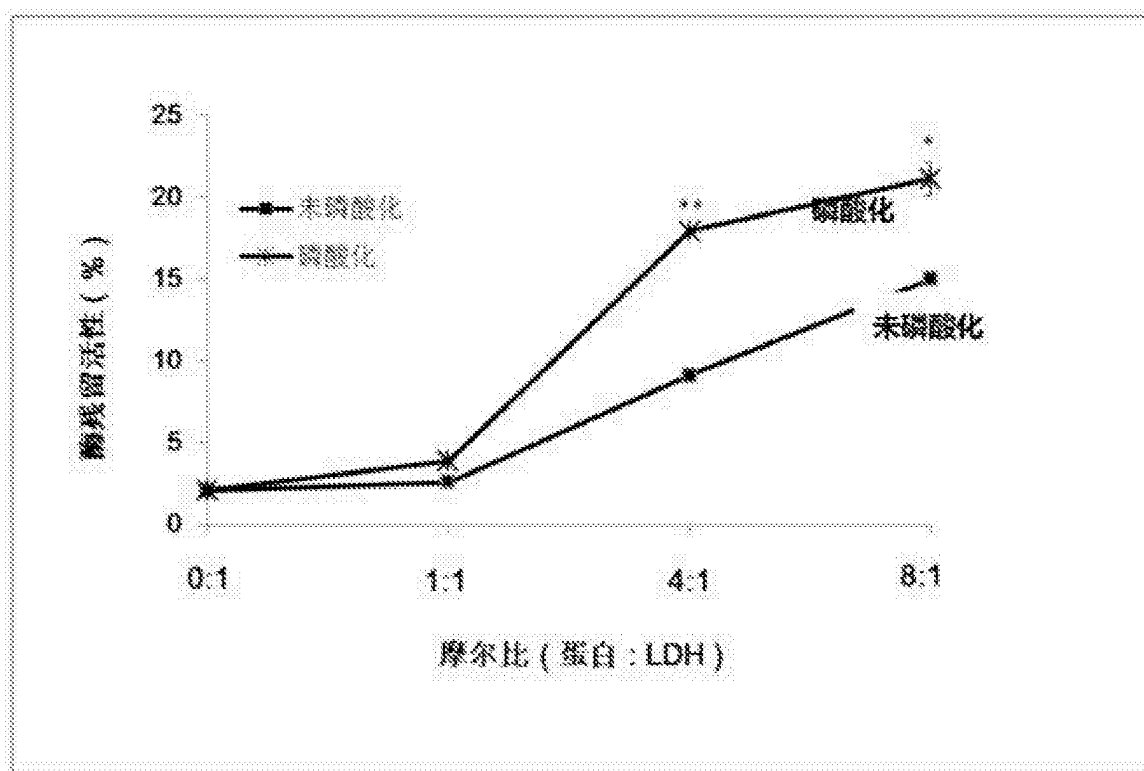


图 6