



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107164356 B

(45)授权公告日 2020.07.31

(21)申请号 201710342821.7

C12N 15/29(2006.01)

(22)申请日 2017.05.16

C12N 15/70(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 15/11(2006.01)

申请公布号 CN 107164356 A

C07K 14/415(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

(43)申请公布日 2017.09.15

(73)专利权人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区南海大道3688号

(56)对比文件

GeneBank.XM_003537536.3.《GeneBank》.2015,第1-2页.

Liu Yun等.Intrinsically disordered proteins as important players during desiccation stress of the soybean radicles.《Journal of Proteome Research》.2017,第1-58页.

(72)发明人 刘昀 程华 郑易之 孙楠

谭芳美 吴佳辉

(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 王利彬

审查员 艾超仁

(51)Int.Cl.

C12N 9/96(2006.01)

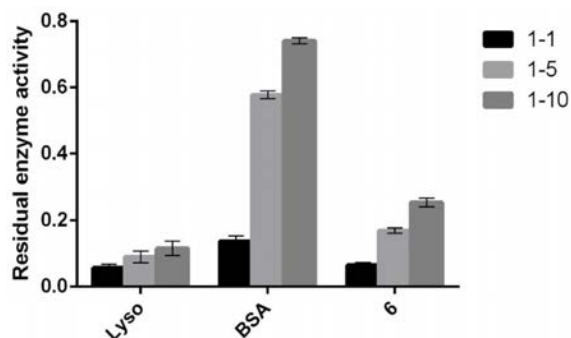
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种大豆蛋白的应用及其制备方法和表达载体、引物

(57)摘要

本发明公开一种大豆蛋白的应用及其制备方法和表达载体、引物,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma11g07260.1,将所述大豆蛋白用于制备冻存蛋白类生物制品的保护剂。该大豆蛋白为植物性蛋白,对蛋白类生物制品,尤其是酶类制品,起到很好的保护作用。



1. 一种大豆蛋白的应用,其特征在于,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma11g07260.1,将所述大豆蛋白用于制备冻存蛋白类生物制品的保护剂,所述冻存蛋白类生物制品为LDH酶制剂。

一种大豆蛋白的应用及其制备方法和表达载体、引物

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,主要涉及一种大豆蛋白的应用及其表达载体和制备方法。

背景技术

[0002] 牛血清白蛋白在生化实验中有广泛的应用,现有技术多使用添加BSA(牛血清白蛋白)来保护蛋白类生物制品。例如在western blot中作为Blocking agent;在酶切反应缓冲液中加入BSA,通过提高溶液中蛋白质的浓度,对酶起保护作用。防止酶的分解和非特异性吸附,能减轻有些酶的变性,能减轻有些不利环境因素如加热,表面张力及化学因素引起的变性。但是BSA来源于动物,存在一定的使用风险,在碱性环境下很容易被蛋白酶水解,同时因为具有多个酶切位点,所以很容易形成多种不同大小的多肽片段,可能导致目的蛋白纯度下降,并且具有潜在的血源性病原体污染,应用中并不安全。

[0003] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0004] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种大豆蛋白的应用及其表达载体和制备方法,旨在解决现有BSA用于保护蛋白类生物制品存在风险的问题。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种大豆蛋白的应用,其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma11g07260.1,将所述大豆蛋白用于制备冻存蛋白类生物制品的保护剂。

[0007] 所述的大豆蛋白的应用,其中,所述冻存蛋白类生物制品为酶制剂。

[0008] 一种大豆蛋白的制备方法,其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma11g07260.1,其制备方法包括以下步骤:

[0009] 扩增目的基因:以F:3'-ATGTTTCACTCAATCAAAAC GG-5';R:3'-TTAATTGGCGCTGGTCTGGTG-5'作为引物,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增,得到目的基因片段,目的基因片段的基因序列如SEQ ID NO.4所示;

[0010] 构建重组质粒:将目的基因片段与经Nde I和Xho I双酶切的蛋白表达载体PET-28a,通过T4连接酶连接酶切产物,构建pET-28a重组质粒;

[0011] 转化感受态细胞:将pET-28a重组质粒转化大肠杆菌BL21Star感受态细胞;

[0012] 诱导表达:将含有pET-28a重组质粒的菌株扩大培养,加入1% IPTG贮存液过夜诱导,将诱导后的菌体离心收集,重悬,破碎菌体,离心,取上清液,得总可溶性蛋白;

[0013] 蛋白分离纯化:对所得的总可溶性蛋白进行亲和层析,分离纯化目的蛋白。

[0014] 所述的大豆蛋白的制备方法,其中,构建重组质粒过程中,包括以下步骤:

[0015] 将目的基因片段和经过双酶切的PET-28a蛋白表达载体按照摩尔比10:1混合,加入0.5μL T4连接酶,1μL 10×Buffer,用水补齐至10μL,16℃连接过夜。

[0016] 所述的大豆蛋白的制备方法,其中,诱导表达过程中,包括以下步骤:

[0017] 将含有pET-28a重组质粒的菌株扩大培养,加入1%IPTG贮存液,在16℃下150rpm过夜诱导,将诱导后的菌体离心收集,用Balance Buffer重悬,破碎菌体,在4℃,10000rpm下离心30min,取上清液。

[0018] 所述的大豆蛋白的制备方法,其中,蛋白分离纯化过程中,包括以下步骤:

[0019] 将总可溶性蛋白经镍离子亲和层析,利用蛋白脱盐柱去除蛋白溶液中的咪唑,将脱盐后的蛋白溶液冷冻干燥,用PBS缓冲液复溶,用分子筛分离纯化凝血酶酶切产物。

[0020] 一种用于制备大豆蛋白的引物,其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma11g07260.1,引物的序列如下所示:

[0021] F:3'-ATGTTTCACTCAATCAAAACGG(Nde I)-5' ;

[0022] R:3'-TTAATTGGCGCTGGTCTGGTG(Xho I)-5' 。

[0023] 一种用于制备大豆蛋白的表达载体,其中,所述表达载体为携带有SEQ ID NO.4所示的大豆蛋白基因,用于表达基因编码为Glyma11g07260.1的大豆蛋白。

[0024] 所述的用于制备大豆蛋白的表达载体,其中,所述表达载体用PET-28a蛋白表达载体重组得到,该大豆蛋白基因通过酶切位点Nde I和Xho I连接在表达载体上。

[0025] 有益效果:大豆热稳定蛋白有许多生物学功能特性,近来的研究发现,在胁迫条件(如干旱、高温、冷冻等)下,其可以提高蛋白抵抗逆境能,能够对生物膜和蛋白质等生物大分子发挥良好的保护作用。大豆蛋白属于植物,安全性较高,如果投入到生产应用中,能够较好解决蛋白类产品在运输过程中经冷冻胁迫活性降低的问题。

附图说明

[0026] 图1为本发明实施例1中利用PCR扩增大豆基因片段的电泳结果图(M为DL2000 Marker)。

[0027] 图2为本发明实施例1中利用菌落PCR验证重组菌的电泳结果图(M为DL2000 Marker)。

[0028] 图3为本发明实施例5中6号蛋白的诱导表达的电泳结果图。

[0029] 图4为本发明实施例7中6号蛋白的表达纯化的电泳结果图。

[0030] 图5为本发明实施例7中Western-blotting结果图。

[0031] 图6为本发明实施例8中不同溶液下蛋白二级结构的数据示意图。

[0032] 图7为本发明实施例9中LDH酶的残留酶活柱状图。

具体实施方式

[0033] 本发明提供一种大豆蛋白的应用及其表达载体和制备方法,为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。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。

[0034] 本发明所提供的一种大豆蛋白的应用,是将所述大豆蛋白用于制备冻存蛋白类生物制品的保护剂。其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma11g07260.1。所述冻存蛋白类生物制品可以为酶制剂。

[0035] 所述大豆蛋白的基因序列(SEQ ID NO.1)如下所示:

[0036] TTTGCATTGTTGCGATCAAATTCAACCCGTGTCGAAATTACAGGACTACCATGCACACAGCCTCTTAA

TAAGCCTATACCACTGCCTCTTCTATAAGATCTCAACATATATAGAAAAATTATGTTTCACTCAATCAAAACG
GTTTAACTGTCCACAAGTTTCATTCCTGCACGGTCTCTCTTCCAACCTTGGTCGGGAACTTGCGCAGTTA
GATTCTGCACTGACAGTGCTCGTAAGATGGACAAGACTCAGAAGCCTAGTACTGAGGAAAATAACAAGGAGATAC
GATGTCTCATTCATTTGGGGAAGGGTACGCTACGAGGTCTGACGAAGAAGGGTTTGGTGGAGTTTATGGTGGAAAC
CAATCGAAGCCTGAGATGGACCCAGCTTATGACAAGACGCAGGGAAGTGAGGTGAAGGAGAAGGAAAAAGCGAGGC
ACCAGACCAGCGCCAATTAACGCTTAATTAGGTTATTAGTTATGTGGAGGGGTGTTTATGCATGTAACGTTTCGTT
CTATATCTCGTCCTTTTGTGATTTTTCTTCCTGCAGCTCTTTTTTTTTTTGTTTTTAACACAAAAAATTAAT
GGACCATGATCGTTGTTACATACTATTAATAGCAAATGGATATTCAGCGAGTTTACATATA。

[0037] 本发明中,以R0期和R15期大豆胚根作为实验材料,采用100℃热处理10min后离心获得上清,富集得到的可溶性蛋白即为热稳定蛋白。根据蛋白组学和结构预测结果,在R0期高表达蛋白中挑选了1个蛋白进行结构和功能分析,该蛋白即本发明所述大豆蛋白。本发明中还提供用于扩增该大豆蛋白基因序列的引物,根据PMD19-T载体和基因的序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在基因的上下游引物的5'端分别引入核酸内切酶(Nde I)和(Xho I)两端的同源序列。引物的序列如下所示:

[0038] F:3'-ATGTTTCACTCAATCAAAACGG(Nde I)-5'(SEQ ID NO.2);

[0039] R:3'-TTAATTGGCGCTGGTCTGGTG(Xho I)-5'(SEQ ID NO.3)。

[0040] 本发明中还提供一种用于制备该大豆蛋白的表达载体,所述表达载体用PET-28a蛋白表达载体重组得到,该大豆蛋白基因通过酶切位点Nde I和Xho I连接在表达载体上。

[0041] 本发明中还提供一种上述大豆蛋白的制备方法,其制备方法包括以下步骤:

[0042] 扩增目的基因:根据PMD19-T载体和基因的序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在基因的上下游引物的5'端分别引入核酸内切酶(Nde I)和(Xho I),以F:3'-ATGTTTCACTCAATCAAAACGG-5';R:3'-TTAATTGGCGCTGGTCTGGTG-5'作为引物,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增,得到目的基因片段;目的基因片段的基因序列(SEQ ID NO.4)如下所示:

[0043] ATGTTTCACTCAATCAAAACGGTTTAACTGTCCACAAGTTTCATTCCTGCACGGTCTCTCTTCC
CAACCTTGGTCGGGAACTTGCGCAGTTAGATTCTGCACTGACAGTGCTCGTAAGATGGACAAGACTCAGAAGCCT
AGTACTGAGGAAAATAACAAGGAGATACGATGTCTCATTCATTTGGGGAAGGGTACGCTACGAGGTCTGACGAAG
AAGGGTTTGGTGGAGTTTATGGTGGAAACCAATCGAAGCCTGAGATGGACCCAGCTTATGACAAGACGCAGGGAAG
TGAGGTGAAGGAGAAGGAAAAAGCGAGGCACCAGACCAGCGCCAATTAA。

[0044] 构建重组质粒:将目的基因片段与经Nde I和Xho I双酶切的蛋白表达载体PET-28a,通过T4连接酶连接酶切产物,构建pET-28a重组质粒;pET-28a重组质粒的基因序列(SEQ ID NO.5)如下所示:

[0045] ATTCTCACGCGCGGTTGTGAGACTCCACAGTGTGAGAGATGTACCAC TCTCTCGACAACACAAAAC
TGATGTCTTCAGACATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGGAGCAAAAAACAAGAAGGCCAAAATGCCGCA
AAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTTTCAATATTATGAAGCATTTATCAGG
GTTATGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATGGGGGTCCGCGCACATTTCCC
CGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGC
CCTTTTCGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTG
TCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCTGGCTT

AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGA
GAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC
GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCA
CGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTAGAAGTTCGGTACGCGCGGATCTTCCAGAGATTCGCCCATATGTTTCA
CTCAATCAAAACGGTTTTTAACCTGTCCACAAGTTTCATTCCCTGCACGGTCTCTCTCTTCCAACCTTGGTCGGAA
ACTTGCGCAGTTAGATTCTGCACTGACAGTGCTCGTAAGATGGACAAGACTCAGAAGCCTAGTACTGAGGAAAATA
AACAAGGAGATACGATGTCTCATTCATTTGGGGAAGGGTACGCTACGAGGTCTGACGAAGAAGGGTTTGGTGGAGT
TTATGGTGGAAACCAATCGAAGCCTGAGATGGACCCAGCTTATGACAAGACGCAGGGAAGTGAGGTGAAGGAGAAG
GAAAAAGCGAGGCACCAGACCAGCGCCAATTAAGTTCGAGCGGTAATCGTCGAACGGCAGGCGTGCAAAGTGGCGTA
ATCATGTCATGTCG。

[0046] 转化感受态细胞:将pET-28a重组质粒转化大肠杆菌BL21Star感受态细胞;

[0047] 诱导表达:将含有pET-28a重组质粒的菌株扩大培养,加入1% IPTG贮存液过夜诱导,将诱导后的菌体离心收集,重悬,破碎菌体,离心,取上清液,得总可溶性蛋白;

[0048] 蛋白分离纯化:对所得的总可溶性蛋白进行亲和层析,分离纯化目的蛋白。

[0049] 构建重组质粒过程中,可以包括以下步骤:

[0050] 将目的基因片段和经过双酶切的PET-28a蛋白表达载体按照摩尔比10:1混合,加入0.5 μ L T4连接酶,1 μ L 10 $\times$ Buffer,用水补齐至10 μ L,16 $^{\circ}$ C连接过夜。

[0051] 诱导表达过程中,可以包括以下步骤:

[0052] 将含有pET-28a重组质粒的菌株扩大培养,加入1% IPTG贮存液,在16 $^{\circ}$ C下150rpm过夜诱导,将诱导后的菌体离心收集,用Balance Buffer重悬,破碎菌体,在4 $^{\circ}$ C,10000rpm下离心30min,取上清液。

[0053] 蛋白分离纯化过程中,可以包括以下步骤:

[0054] 将总可溶性蛋白经镍离子亲和层析,利用蛋白脱盐柱去除蛋白溶液中的咪唑,将脱盐后的蛋白溶液冷冻干燥,用PBS缓冲液复溶,用分子筛分离纯化凝血酶酶切产物。

[0055] 以下通过实施例对本发明作进一步说明。

[0056] 实施例1:基因的克隆

[0057] 根据PMD19-T载体和基因的序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在基因的上下游引物的5'端分别引入核酸内切酶(Nde I)和(Xho I)两端的同源序列。

[0058] 引物:F:3'-ATGTTTCACTCAATCAAAACGG(Nde I)-5' ;

[0059] R:3'-TTAATTGGCGCTGGTCTGGTG(Xho I)-5' 。

[0060] 以基因的F和R作为引物,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增。反应体系为5 $\times$ Phusion HF Buffer 4 μ L,2.5mM dNTP1.6 μ L,上下游引物各10mM,cDNA模板1 μ L,DMSO 0.6 μ L,用水补齐至20 μ L。在PCR仪上98 $^{\circ}$ C预反应30s,98 $^{\circ}$ C反应5s,退火温度依据引物T_m值而定,72 $^{\circ}$ C延伸反应时间依据基因长度而定,72 $^{\circ}$ C10min,将反应产物在1%的琼脂糖凝胶电泳上分离PCR产物,用紫外灯检测,并按照核酸回收试剂盒的说明书操作收集特异性扩增产物。将扩增回收产物与TaKaRa的PMD19-T simple载体按照摩尔比10:1的比例混合,加入等体积的Solution I反应缓冲液,混匀后,轻微离心,置于16 $^{\circ}$ C下水浴连接过夜。

[0061] 本实施例中,是根据NCBI数据库中的核酸序列设计引物,以大豆胚根总cDNA为模板,利用PCR方法扩增挑选出来的基因的序列,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果显

示,拟扩增基因得到有效扩增,基因的分子量大小与预期分子量大小相近(如图1所示),连接T载后进行测序。将测序成功的克隆载体与蛋白表达载体PET-28a经双酶切后,通过T4连接酶连接酶切产物,构建pET-28a/重组质粒,然后将重组质粒转化大肠杆菌BL21Star,利用菌落PCR法对重组菌进行验证(如图2所示)。结果显示构建成功的重组菌能扩增到目的片段,表明成功构建含目的基因的原核表达载体。

[0062] 实施例2:超级感受态的制备及转化

[0063] 按照上海生工提供的超级感受态试剂盒提供的方法制备大肠杆菌TOP10和BL21Star感受态,在超净工作台中挑取划线培养的大肠杆菌单克隆菌株于5mL的LB液体培养基中,在37℃,180rpm恒温摇床中培养12h后,按照1:50比例接种到50mL新鲜配制的LB培养基中,至OD600值约为0.6。将用50mL离心管收集菌体,8,000g离心3min。弃上清后将菌体冰上放置10min,4℃,5,000rpm离心5min,用试剂盒提供的Buffer A将菌体重悬后于冰上放置30min,4℃,5,000rpm离心5min,弃上清液,用试剂盒提供的Buffer B(用前-20℃预冷)重悬菌体,用灭菌的1.5mL EP管分装,每管100μL。在-80℃冰箱中备用。

[0064] 将10μL连接产物加入到含有100μL大肠杆菌感受态中,轻微混匀。将大肠杆菌感受态细胞放置于冰上30min,42℃热激90s,冰上5min,加入900μL新鲜配制的LB液体培养基。在37℃,180rpm恒温摇床中培养1h,取300μL菌液涂布于含有相应抗生素的LB固体培养基中,37℃下倒置培养15h。

[0065] 实施例3:质粒提取

[0066] 利用OMEGA公司提供的质粒提取试剂盒操作,取1mL菌液于1.5mL的EP管中,8,000rpm,离心1min,重复3次,弃上清。向装有菌体的EP管中加入Buffer I 200μL,用移液器充分吹打混匀后加入200μL Buffer II,轻微颠倒混匀2次,室温静置1min,加入Buffer III 300μL,颠倒混匀3次,整个过程不要超过5min。室温,12,000rpm离心15min,吸取上清500μL,加入平衡好的核酸收集柱中,室温,12,000rpm离心1min,弃废液后向核酸收集柱中加入500μL HB Buffer,室温12,000rpm离心1min,弃废液,加入试剂盒中的600μL WB Buffer(预先加入800mL无水乙醇),室温12,000rpm离心1min重复2次,将核酸收集柱空转,15,000rpm离心2min除去残留的WB Buffer。向核酸收集柱内加入30μL无菌水,用一个新EP管收集质粒,室温12,000rpm离心2min。

[0067] 实施例4:蛋白表达载体的构建

[0068] 将含目的基因的PMD19-T载体按照基因引物设计的酶切位点做双酶切反应,反应体系为限制性内切酶各1μL,质粒1μg,反应Buffer 2μL,用水补齐至10μL,反应5h,将反应产物在1%的琼脂糖凝胶电泳上分离酶切产物,在紫外灯下检测。回收目的基因片段,将目的基因片段和经过双酶切的PET-28a蛋白表达载体按照摩尔比10:1混合,加入0.5μL T4连接酶,1μL 10×Buffer,用水补齐至10μL,16℃连接过夜。

[0069] 实施例5:重组子的菌落PCR验证

[0070] 将连接产物转化大肠杆菌BL21Star感受态细胞,挑取少量长有转化子的菌斑为模板,以引物来验证重组子,PCR反应体系与过程同基因克隆。

[0071] 在本实施例中,将构建成功的pET-28a/蛋白重组菌扩大培养,加入0.1mM IPTG在16℃下诱导12小时,离心收集菌并用Balance Buffer重悬菌体,通过超声破碎重组菌的细胞膜离心取上清液即为重组菌的总可溶性蛋白,以pET-28a空载体诱导前后为对照,如图3

所示,其中,1-4分别为BL21诱导前,BL21诱导后,6号蛋白诱导前,6号蛋白诱导后(理论分子量为12.3KDa)。从结果可以看出经过SDS-PAGE电泳检测重组菌得到表达。

[0072] 实施例6:蛋白的诱导表达

[0073] 将含有重组质粒的菌株扩大培养至含有1%Kana贮存液的500m L LB液体培养基中,培养至OD₆₀₀约0.6,加入1%IPTG贮存液,在16℃下150rpm过夜诱导,将诱导后的菌体离心收集用Balance Buffer重悬,经超声破碎菌体后,在4℃,10,000rpm下离心30min,取上清液进行后续的分离纯化。

[0074] 实施例7:蛋白的分离纯化

[0075] 利用亲和层析纯化蛋白,设置A泵流速3m L/min。用约50mL去离子水洗去与Sepharese吸附的乙醇。用约30mL 0.5M氢氧化钠洗去柱子上的残留的蛋白。用约80mL去离子水洗去氢氧化钠。上样约30mL硫酸镍,使镍离子与Sepharese结合。用约70mL去离子水,洗去未结合的镍离子。用约50mL Balance Buffer平衡纯化柱。上样蛋白溶液。用约50mL Balance Buffer洗去与镍离子未结合的蛋白。调节B泵流量至10% (B泵中为500mM咪唑)洗去与镍离子弱结合蛋白;依次递增B泵流量梯度洗脱并收集蛋白。蛋白收集后清洗纯化柱,设置B泵流量为零,用去离子水洗纯化柱,至电导率为零。用60mL EDTA洗去镍离子。用去离子水清洗纯化柱,直至电导率为零。用60mL 0.5M氢氧化钠洗去纯化柱中残留的蛋白。用去离子水清洗纯化柱,直至电导率为零。用20%乙醇封柱以防止细菌滋生,纯化柱于4℃保存。

[0076] 利用蛋白脱盐柱去除蛋白溶液中的咪唑。设置A泵流速4mL/min,用去离子水约50m L洗去脱盐柱中的乙醇。蛋白上体积样小于10mL,体积过大会影响分离效果。用去离子水洗脱出目的蛋白。蛋白脱盐后清洗脱盐柱,用0.2M氢氧化钠洗去残留的蛋白并活化脱盐柱。用约50m L去离子水,洗去氢氧化钠;用20%乙醇封柱以防止细菌滋生,脱盐柱于4℃保存。

[0077] 将脱盐后的蛋白溶液冷冻干燥,用PBS缓冲液复溶,按照定量结果以1U凝血酶与1mg融合蛋白混合,4℃,酶切过夜。

[0078] 用分子筛分离纯化凝血酶酶切产物。设置A泵流速1mL/min,用去离子水洗1个柱体积。上样蛋白2mL,用去离子水洗脱出目的蛋白。收集目的蛋白后清洗分子筛,用0.2M氢氧化钠洗脱约2个柱体积。用去离子水洗至电导率峰为零。用含有0.2M醋酸钠的20%乙醇封柱以防止细菌滋生。

[0079] 本实施中为了获得功能验证的蛋白,将在大肠杆菌表达的重组菌中的总可溶性蛋白经镍离子亲和层析,分离纯化目的蛋白,所用层析柱参数如下:柱长:20cm;直径:16mm,填料:Chelating Sepharose Fast Flow 4BTM,填料体积:10mL;厂家:Amersham Biosciences流速为3mL/min。

[0080] 理论分子量为12.3KDa,结果如图4所示,其中,1-8分别为总蛋白、穿透峰、40mM咪唑、70mM咪唑、80mM咪唑、90mM咪唑、500mM咪唑洗脱峰、酶切后。

[0081] 为了避免His标签对蛋白结构的测定与功能的验证,纯化后,用凝血酶切除His标签,获得实验所需蛋白。His标签是由6个组氨酸组成的短肽,专门设计用于重组蛋白质的吸附纯化,是目前用于纯化的融合标签中使用最为广泛的一种。利用His抗体可以检测带有His标签的融合蛋白。通过Western-blotting检测凝血酶酶切前后的蛋白,如图5所示,其中,1为过分子筛前,2为过分子筛后。

[0082] 实施例8:圆二色谱法测定蛋白的二级结构

[0083] 用去离子水溶解蛋白,根据定量结果将蛋白配制成100 μ M的母液。将母液稀释成500 μ L,终浓度为10 μ M,用于二级结构的测定。将待测的蛋白样品加入比色皿中,分别以去离子水、不同浓度TFE以及SDS缓冲液的吸收值为背景,设定检测扫描范围250nm-190nm,扫描频率为1nm。将测得数据利用在线圆二数据分析软件DICHROWEB计算蛋白的二级结构,结果如图6所示。

[0084] 圆二色谱常用来测定蛋白的二级结构。一个典型的 α -螺旋在208nm和222nm附近有一个负峰,在192nm处有一个正峰; β -折叠在190nm左右有一个正峰,在215nm处有一个负峰;无规则卷曲在198nm左右有一个负峰。本实验测定了经过大肠杆菌原核表达纯化后的蛋白在水溶液以及不同浓度的TFE和SDS溶液中的二级结构(如图6所示)。通过在线软件计算了每个蛋白二级结构的 α -螺旋和无序结构的比例,并与预测结果比较,CD实际测得蛋白无规则卷曲的含量与预测结果趋势基本相同。

[0085] 实施例9:反复冻融条件下LDH酶的残留酶活测定

[0086] LDH酶是糖酵解代谢途径中的一种关键酶,能在含游离氢离子条件下催化丙酮酸和还原型辅酶I(NADH)反应生成乳酸和氧化态的辅酶I。鉴于还原型辅酶I在340nm处有最大吸收峰,因此可以通过检测在340nm处的吸收峰的减少值来检测反应进程。本实验在含有底物丙酮酸和还原型辅酶I的反应体系中加入LDH酶,通过检测反应过程中340nm处光吸收值的改变来测定LDH酶的活力。

[0087] LDH酶溶液的配制:将蛋白与LDH酶按照摩尔比(蛋白:LDH酶)为1:1、5:1和10:1的比例配制成70 μ L的酶溶液,将酶溶液各自分成6分,每份10 μ L,3份进行冻融胁迫,另外3份不进行冻融胁迫。将酶溶液放入液氮速度1min,然后置于25 $^{\circ}$ C温控板下融化5min,反复进行6次。取5 μ L反复冻融后的酶液加入到含有2mL的反应底物(10mmol/L磷酸氢二钾-磷酸二氢钾,pH=7.5,7.5mmol/L丙酮酸,0.1mmol/L还原型辅酶I),通过紫外分光光度计检测在反应2min中内在A340的减少值,每个反应3次,重复3次,计算9次反应的平均值和标准差。根据在反应2min内冻融后A340差值占冻融前A340差值的百分比来计算残留酶活,以残留酶活的值为纵坐标,以蛋白与LDH酶的摩尔比为横坐标,绘制LDH酶的残留酶活柱状图,如图7所示,可反应纯化后的蛋白在冻融条件下对LDH酶的保护作用。

[0088] 将溶菌酶或纯化后的目的蛋白与LDH酶按照摩尔比(1:1、5:1、10:1)比例混合,反复冻融6次后测定LDH酶的残留酶活。在冻融胁迫条件下,溶菌酶对LDH几乎没有保护作用。但是加入纯化后的蛋白均具有对LDH酶的保护能力。

[0089] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 深圳大学
- [0003] <120> 一种大豆蛋白的应用及其制备方法和表达载体、引物
- [0004] <130> 5
- [0005] <160> 5
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 661
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 大豆(Glycine max (Linn.) Merr.)
- [0011] <223> 基因编码为Glyma11g07260.1的大豆蛋白基因序列
- [0012] <400> 1
- [0013] tttgcattgt tgcgatcaaa ttcaaccgt gtcgaaatta caggactacc atgcacacag 60
- [0014] cctcttaata agcctatacc acactgcctc ttctataaga tctcaacata tatagaaaaa 120
- [0015] attatgtttc actcaatcaa aacggtttta acctgtccac aagtttcatt ccctgcacgg 180
- [0016] tctctctctt ccaaccttgg tcgggaaact tgcgcagtta gattctgcac tgacagtget 240
- [0017] cgtaagatgg acaagactca gaagcctagt actgaggaaa ataaacaagg agatacgatg 300
- [0018] tctcattcat ttggggaagg gtacgctacg aggtctgacg aagaagggtt tgggtggagt 360
- [0019] tatggtggaa accaatcgaa gcctgagatg gacccagctt atgacaagac gcagggaagt 420
- [0020] gaggtgaagg agaagaaaa agcgaggcac cagaccagcg ccaattaacg cttaattagg 480
- [0021] ttattagtta tgtggagggg ttgtttatgc atgtaacgtt cgttctatat ctcgtccttt 540
- [0022] tgttgatttt tccttcctgc agctcttttt tttttttgtt tttaacacaa aaaaattaat 600
- [0023] ggaccatgat cgttggtaca tactattaat agcaaagtga tattcagcga gtttacatat 660
- [0024] a 661
- [0025] <210> 2
- [0026] <211> 22
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <223> 引物序列
- [0030] <400> 2
- [0031] atgtttcact caatcaaaac gg 22
- [0032] <210> 3
- [0033] <211> 21
- [0034] <212> DNA
- [0035] <213> 人工序列
- [0036] <223> 引物序列
- [0037] <400> 3
- [0038] ttaattggcg ctggtctggt g 21
- [0039] <210> 4
- [0040] <211> 345
- [0041] <212> DNA

[0042]	<213> 人工序列	
[0043]	<223> 目的基因片段的基因序列	
[0044]	<400> 4	
[0045]	atgtttcact caatcaaaac ggttttaacc tgtccacaag tttcattccc tgcacggtct	60
[0046]	ctctcttcca accttggtcg gaaacttgc gcagtttagat tctgcactga cagtgtctct	120
[0047]	aagatggaca agactcagaa gcctagtact gaggaataa aacaaggaga tacgatgtct	180
[0048]	cattcatittg gggaagggtg cgctacgagg tctgacgaag aagggttttg tggagtttat	240
[0049]	ggtggaaacc aatcgaagcc tgagatggac ccagcttatg acaagacgca gggaagttag	300
[0050]	gtgaaggaga aggaaaaagc gaggcaccag accagcgcca attaa	345
[0051]	<210> 5	
[0052]	<211> 1221	
[0053]	<212> DNA	
[0054]	<213> 人工序列	
[0055]	<223> pET-28a重组质粒基因序列	
[0056]	<400> 5	
[0057]	attctcacgc gcgcgttgat agactccaca gtgtcagaga tgtaccactc tctcgacaac	60
[0058]	acaaaactga tgtcttcaga catcttttta ctttcaccag cgtttctggg tggagcaaaa	120
[0059]	aacaagaagg ccaaaatgcc gcaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact	180
[0060]	catactctcc tttttcaata ttatgaagca tttatcaggg ttatgtctca tgagcggata	240
[0061]	catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aatgggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa	300
[0062]	agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg	360
[0063]	tatcacgagg ccctttcgtc tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat	420
[0064]	gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc	480
[0065]	tcaggcgctg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggcttg cttaactatg cggcatcaga	540
[0066]	gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag	600
[0067]	aaaataccgc atcaggcgcc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc	660
[0068]	ggtgcgggccc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt	720
[0069]	aagttgggtg acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt	780
[0070]	agaactcggg acgcgcggat cttccagaga ttgcgccata tgtttcactc aatcaaaacg	840
[0071]	gttttaacct gtccacaagt ttcatccct gcacggtctc tctcttccaa ccttggtcgg	900
[0072]	gaaacttgcg cagtttagatt ctgcactgac agtgtctgta agatggacaa gactcagaag	960
[0073]	cctagtactg aggaaataa acaaggagat acgatgtctc attcatttg ggaagggtac	1020
[0074]	gctacgaggt ctgacgaaga agggtttggt ggagtttatg gtgaaacca atcgaagcct	1080
[0075]	gagatggacc cagcttatga caagacgcag ggaagtgagg tgaaggagaa ggaaaaagcg	1140
[0076]	aggcaccaga ccagcgccaa ttaactcgag cggtaatcgt cgaacgcgag gcgtgcaaac	1200
[0077]	tggcgtaatc atgtcatgtc g	1221

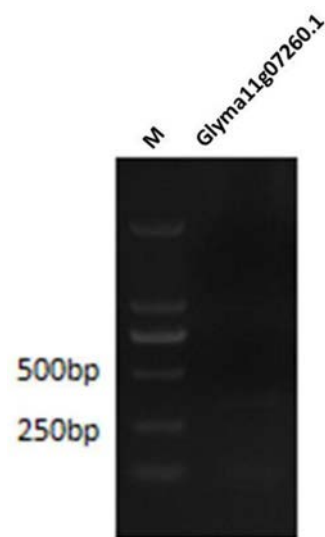


图1

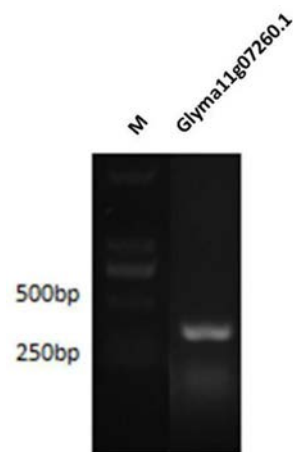


图2

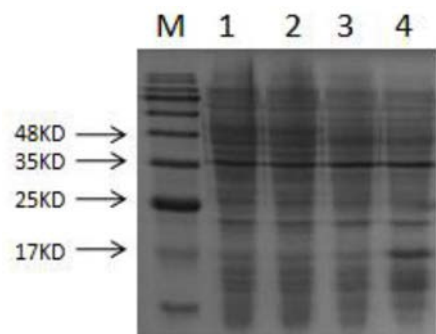


图3

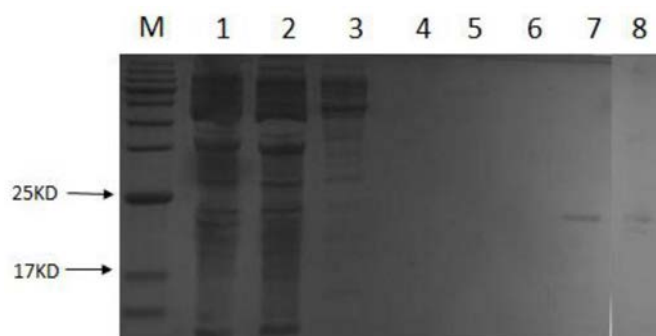


图4

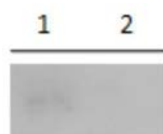


图5

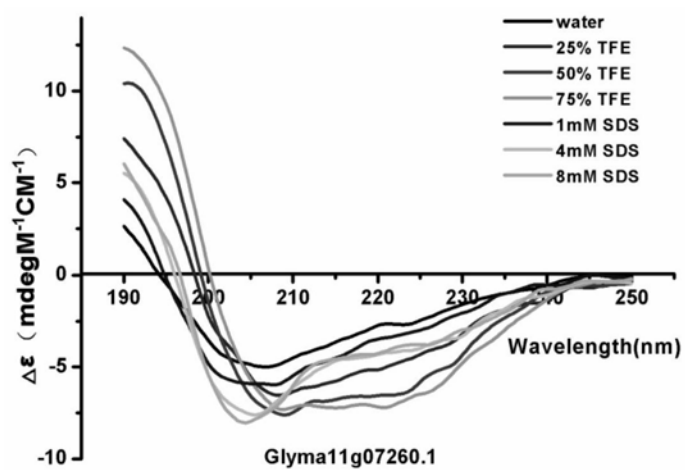


图6

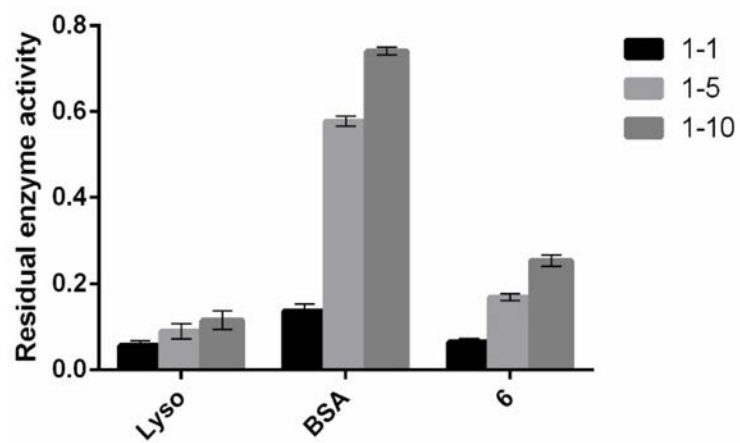


图7