



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108866077 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201810749910.8

(22)申请日 2018.07.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108866077 A

(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 谭芳美 郑易之 孙楠

吴佳辉 程华 张凛松

(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 15/29(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

A01H 5/00(2018.01)

A01H 6/00(2018.01)

C12R 1/19(2006.01)

(56)对比文件

CN 107151670 A,2017.09.12,

Xiaojian Yin等.Quantitative

Proteomics Reveals the Flooding-Tolerance

Mechanism in Mutant and Abscissic Acid-

Treated Soybean.《Journal of proteome》

.2016,2008-2025.

NCBI.XM_003546135.《GenBank》.2015,全

文.

审查员 罗洋

权利要求书1页 说明书8页

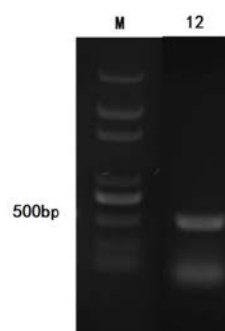
序列表4页 附图3页

(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。所述大豆蛋白作为渗透调节物质用于提高生物体的耐盐性;其中,所述大豆蛋白的编码序列如SEQ ID NO:1所示。本发明提供的大豆蛋白可作为渗透调节物质用于提高植物或大肠杆菌等生物体的耐盐性,该大豆蛋白及其基因在生物体特别是植物的抗逆领域具有很好的应用前景。



1. 一种大豆蛋白的应用,其特征在于,所述大豆蛋白作为渗透调节物质用于提高大肠杆菌的耐盐性;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] 盐碱、干旱等非生物胁迫是限制植物生长发育的主要环境因子。这些环境因子导致植物体内发生一系列的生理代谢反应,表现为代谢和生长的可逆性抑制,严重时甚至引起不可逆伤害,导致整个植株死亡。因此,如何提高植物的抗逆功能,一直是人们研究的课题。

[0003] 渗透调节物质可使生物体提高细胞吸水或保水能力,从而适应水分胁迫环境。可溶性蛋白质作为渗透调节物质的使用非常有限,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,旨在解决现有渗透调节物质的可溶性蛋白的种类有限的技术问题。

[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,所述大豆蛋白作为渗透调节物质用于提高生物体的耐盐性;其中,所述大豆蛋白的编码序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 本发明提供的大豆蛋白(基因编码为Glyma15g12170.1,编码序列如SEQ ID NO:1所示),通过实验验证,可增强大肠杆菌等的耐盐性,因此,其可作为渗透调节物质用于提高植物或大肠杆菌等生物体的耐盐性,该大豆蛋白及其基因在生物体特别是植物的抗逆领域具有很好的应用前景。

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1中利用菌落PCR验证重组菌的电泳结果图(M为DL10000Marker)。

[0010] 图3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。

[0011] 图4为本发明实施例7中空载体转化菌在不同浓度的高盐LB固体培养基和正常固体培养基的生长结果图。

[0012] 图5为本发明实施例7中重组质粒转化菌在不同浓度的高盐LB固体培养基和正常固体培养基的生长结果图。

[0013] 图6为本发明实施例7中空载体转化菌和重组质粒转化菌的存活率柱形图。

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,所述大豆蛋白作为渗透调节物质用于提高生物体的耐盐性;其中,所述大豆蛋白的编码序列如SEQ ID NO:1所示。

[0016] 本发明实施例提供的大豆蛋白(基因编码为Glyma15g12170.1,编码序列如SEQ ID NO:1所示),通过实验验证,可增强大肠杆菌等的耐盐性,因此,其可作为渗透调节物质用于提高植物或大肠杆菌等生物体的耐盐性,该大豆蛋白及其基因在生物体(优选为植物和/或大肠杆菌)的抗逆领域具有很好的应用前景。

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

[0018] ATGCCAGCGTTGAGGTTGCACAGCAAACACCAACAACAGTTCCAGAAAATGAAACAACCGAGGTAAGCAAGACCCAGGAAACAACCCAGTCACTGAGGCTCCTGCAACAGAACAACCAGCAGCTGAGGTTCTGCAACAGAAACACCAGCCGCTGAGGCTCCTGCCCCAGAATCAACCACCGAAGCACCAAAGGAAGAAACCACCGAGGCACCAACAGAAACAGTAGAAAAACAACACTACAGAAGTAGCCCCAGAGGAGCCTAAAGAAGTTCCAGTTGAGACCGAGGAGGTGGTGGCAAAGGAGACAGAGGAAGAGAAGCCAGCAGAAGAGAAATCAGAGGAGAAAACTGAAGAAGTGAAAGAAGAAGCAGAGGAGCCTAAAGAACTACTGAAACAGAATCAGCAGCAGCAGCACCACCAGCAACCACAGAGGAAGAGAACAAACAGCTGAGTCAGTTGAAACCCAGTAGAGGTTCTGTTGAGAAGACTGAAGCTTAG。

[0019] 进一步地,所述大豆蛋白的制备方法包括如下步骤:

[0020] S01:扩增所述大豆蛋白的编码序列;

[0021] S02:构建包含所述编码序列的重组质粒;

[0022] S03:将所述重组质粒转化至感受态细胞,进行诱导表达;

[0023] 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。

[0024] 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:

[0025] SEQ ID NO:2:5'-CGCCCATATGCCAGCGTTGAGGTTGC(Nde I)-3',

[0026] SEQ ID NO:3:5'-ACCGCTCGAGCTAAGCTTCAGTCTTCTCAAC(Xho I)-3'。

[0027] 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(CGCCCATATGCCAGCGTTGAGGTTGCACAGCAAACACCAACAACAGTTCCAGAAAATGAAACAACCGAGGTAAGCAAGACCCAGGAAACAACCCAGTCACTGAGGCTCCTGCAACAGAACAACCAGCAGCTGAGGTTCTGCAACAGAACAACCAGCCGCTGAGGCTCCTGCCCCAGAATCAACCACCGAAGCACCAAAGGAAGAAACCACCGAGGCACCAACAGAAACAGTAGAAAAACAACACTACAGAAGTAGCCCCAGAGGAGCCTAAAGAAGTTCCAGTTGAGACCGAGGAGGTGGTGGCAAAGGAGACAGAGGAAGAGAAGCCAGCAGAAGAGAAATCAGAGGAGAAAACTGAAGAAGTGAAAGAAGAAGCAGAGGAGCCTAAAGAACTACTGAAACAGAATCAGCAGCAGCAGCACCACCAGCAACCACAGAGGAAGAGAACAACCAGCTGAGTCAGTTGAAACCCAGTAGAGGTTCTGTTGAGAAGACTGAAGCTTAGCTCGAGCGGT)。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。

TATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCG
ACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCAGTATTCGGAATCTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCAGTGGTCCCGCCA
CCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTC
GTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGA
AGCGACTGCTGCTGCAAAACGCTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTC
TGGAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGG
AACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACC
GCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCT
CTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGAGGCATCAGTGACCAAACAGGAAAA
AACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCG
GATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCG
GTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGGAG
CAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGTGTTGGCGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGAT
AGCGGAGTGATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATATGCGGTGTGAA
ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA
CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT
AAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCT
GTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGATAGGTC
GTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG
GTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACAT
AAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCAAC
ATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGT
ATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGAT
GGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCA
TGGTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTACAGGTGAAAATA
TTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCG
CGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGT
AATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCAGGATTACAGTCGTCACCTC
ATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGG
AATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGAACTGCCTCGGTGAGTTTCTCCTTCATTACAGAAACGG
CTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCT
AAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
CCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTC

ATTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTT
GTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGG
GCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAA
CCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCG
AAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATG
CGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCA。

[0031] 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,取上清液,得总可溶性蛋白。

[0032] 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。

[0033] 本发明实施例中,在500mM盐胁迫下验证了含有上述重组质粒的重组菌的存活率:将含有上述重组质粒的重组菌诱导后稀释,分别涂布在正常和高盐的平板上,对菌斑数目进行计数;以空载重组菌作为对照,计算重组菌的存活率,可证明重组菌中的对应蛋白是否具有耐盐性。结果显示,与空载重组菌的存活率对比,表达大豆蛋白Glyma15g12170.1的重组菌的存活率明显高于空载重组菌,即证明该蛋白是具有一定的耐盐性。

[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'-CGCCATATGGCCAGCGTTGAGGTTGC-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目的基因序列,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(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。

[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: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、分离纯化

[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0.1mM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纯化。

[0053] 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。大豆理论分子量为23.8KDa。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 实施例7:500mM盐胁迫下重组菌的存活率的测定

[0058] 将重组质粒转化菌和空载体转化菌接入含终浓度为1mM的卡钠(10mg/ml)的5ml LB液体培养基中,在200rpm/min 37℃的摇床中过夜培养;第二天转接至含终浓度为1mM的卡钠(10mg/ml)的5ml LB液体培养基中,在200r/min 37℃的摇床中扩培;将菌液浓度扩培至OD₆₀₀=0.6-0.8之间后(重组质粒转化菌和空载体转化菌的OD₆₀₀需调至一致),以终浓度为0.2‰的比例加入浓度为100mM IPTG,在200r/min 30℃的摇床中诱导4h,再测其OD₆₀₀(将重组质粒转化菌和空载体转化菌的OD₆₀₀需调至一致)并记录。

[0059] 将诱导后的菌液稀释10、100、1000倍后,分别取100ul涂布在有500mMNaCl的高盐LB固体培养基(含终浓度为1mM的卡钠(10μg/ml,终浓度为1mM的比例),含IPTG(终浓度为4.8μg/mL的比例))和正常LB固体培养基(含终浓度为1mM的卡钠(10μg/ml)和IPTG(4.8μg/mL));正常LB固体培养基在37℃培养箱中培养15h后,记录能够进行计数的平板上的菌斑数目(平板菌落数在30-300个之间为有效数据),高盐培养基在37℃培养箱中培养48h后记录菌斑数目(平板菌落数在30-300个之间为有效数据),最后计算存活率,绘制存活率柱形图。

[0060] 图4和图5分别为空载体转化菌和重组质粒转化菌在不同浓度的高盐LB固体培养基和正常固体培养基的生长结果图,其中, 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 分别表示稀释倍数1、10、100、1000。图6为空载体转化菌(横坐标pET-28a所示)和重组质粒转化菌(横坐标LOC100814402所示)的存活率柱形图。

[0061] 本实施例中将重组菌诱导后稀释分别涂布在正常和高盐的平板上,对菌斑数目进行计数(平板菌落数在30-300个之间为有效数据);以空载重组菌作为对照,计算重组菌的存活率,可证明重组菌中的对应蛋白是否具有耐盐性。结果显示,与空载重组菌的存活率对比,表达大豆蛋白Glyma15g12170.1的重组菌的存活率明显高于空载重组菌(如图6),另外还进行了点板,更直观的显示了表达大豆蛋白Glyma15g12170.1的重组菌的存活率比空载重组菌的存活率更高(如图4和5),证明该蛋白是具有一定的耐盐性。

[0062] 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 agaatacaacc 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 tcagcgggtg cagcagccaa ctcagcttcc tttcgggctt 120

[0039]	tgtttagcagc	cggatctcag	tggtggtggt	ggtggtgctc	gagctaagct	tcagtcttct	180
[0040]	caacaggaac	ctctactggg	gtttcaactg	actcagctgg	tttgttctct	tcctctgtgg	240
[0041]	ttgctgggtg	tggtgctgct	gctgattctg	tttcagtagt	ttcttttaggc	tcctctgctt	300
[0042]	cttctttcac	ttcttcagtt	ttctcctctg	atttctcttc	tgctggcttc	tcttcctctg	360
[0043]	tctcctttgc	caccacctcc	tcggtctcaa	ctggaacttc	tttaggctcc	tctggggcta	420
[0044]	cttctgtagt	tgttttttct	actgtttctg	ttggtgcctc	ggtggtttct	tcctttggtg	480
[0045]	cttcgggtgt	tgattctggg	gcaggagcct	cagcggtggt	ttgttctggt	gcaggaaacct	540
[0046]	cagctgctgg	ttgttctggt	gcaggagcct	cagtactggt	ggttggtttcc	tgggtcttgc	600
[0047]	ttacctcggt	tgtttcattt	tctggaactg	ttgttggtgt	ttgctgtgca	acctcaacgc	660
[0048]	tggccatatt	gctgccgcgc	ggcaccaggc	cgctgctgtg	atgatgatga	tgatggctgc	720
[0049]	tgcccatggt	atatctcctt	cttaaagtta	aacaaaatta	tttctagagg	ggaattgtta	780
[0050]	tccgctcaca	attccccctat	agtgagtcgt	attaatttcg	cgggatcgag	atctcgatcc	840
[0051]	tctacgccgg	acgcctcgtg	gccggcatca	ccggcgccac	aggtgcggtt	gctggcgctt	900
[0052]	atatcgccga	catcaccgat	ggggaagatc	gggctcgcca	cttcgggctc	atgagcgctt	960
[0053]	gtttcgccgt	gggtatggtg	gcaggccccg	tggccggggg	actgttgggc	gccatctcct	1020
[0054]	tgcatgcacc	attccttgcg	gcggcggtgc	tcaacggcct	caacctacta	ctgggctgct	1080
[0055]	tcctaattga	ggagtcgcat	aaggagagc	gtcgagatcc	cggacaccat	cgaatggcgc	1140
[0056]	aaaacctttc	gcggtatggc	atgatagcgc	ccggaagaga	gtcaattcag	ggtggtgaat	1200
[0057]	gtgaaaccag	taacgttata	cgatgtcgca	gagtatgccg	gtgtctctta	tcagaccgtt	1260
[0058]	tcccgctggt	tgaaccaggc	cagccacgtt	tctgcgaaaa	cgcgggaaaa	agtggaagcg	1320
[0059]	gcgatggcgg	agctgaatta	cattcccaac	cgctggcac	aacaactggc	gggcaaacag	1380
[0060]	tcgttgctga	ttggcggtgc	cacctccagt	ctggccctgc	acgcgccgtc	gcaaattgtc	1440
[0061]	gcggcgatta	aatctcgcg	cgatcaactg	ggtgccagcg	tggtggtgtc	gatggtagaa	1500
[0062]	cgaagcggcg	tcgaagcctg	taaagcggcg	gtgcacaatc	ttctcgcgca	acgcgtcagt	1560
[0063]	gggctgatca	ttaactatcc	gctggatgac	caggatgcc	ttgctgtgga	agctgcctgc	1620
[0064]	actaatgttc	cggcgttatt	tcttgatgtc	tctgaccaga	cacccatcaa	cagtattatt	1680
[0065]	ttctcccatg	aagacggtac	gcgactgggc	gtggagcatc	tggtcgcat	gggtcaccag	1740
[0066]	caaactcgcg	tgtagcggg	ccattaagt	tctgtctcgg	cgcgtctcgc	tctggctggc	1800
[0067]	tggcataaat	atctcactcg	caatcaaat	cagccgatag	cggaacggga	aggcgactgg	1860
[0068]	agtgccatgt	ccggttttca	acaaaccatg	caaatgtgga	atgagggcac	cgttccact	1920
[0069]	gcgatgctgg	ttgccaacga	tcagatggcg	ctgggcgcaa	tgcgcgccat	taccgagtcc	1980
[0070]	gggctgcgcg	ttggtgcgga	tatctcggtg	gtgggatacg	acgataccga	agacagctca	2040
[0071]	tgttatatcc	cgccgttaac	caccatcaaa	caggattttc	gcctgctggg	gcaaaccagc	2100
[0072]	gtggaccgct	tgctgcaact	ctctcagggc	caggcggtga	agggcaatca	gctgttgccc	2160
[0073]	gtctcactgg	tgaagagaaa	aaccacctg	gcgccaata	cgcaaaccgc	ctctccccgc	2220
[0074]	gcgttgcccg	attcattaat	gcagctggca	cgacaggttt	cccactgga	aagcgggcag	2280
[0075]	tgagcgcaac	gcaattaatg	taagttagct	cactcattag	gcaccgggat	ctcgaccgat	2340
[0076]	gcccttgaga	gccttcaacc	cagtcagctc	cttcgggtgg	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	tgccttactg	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]	catggcccgc	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	agggcgcgtc	3360
[0093]	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggcgcgac	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]	caaaggcgg	aatacgggta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	3660
[0098]	caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	tttttcata	3720
[0099]	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	3780
[0100]	cgacaggact	ataaagatac	caggcggttc	ccccgggaag	ctccctcgctg	cgctctcctg	3840
[0101]	ttccgaccct	gccgcttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	3900
[0102]	tttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcgggtga	ggctggttcg	tccaagctgg	3960
[0103]	gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccc	accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgct	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]	ataaaaactgt	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	tgcattggtta	ctcaccactg	cgatccccgg	gaaaacagca	4740
[0116]	ttccaggtat	tagaagaata	tcctgattca	ggtgaaaata	ttgttgatgc	gctggcagtg	4800

[0117]	ttcctgcgcc ggttgcatte 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]	aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg aaattgtaaa	5340
[0126]	cgттаататт ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca	5400
[0127]	ataggccgaa atcggcacaaa 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

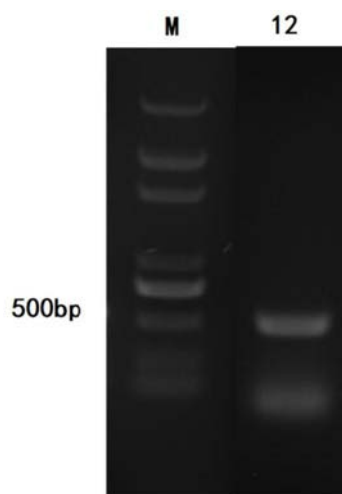


图1

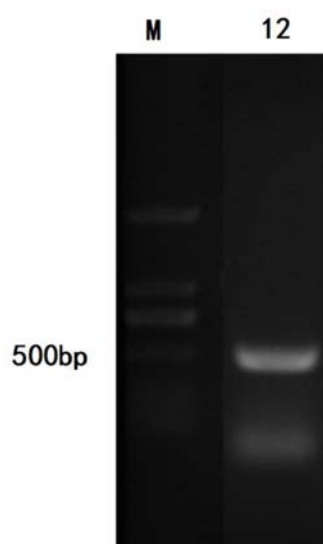


图2

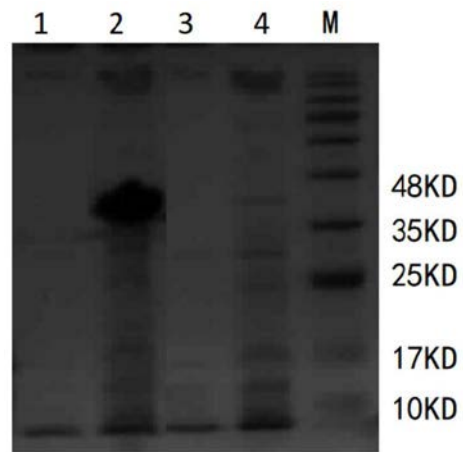


图3

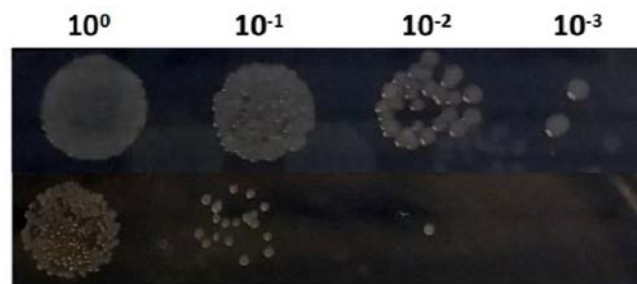


图4

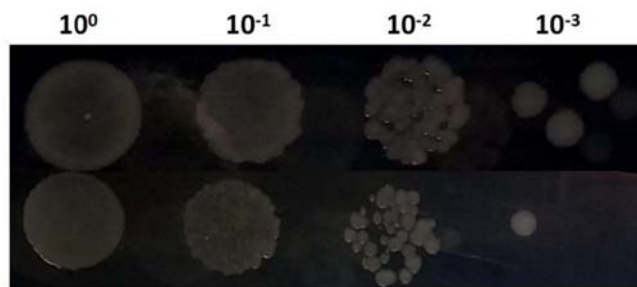


图5

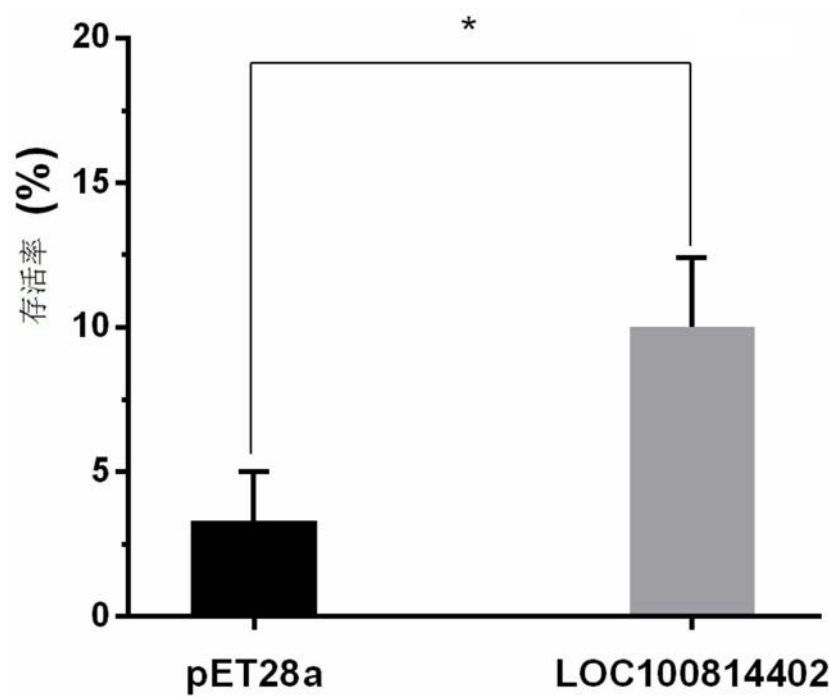


图6