



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108866031 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201810749922.0

C12N 15/29(2006.01)

(22)申请日 2018.07.10

C12N 15/70(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108866031 A

(56)对比文件

CN 107058277 A, 2017.08.18,

CN 107164356 A, 2017.09.15,

Jeremy Schmutz et al..Genome sequence of the palaeopolyploid.《Nature》.2010,(第463期),

NCBI.XM_003546135.2.《Genebank》.2014,

审查员 吴漾

(43)申请公布日 2018.11.23

(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 张凇松 郑易之 孙楠

谭芳美 吴佳辉 程华

(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 袁文英

(51)Int.Cl.

C12N 9/96(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

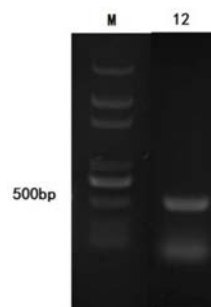
序列表4页 附图3页

(54)发明名称

大豆蛋白的应用

(57)摘要

本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种大豆蛋白的应用。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,所述大豆蛋白的编码序列如SEQ ID NO:1所示。本发明的大豆蛋白通过实验验证,可用于制备冻存蛋白类生物制品的保护剂,该大豆蛋白制备的保护剂效果好,并且来源于可食用的植物材料,安全可靠。



1. 一种大豆蛋白的应用,其特征在于,所述大豆蛋白用于制备冻存LDH酶的保护剂;其中,所述大豆蛋白的编码序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述大豆蛋白的制备方法包括如下步骤:
扩增所述大豆蛋白的编码序列;
构建包含所述编码序列的重组质粒;
将所述重组质粒转化至感受态细胞,进行诱导表达;
将诱导表达后的菌液进行蛋白分离纯化,得到所述大豆蛋白。
3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,扩增所述大豆蛋白的编码序列的引物对如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示;和/或
扩增所述大豆蛋白的编码序列的模板为大豆胚根cDNA。
4. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述重组质粒由蛋白表达载体PET-28a与所述大豆蛋白的编码序列重组得到。
5. 如权利要求4所述的应用,其特征在于,所述重组质粒的制备步骤包括:将所述蛋白表达载体PET-28a经Nde I和Xho I双酶切处理,然后利用T4连接酶将酶切产物与所述大豆蛋白的编码序列连接。
6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,将所述大豆蛋白的编码序列与双酶切处理的所述蛋白表达载体PET-28a按照摩尔比10:1混合进行连接。
7. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述感受态细胞为大肠杆菌BL21 Star感受态细胞。
8. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述诱导表达的步骤包括:将含有所述重组质粒的感受态细胞扩大培养,然后加入1% IPTG的贮存液,在16℃下150rpm诱导。
9. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述蛋白分离纯化的步骤包括镍离子亲和层析。

大豆蛋白的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种大豆蛋白的应用。

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,存在一定的使用潜在病原体污染的风险。

[0003] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的上述不足,提供一种大豆蛋白的应用,旨在解决现有BSA用于保护蛋白类生物制品存在污染风险的技术问题。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 本发明提供一种大豆蛋白的应用,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,所述大豆蛋白的编码序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 本发明的大豆蛋白(基因编码为Glyma15g12170.1,编码序列如SEQ ID NO:1所示),通过实验验证,用于制备冻存蛋白类生物制品的保护剂,该大豆蛋白制备的保护剂效果好,并且来源于可食用的植物材料,安全可靠。

附图说明

[0008] 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DL10000Marker)。

[0009] 图2为本发明实施例5中大豆蛋白Glyma15g12170.1的诱导表达的电泳结果图。

[0010] 图3为本发明实施例7中大豆蛋白Glyma15g12170.1表达纯化的电泳结果图。

[0011] 图4为本发明实施例7中大豆蛋白Glyma15g12170.1纯化后酶切标签的电泳结果图。

[0012] 图5为本发明实施例8中不同溶液下大豆蛋白Glyma15g12170.1二级结构的数据示意图。

[0013] 图6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

[0014] 为了使本发明要解决的技术问题、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。

[0015] 本发明实施例提供了一种大豆蛋白的应用,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,所述大豆蛋白的编码序列如SEQ ID NO:1所示。

[0016] 本发明实施例的大豆蛋白(基因编码为Glyma15g12170.1,编码序列如SEQ ID NO:1所示),通过实验验证,用于制备冻存蛋白类生物制品的保护剂,该大豆蛋白制备的保护剂效果好,并且来源于可食用的植物材料,安全可靠。

[0017] 所述大豆蛋白Glyma15g12170.1的编码序列SEQ ID NO:1如下所示:

[0018] ATGCCAGCGTTGAGGTTGCACAGCAAACACCAACAACAGTTCCAGAAAAATGAAACAACCGAGGTAAGCAAGACCCAGGAAACAACCCAGTCACTGAGGCTCCTGCAACAGAACAACCAGCAGCTGAGGTTCTGCAACAGAAACACCAGCCGCTGAGGCTCCTGCCCCAGAATCAACCACCGAAGCACCAAAGGAAGAAACCACCGAGGCACCAACAGAAACAGTAGAAAAACAACACTACAGAAGTAGCCCCAGAGGAGCCTAAAGAAGTTCCAGTTGAGACCGAGGAGGTGGTGGCAAAGGAGACAGAGGAAGAGAAGCCAGCAGAAGAGAAATCAGAGGAGAAAACTGAAGAAGTGAAAGAAGAAGCAGAGGAGCCTAAAGAACTACTGAAACAGAATCAGCAGCAGCAGCACCACCAGCAACCACAGAGGAAGAGAACAACACAGCTGAGTCAGTTGAAACCCAGTAGAGGTTCTGTTGAGAAGACTGAAGCTTAG。

[0019] 进一步地,所述冻存蛋白类生物制品为酶制剂。

[0020] 进一步地,所述大豆蛋白的制备方法包括如下步骤:

[0021] S01:扩增所述大豆蛋白的编码序列;

[0022] S02:构建包含所述编码序列的重组质粒;

[0023] S03:将所述重组质粒转化至感受态细胞,进行诱导表达;

[0024] S04:将所述诱导表达后的菌液进行蛋白分离纯化,得到所述大豆蛋白。

[0025] 进一步地,在上述步骤S01中,扩增所述大豆蛋白的编码序列的引物对如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示:

[0026] SEQ ID NO:2:5'-CGCCCATATGCCAGCGTTGAGGTTGC(Nde I)-3',

[0027] SEQ ID NO:3:5'-ACCGCTCGAGCTAAGCTTCAGTCTTCTCAAC(Xho I)-3'。

[0028] 上述引物对根据PMD19-T载体和目的基因的序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在引物对的5'端分别引入核酸内切酶(Nde I)和(Xho I)两端的同源序列。进一步地,扩增所述大豆蛋白的编码序列的模板为大豆胚根cDNA,即以大豆胚根cDNA为模板,进行PCR扩增,得到目的基因片段(CGCCCATATGCCAGCGTTGAGGTTGCACAGCAAACACCAACAACAGTTCCAGAAATGAAACAACCGAGGTAAGCAAGACCCAGGAAACAACCCAGTCACTGAGGCTCCTGCAACAGAACAACCAGCAGCTGAGGTTCTGCAACAGAACAACCAGCCGCTGAGGCTCCTGCCCCAGAATCAACCACCGAAGCACCAAAGGAAGAAACCACCGAGGCACCAACAGAAACAGTAGAAAAACAACACTACAGAAGTAGCCCCAGAGGAGCCTAAAGAAGTTCCAGTTGAGACCGAGGAGGTGGTGGCAAAGGAGACAGAGGAAGAGAAGCCAGCAGAAGAGAAATCAGAGGAGAAAACTGAAGAAGTGAAAGAAGAAGCAGAGGAGCCTAAAGAACTACTGAAACAGAATCAGCAGCAGCAGCACCACCAGCAACCACAGAGGAAGAGAACAACCCAGCTGAGTCAGTTGAAACCCAGTAGAGGTTCTGTTGAGAAGACTGAAGCTTAGCTCGAGCGGT)。本发明实施例中,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(即大豆种子吸水萌发后,未突破种皮的胚根)高表达蛋白中挑选了1个蛋白进行结构和功能分析,该蛋白即本发明实施例所述的大豆蛋白。

[0029] 进一步地,在上述步骤S02中,所述重组质粒由蛋白表达载体PET-28a与所述大豆蛋白的编码序列重组得到。具体重组质粒的制备步骤包括:将所述蛋白表达载体PET-28a经

CCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTC
GTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGA
AGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTC
TGGAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGG
AACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACC
GCCAGTTGTTTACCCTCACACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCT
CTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAAACAGGAAAA
AACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCG
GATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCG
GTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGGAG
CAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGTGTTGGCGGTGTGGGGGCGAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGAT
AGCGGAGTGATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATATGCGGTGTGAA
ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA
CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT
AAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCT
GTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGATAGGTC
GTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
GTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACAT
AAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTTCAAC
ATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGT
ATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGAT
GGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCA
TGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATA
TTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCG
CGTATTTCTGCTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGT
AATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCAGATTACGTGCTCACTC
ATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTGTATTGATGTTGGACGAGTCGG
AATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTATTACAGAAACGG
CTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCT
AAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTT
CCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTC
ATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTT
GTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGG

GCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAA
CCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCG
AAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATG
CGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCA。

[0032] 进一步地,在上述步骤S03中,所述感受态细胞为大肠杆菌BL21Star感受态细胞。所述诱导表达的步骤包括:将含有所述重组质粒的感受态细胞扩大培养,然后加入1%IPTG的贮存液,在16℃下150rpm诱导。即将含有重组质粒的菌株扩大培养,加入终浓度为0.1mM的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(用Balance Buffer重悬,破碎菌体,在4℃、10000rpm下离心30min)取上清液,得总可溶性蛋白。

[0033] 进一步地,在上述步骤S04中,所述蛋白分离纯化的步骤包括镍离子亲和层析。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。

[0034] 本发明先后进行过多次试验,现举一部分试验结果作为参考对发明进行进一步详细描述,下面结合具体实施例进行详细说明。

[0035] 实施例1基因的克隆

[0036] 根据PMD19-T载体和基因序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在扩增大豆蛋白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。

[0037] 上游引物F:5'-CGCCCATATGGCCAGCGTTGAGGTTGC-3',

[0038] 下游引物R:5'-ACCGCTCGAGCTAAGCTTCAGTCTTCTCAAC-3'。

[0039] 以上游引物F和下游引物R作为引物对,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增。反应体系为5×Phusion HF Buffer 4μL,2.5mM dNTP1.6μL,上下游引物各10mM,cDNA模板1μL,DMSO 0.6μL,用水补齐至20μL。在PCR仪上98℃预反应30s,98℃反应5s,退火温度依据引物T_m值而定,72℃延伸反应时间依据基因长度而定,72℃10min,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℃下水浴连接过夜。

[0040] 本实施例中根据NCBI数据库中的Glyma15g12170.1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,目的基因得到有效扩增,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。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。

[0041] 实施例2超级感受态的制备及转化

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 实施例3质粒提取

[0045] 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。

[0046] 实施例4大豆蛋白表达载体的构建

[0047] 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。

[0048] 实施例5重组子的菌落PCR验证

[0049] 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, 用实施例1中的引物来验证重组子, PCR反应体系与过程同实施例1相同。

[0050] 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, 图中1-4依次分别为大豆蛋白Glyma15g12170.1 (本实施例中命名12号蛋白) 诱导前, 大豆蛋白Glyma15g12170.1诱导后, BL21诱导前, BL21诱导后 (理论分子量为23.8KDa) 的电泳图。从结果可以看出经过SDS-PAGE电泳检测重组菌得到表达。

[0051] 实施例6大豆蛋白的诱导表达

[0052] 将含有重组质粒的菌株扩大培养至含有终浓度为1mM的Kana贮存液的500mL LB液体培养基中, 培养至OD₆₀₀约0.6, 加入终浓度为1mM的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。

[0053] 实施例7大豆蛋白的分离纯化

[0054] 利用亲和层析纯化蛋白, 设置A泵流速3mL/min。用约50mL去离子水洗去与Sepharose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Sephacrose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。大豆理论分子量为23.8KDa,纯化后的电泳结果如图3所示,其中,1是穿透峰,2是40mM咪唑洗脱峰前,3是40mM咪唑洗脱峰,4是500mM咪唑洗脱峰。

[0055] 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50mL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50mL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。

[0056] 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。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。

[0057] 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。理论分子量为23.8KDa,纯化后酶切标签电泳结果如图4所示,其中,1为纯化后,2为酶切标签后。

[0058] 实施例8圆二色谱法测定大豆蛋白的二级结构

[0059] 用去离子水溶解大豆蛋白,根据定量结果将蛋白配制成100μM的母液。将母液稀释成500μL,终浓度为10μM,用于二级结构的测定。将待测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。

[0060] 结果显示为一个典型的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5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。

[0061] 实施例9反复冻融条件下LDH酶的残留酶活(residue activity)测定

[0062] 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。

[0063] LDH酶溶液的配制:将大豆蛋白与LDH酶按照摩尔比(大豆蛋白: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2m L的反应底物(10mmol/L磷酸氢二钾-磷酸二氢钾,p H=7.5,7.5mmol/L丙酮酸,0.1mmol/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,以大豆蛋白与LDH酶的摩尔比为横坐标,绘制LDH酶的残留酶活柱状图,可反应纯化后的蛋白在冻融条件下对LDH酶的保护作用。

[0064] 本实施例中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。如图6所示,在冻融胁迫条件下,溶菌酶(图中Lysozyme)对LDH几乎没有保护作用。但是加入纯化后的大豆蛋白(图中LOC100814402)均具有对LDH酶的保护能力。

[0065] 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]	序列表
[0002]	<110> 深圳大学
[0003]	<120> 大豆蛋白的应用
[0004]	<160> 4
[0005]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 504
[0008]	<212> DNA
[0009]	<213> Glycine max
[0010]	<400> 1
[0011]	atggccagcg ttgaggttgc acagcaaaca ccaacaacag ttccagaaaa tgaacaacc 60
[0012]	gaggtaagca agaccagga aacaacccca gtcactgagg ctcttgcaac agaacaacca 120
[0013]	gcagctgagg ttcttgcaac agaacaacca gccgctgagg ctctgcccc agaatcaacc 180
[0014]	accgaagcac caaaggaaga aaccaccgag gcaccaacag aaacagtaga aaaaacaact 240
[0015]	acagaagtag cccagagga gcctaaagaa gttccagttg agaccgagga ggtggtggca 300
[0016]	aaggagacag aggaagagaa gccagcagaa gagaaatcag aggagaaaac tgaagaagtg 360
[0017]	aaagaagaag cagaggagcc taaagaaact actgaaacag aatcagcagc agcagcacca 420
[0018]	ccagcaacca cagaggaaga gaacaaacca gctgagtcag ttgaaacccc agtagagggtt 480
[0019]	cctgttgaga agactgaagc ttag 504
[0020]	<210> 2
[0021]	<211> 27
[0022]	<212> DNA
[0023]	<213> 人工序列
[0024]	<400> 2
[0025]	cgcccatatg gccagcgttg aggttgc 27
[0026]	<210> 3
[0027]	<211> 31
[0028]	<212> DNA
[0029]	<213> 人工序列
[0030]	<400> 3
[0031]	accgctcgag ctaagcttca gtctttctcaa c 31
[0032]	<210> 4
[0033]	<211> 5797
[0034]	<212> DNA
[0035]	<213> 人工序列
[0036]	<400> 4
[0037]	atccgatata agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccggttta gaggcccaa 60
[0038]	ggggttatgc tagttattgc tcagcggtgg cagcagccaa ctcagcttcc ttctgggctt 120

[0039]	tgtagcagc cggatctcag tgggtggtggt ggtggtgctc gagctaagct tcagtcttct	180
[0040]	caacaggaac ctctactggg gtttcaactg actcagctgg tttgttctct tcctctgtgg	240
[0041]	ttgctggtgg tgggtctgct gctgattctg tttcagtagt ttcttttaggc tcctctgctt	300
[0042]	cttctttcac ttcttcagtt ttctctctctg atttctcttc tgctggcttc tcttcctctg	360
[0043]	tctcctttgc caccacctcc tcggtctcaa ctggaacttc tttaggctcc tctggggcta	420
[0044]	cttctgtagt tgttttttct actgtttctg ttggtgcctc ggtggtttct tcctttggtg	480
[0045]	cttcggtggt tgattctggg gcaggagcct cagcggtgg ttgttctggt gcaggaacct	540
[0046]	cagctgctgg ttgttctggt gcaggagcct cagtactgg ggttgtttcc tgggtcttgc	600
[0047]	ttacctcggg tgtttcattt tctggaactg ttgttggtgt ttgctgtgca acctcaacgc	660
[0048]	tggccatag gctgccgcgc ggcaccaggc cgctgctgtg atgatgatga tgatggctgc	720
[0049]	tgcccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagagg ggaattgtta	780
[0050]	tccgctcaca attcccctat agtgagtcgt attaatttcg cgggatcgag atctcgatcc	840
[0051]	tctacgccgg acgcatcgtg gccggcatca ccggcgccac aggtgcggtt gctggcgctt	900
[0052]	atatcgccga catcaccgat ggggaagatc gggctcgcca cttcgggctc atgagcgctt	960
[0053]	gtttcggcgt gggatatggtg gcaggccccg tggccggggg actgttgggc gccatctcct	1020
[0054]	tgcatgcacc attccttgcg gcggcggtgc tcaacggcct caacctacta ctgggctgct	1080
[0055]	tcctaatac gtagtcgat aaggagagc gtcgagatcc cggacaccat cgaatggcgc	1140
[0056]	aaaacctttc gcggtatggc atgatagcgc ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat	1200
[0057]	gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt	1260
[0058]	tcccgctgg tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtggaagcg	1320
[0059]	gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac cgctggcac aacaactggc gggcaaacag	1380
[0060]	tcgttctga ttggcgttgc cacctccagt ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc	1440
[0061]	gcggcgatta aatctcgcg cgatcaactg ggtgccagcg tgggtgtgtc gatggtagaa	1500
[0062]	cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt	1560
[0063]	gggctgatca ttaactatcc gctggatgac caggatgcc a ttgctgtgga agctgcctgc	1620
[0064]	actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc tctgaccaga caccatcaa cagtattatt	1680
[0065]	ttctcccatg aagacggtac gcgactgggc gtggagcatc tggctgcatt gggtcaccag	1740
[0066]	caaatcgcg tgtagcggg cccattaagt tctgtctcgg cgctctgcg tctggctggc	1800
[0067]	tggcataaat atctcactcg caatcaaatt cagccgatag cggaacggga aggcgactgg	1860
[0068]	agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg caaatgtga atgagggcac cgttccact	1920
[0069]	gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg ctgggcgcaa tgcgcgcat taccgagtcc	1980
[0070]	gggctgcgcg ttggtgcgga tatctcggtg gtgggatacg acgataccga agacagctca	2040
[0071]	tgttatatcc cgccgttaac caccatcaaa caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc	2100
[0072]	gtggaccgtt tgctgcaact ctctcagggc caggcggtga agggcaatca gctgttggcc	2160
[0073]	gtctcactgg tgaaaagaaa aaccacctg gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc	2220
[0074]	gcgttggcgg attcattaat gcagctggca cgacaggttt ccgactgga aagcgggcag	2280
[0075]	tgagcgcaac gcaattaatg taagttagct cactcattag gcaccgggat ctcgaccgat	2340
[0076]	gcccttgaga gccctcaacc cagtcagctc ctccggtgg gcgcggggca tgactatcgt	2400
[0077]	cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc cggcagcgct	2460

[0078]	ctgggtcatt	ttcggcgagg	accgctttcg	ctggagcgcg	acgatgatcg	gcctgtcgct	2520
[0079]	tgcggtattc	ggaatcttgc	acgccctcgc	tcaagccttc	gtcactggtc	ccgccacca	2580
[0080]	acgtttcggc	gagaagcagg	ccattatcgc	cggcatggcg	gccccacggg	tgcgcatgat	2640
[0081]	cgtgctcctg	tcgttgagga	cccggctagg	ctggcggggg	tgcttactg	gttagcagaa	2700
[0082]	tgaatcaccg	atacgcgagc	gaacgtgaag	cgactgctgc	tgcaaaacgt	ctgcgacctg	2760
[0083]	agcaacaaca	tgaatggtct	tcggtttccg	tgtttcgtaa	agtctggaaa	cgcggaagtc	2820
[0084]	agcgccctgc	accattatgt	tccggatctg	catcgcagga	tgctgctggc	taccctgtgg	2880
[0085]	aacacctaca	tctgtattaa	cgaagcgctg	gcattgacct	tgagtgattt	ttctctggtc	2940
[0086]	ccgccgcac	cataccgcca	gttggtttacc	ctcacaacgt	tccagtaacc	gggcatgttc	3000
[0087]	atcatcagta	acccgtatcg	tgagcatcct	ctctcgtttc	atcggtatca	ttacccccat	3060
[0088]	gaacagaaat	cccccttaca	cggaggcacc	agtacacaaa	caggaaaaaa	ccgcccttaa	3120
[0089]	catggcccg	tttatcagaa	gccagacatt	aacgcttctg	gagaaactca	acgagctgga	3180
[0090]	cgcggatgaa	caggcagaca	tctgtgaatc	gcttcacgac	cacgctgatg	agctttaccg	3240
[0091]	cagctgcctc	gcgcgtttcg	gtgatgacgg	tgaaaacctc	tgacacatgc	agctcccgga	3300
[0092]	gacggtcaca	gcttgtctgt	aagcggatgc	cgggagcaga	caagcccgtc	aggcgcgctc	3360
[0093]	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggcgacgc	catgaccag	tcacgtagcg	atagcggagt	3420
[0094]	gtatactggc	ttaactatgc	ggcatcagag	cagattgtac	tgagagtga	ccatatatgc	3480
[0095]	ggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtaagga	gaaaataaccg	catcaggcgc	tcttccgctt	3540
[0096]	cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggtcg	ttcggctgcg	gcgagcggta	tcagctcact	3600
[0097]	caaaggcgtt	aatacggtta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	3660
[0098]	caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	tttttcata	3720
[0099]	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	3780
[0100]	cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcgctg	cgctctcctg	3840
[0101]	ttccgaccct	gccgcttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	3900
[0102]	tttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcgggtga	ggctgctcgc	tccaagctgg	3960
[0103]	gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccg	accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgctc	4020
[0104]	ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	4080
[0105]	ttagcagagc	gaggtatgta	ggcgggtgta	cagagtctct	gaagtgggtg	cctaactacg	4140
[0106]	gctacactag	aaggacagta	tttggtatct	gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	4200
[0107]	aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggg	ggtttttttg	4260
[0108]	tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	ttgatctttt	4320
[0109]	ctacggggtc	tgacgctcag	tggaacgaaa	actcacgtta	agggattttg	gtcatgaaca	4380
[0110]	ataaaactgt	ctgcttacat	aaacagtaat	acaaggggtg	ttatgagcca	tattcaacgg	4440
[0111]	gaaacgtctt	gctctaggcc	gcgattaaat	tccaacatgg	atgctgattt	atatgggtat	4500
[0112]	aaatgggctc	gcgataatgt	cgggcaatca	ggtgcgacaa	tctatcgatt	gtatgggaag	4560
[0113]	cccgatgcgc	cagagttgtt	tctgaaacat	ggcaaaggta	gcgttgccaa	tgatgttaca	4620
[0114]	gatgagatgg	tcagactaaa	ctggctgacg	gaatttatgc	ctcttccgac	catcaagcat	4680
[0115]	tttatccgta	ctcctgatga	tgcatggtta	ctcaccactg	cgatccccgg	gaaaacagca	4740
[0116]	ttccaggtat	tagaagaata	tcctgattca	ggtgaaaata	ttgttgatgc	gctggcagtg	4800

[0117]	ttcctgcgcc ggttgcatc gattcctgtt tgtaattgtc cttttaacag cgatcgcgta	4860
[0118]	tttcgtctcg ctcaggcgca atcacgaatg aataacggtt tggttgatgc gagtgatttt	4920
[0119]	gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taaacttttg	4980
[0120]	ccattctcac cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct cacttgataa ccttattttt	5040
[0121]	gacgagggga aattaatagg ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac	5100
[0122]	caggatcttg ccatcctatg gaactgcctc ggtgagtttt ctccttcatt acagaaacgg	5160
[0123]	ctttttcaaa aatatggtat tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg	5220
[0124]	ctcgatgagt ttttctaaga attaattcat gacgggatac atatttgaat gtatttagaa	5280
[0125]	aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg aaattgtaaa	5340
[0126]	cgттаататт ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca	5400
[0127]	ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag	5460
[0128]	tgttgttcca gtttgaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg	5520
[0129]	gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcacctt aatcaagttt	5580
[0130]	tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag	5640
[0131]	agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc	5700
[0132]	gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggt cacgctgcgc gtaaccacca caccgcccgc	5760
[0133]	gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtccca ttcgcca	5797

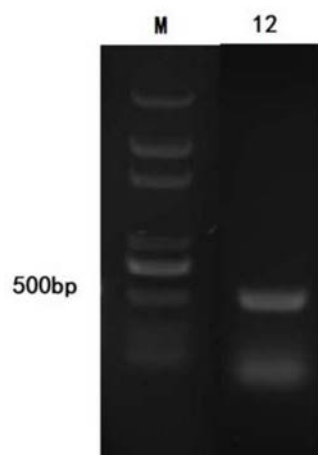


图1

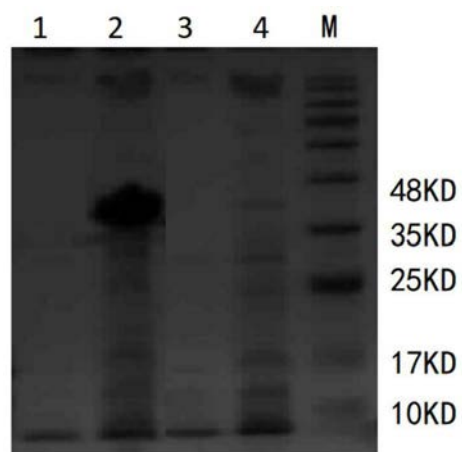
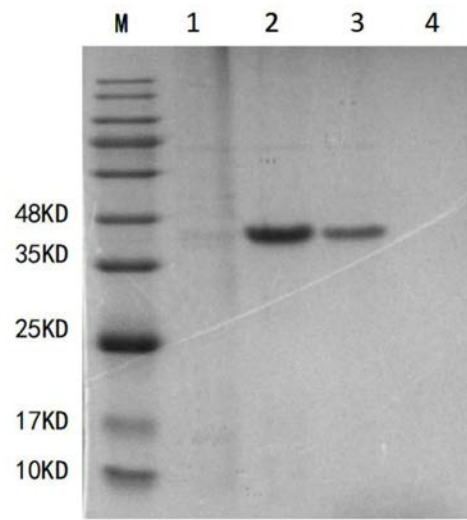


图2



12号

图3

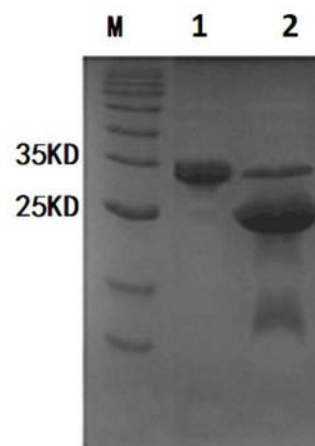


图4

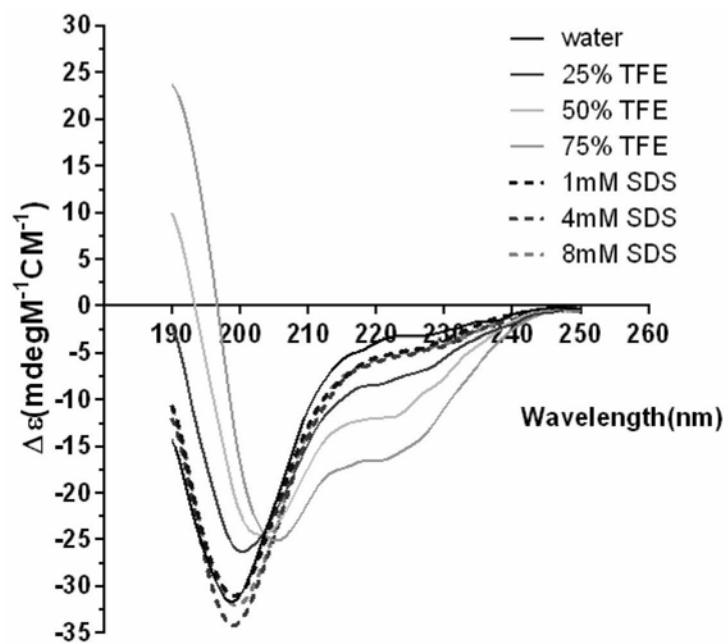


图5

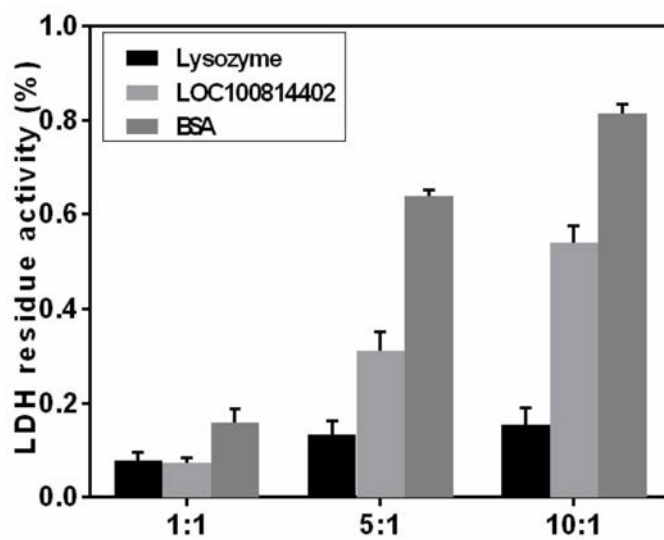


图6