



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 108299548 B

(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201710020745.8

C12N 15/29(2006.01)

(22)申请日 2017.01.12

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2018.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108299548 A

(56)对比文件

NCBI.NCBI Reference: XP_015626582.1.

《NCBI》.2016,第1-2页.

NCBI.NCBI Reference: XP_015626582.1.

《NCBI》.2016,第1-2页.

丁俊美.酯酶Est1的脱乙酰化作用机制.《第十七次全国环境微生物学学术研讨会论文集》.2015,第125-126页.

(43)申请公布日 2018.07.20

(73)专利权人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路1号院动物所D座435

审查员 张智贤

(72)发明人 周奕华 张保才 张兰军

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

C07K 14/415(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表4页 附图3页

(54)发明名称

BS1-CT蛋白在调控植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应中的应用

(57)摘要

本发明公开了BS1-CT蛋白在调控植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应中的应用。BS1-CT蛋白是如下a)或b)或c)的蛋白质:a)氨基酸序列是序列1第25-382位所示的蛋白质;b)在序列1第25-382位所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质;c)将序列1第25-382位所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的蛋白质。通过实验证明:本发明的BS1-CT蛋白质具有催化植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应的功能,可用于调控植物细胞壁木聚糖乙酰化修饰水平,将在生物质资源转变为能源的过程中发挥重大作用,有助于降低生物能源的生产成本,具有重要经济价值。

1. 蛋白质, 是如下a) 或b) 的蛋白质:

a) 氨基酸序列是序列1第25-382位所示的蛋白质;

b) 在序列1第25-382位所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质。

2. 与权利要求1所述的蛋白质相关的生物材料, 为下述A1) 至A8) 中的任一种:

A1) 编码权利要求1所述的蛋白质的核酸分子;

A2) 含有A1) 所述核酸分子的表达盒;

A3) 含有A1) 所述核酸分子的重组载体;

A4) 含有A2) 所述表达盒的重组载体;

A5) 含有A1) 所述核酸分子的重组微生物;

A6) 含有A2) 所述表达盒的重组微生物;

A7) 含有A3) 所述重组载体的重组微生物;

A8) 含有A4) 所述重组载体的重组微生物。

3. 根据权利要求2所述的相关生物材料, 其特征在于: A1) 所述核酸分子其编码序列是序列2第73-1149位所示的DNA分子。

4. 权利要求1所述的蛋白质或权利要求2或3所述的相关生物材料调控植物细胞壁木聚糖乙酰化修饰水平中的应用;

或权利要求1所述的蛋白质或权利要求2或3所述的相关生物材料制备调控植物细胞壁木聚糖乙酰化修饰水平的产品中的应用;

所述木聚糖乙酰化为木聚糖0-2位和/或0-3位的乙酰化。

5. 权利要求1所述的蛋白质或权利要求2或3所述的相关生物材料调控木聚糖乙酰化修饰水平中的应用;

或权利要求1所述的蛋白质或权利要求2或3所述的相关生物材料制备调控木聚糖乙酰化修饰水平的产品中的应用;

所述木聚糖乙酰化为木聚糖0-2位和/或0-3位的乙酰化。

6. 根据权利要求4或5所述的应用, 其特征在于:

所述调控植物细胞壁木聚糖乙酰化修饰水平为催化植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应。

7. 一种用于调控木聚糖去乙酰化的产品, 其活性成分为权利要求1所述的蛋白质或其融合蛋白。

8. 一种调控木聚糖去乙酰化的方法, 包括用权利要求1所述的蛋白质或其融合蛋白处理木聚糖的步骤。

BS1-CT蛋白在调控植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及BS1-CT蛋白在调控植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应中的应用。

背景技术

[0002] 0-乙酰化修饰是植物细胞壁多糖中一种较为普遍的修饰形式。除了纤维素、 β -1,3-1,4-连接的葡聚糖和一些糖蛋白,0-乙酰化修饰几乎存在于所有其它细胞壁多糖上。

[0003] 0-乙酰化修饰可能通过影响细胞壁多糖的生理生化特性从而对细胞壁结构产生影响。研究发现,乙酰化影响多糖与极性分子的相互作用。木聚糖上乙酰化修饰的模式影响了木聚糖与纤维素的结合方式,进而影响细胞壁结构。植物细胞壁多糖0-乙酰化修饰程度随植物组织器官和生长发育阶段呈现动态变化,表明0-乙酰化修饰与植物生长发育状态密切相关,并在植物体内受到严格调控。因此植物细胞壁多糖0-乙酰化修饰的调控机制对于植物维持细胞壁结构与正常生长有重要意义。

[0004] 研究已发现植物中存在乙酰基转移酶,参与植物细胞壁多糖合成过程中的乙酰化修饰,但该过程中是否存在植物去乙酰化修饰的机制尚未见报道。解析细胞壁多糖的去乙酰化修饰机理是对植物细胞壁结构和生长发育表型进行遗传改良的基础。

[0005] 在将生物质资源转变为生物能源乙醇的过程中,需要进行微生物发酵,而植物细胞壁多糖释放的乙酰基导致环境酸化,影响发酵过程,而优化条件又增加了乙醇生产的成本。因此细胞壁多糖去乙酰化调控有助于降低生物能源的生产成本,具有重要经济价值。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种蛋白质。

[0007] 本发明提供的蛋白质是如下a)或b)或c)的蛋白质,将其命名为BS1-CT蛋白质:

[0008] a) 氨基酸序列是序列1第25-382位所示的蛋白质;

[0009] b) 在序列1第25-382位所示的蛋白质的N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质;

[0010] c) 将序列1第25-382位所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的蛋白质。

[0011] 为了使a)中的蛋白质便于纯化,可在序列表中序列1第25-382位所示的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如表1所示的标签。

[0012] 表1、标签的序列

[0013]

标签	残基	序列
Poly-Arg	5-6 (通常为5个)	RRRRR
Poly-His	2-10 (通常为6个)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL

[0014] 上述c)中的蛋白质,所述一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加为不超过10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加。

[0015] 上述c)中的蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0016] 上述c)中的蛋白质的编码基因可通过将序列2第73-1149位所示的DNA序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子,和/或进行一个或几个碱基对的错义突变,和/或在其5'端和/或3'端连上表1所示的标签的编码序列得到。

[0017] 上述b)中的融合蛋白质的氨基酸序列如序列3所示。

[0018] 本发明的第二个目的是提供与BS1-CT蛋白质相关的生物材料。

[0019] 本发明提供的与BS1-CT蛋白质相关的生物材料为下述A1)至A12)中的任一种:

[0020] A1) 编码BS1-CT蛋白质的核酸分子;

[0021] A2) 含有A1)所述核酸分子的表达盒;

[0022] A3) 含有A1)所述核酸分子的重组载体;

[0023] A4) 含有A2)所述表达盒的重组载体;

[0024] A5) 含有A1)所述核酸分子的重组微生物;

[0025] A6) 含有A2)所述表达盒的重组微生物;

[0026] A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物;

[0027] A8) 含有A4)所述重组载体的重组微生物;

[0028] A9) 含有A1)所述核酸分子的转基因植物细胞系;

[0029] A10) 含有A2)所述表达盒的转基因植物细胞系;

[0030] A11) 含有A3)所述重组载体的转基因植物细胞系;

[0031] A12) 含有A4)所述重组载体的转基因植物细胞系。

[0032] 上述生物材料中,A1)所述核酸分子为如下1)或2)或3)所示的基因:

[0033] 1) 其编码序列是序列2第73-1149位所示的cDNA分子或DNA分子;

[0034] 2) 与1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且编码BS1-CT蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子;

[0035] 3) 在严格条件下与1)或2)限定的核苷酸序列杂交,且编码BS1-CT蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子。

[0036] 其中,所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA或hnRNA等。

[0037] 本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法,例如定向进化和点突变的方法,对本发明的编码BS1-CT的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的,具有编码BS1-CT的核苷酸序列75%或者更高同一性的核苷酸,只要编码BS1-CT且具有相同功能,均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

[0038] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的编码序列1第25-382位所示的氨基酸序列组成的蛋白质的核苷酸序列具有75%或更高,或85%或更高,或90%或更高,或95%或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0039] 上述75%或75%以上同一性,可为80%、85%、90%或95%以上的同一性。

[0040] 上述生物材料中,所述严格条件是在 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中,在 68°C 下杂交并洗膜2次,每次5min,又于 $0.5\times\text{SSC}$, 0.1% SDS的溶液中,在 68°C 下杂交并洗膜2次,每次15min;或, $0.1\times\text{SSPE}$ (或 $0.1\times\text{SSC}$)、 0.1% SDS的溶液中, 65°C 条件下杂交并洗膜。

[0041] 上述生物材料中,所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。

[0042] 上述生物材料中,所述微生物可为酵母、细菌、藻或真菌,如农杆菌。

[0043] 上述生物材料中,所述转基因植物细胞系、转基因植物组织和转基因植物器官均不包括繁殖材料。

[0044] 本发明的第三个目的是提供BS1-CT蛋白质的新用途。

[0045] 本发明提供了BS1-CT蛋白质在作为乙酰酯酶中的应用。

[0046] 本发明的第四个目的是提供BS1-CT蛋白质或与BS1-CT蛋白质相关生物材料的新用途。

[0047] 本发明提供了BS1-CT蛋白质或与BS1-CT蛋白质相关生物材料在调控植物细胞壁木聚糖乙酰化修饰水平中的应用。

[0048] 本发明还提供了BS1-CT蛋白质或与BS1-CT蛋白质相关生物材料在制备调控植物细胞壁木聚糖乙酰化修饰水平的产品中的应用。

[0049] 上述应用中,所述调控植物细胞壁木聚糖乙酰化修饰水平为催化植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应。

[0050] 本发明还提供了BS1-CT蛋白质或与BS1-CT蛋白质相关生物材料在调控木聚糖乙酰化修饰水平中的应用。

[0051] 本发明还提供了BS1-CT蛋白质或与BS1-CT蛋白质相关生物材料在制备调控木聚糖乙酰化修饰水平的产品中的应用。

[0052] 上述应用中,所述调控木聚糖乙酰化修饰水平为催化木聚糖去乙酰化反应。

[0053] 上述应用中,所述木聚糖乙酰化为木聚糖0-2位和/或0-3位的乙酰化。

[0054] 本发明的第五个目的是提供一种用于调控木聚糖去乙酰化的产品。

[0055] 本发明提供的产品的活性成分为BS1-CT蛋白质或BS1-CT蛋白质的融合蛋白。

[0056] 本发明的最后一个目的是提供一种调控木聚糖去乙酰化的方法。

[0057] 本发明提供的调控木聚糖去乙酰化的方法包括用BS1-CT蛋白质或BS1-CT蛋白质的融合蛋白处理木聚糖的步骤。

[0058] 上述产品或方法中,所述调控木聚糖去乙酰化为调控植物细胞壁木聚糖去乙酰化;所述调控植物细胞壁木聚糖去乙酰化为催化植物细胞壁木聚糖去乙酰化。

[0059] 上述应用或产品或方法中,所述木聚糖为乙酰木聚糖。

[0060] 通过实验证明:本发明的BS1-CT蛋白质具有催化植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应的功能,可用于调控植物细胞壁木聚糖的乙酰化修饰水平,将在生物质资源转变为能源的过程中发挥重大作用,有助于降低生物能源的生产成本,具有重要经济价值。

附图说明

[0061] 图1为BS1蛋白的结构示意图。

[0062] 图2为融合蛋白BS1-CT-His溶液的电泳图。

[0063] 图3为分别用乙酸测定试剂盒和四级杆-飞行时间质谱仪(LC-QTOF-MS)方法检测

融合蛋白BS1-CT-His对不同的商品化乙酰化单糖的活性比较。左图以五种乙酰化单糖为横坐标,以乙酸释放速度($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)为纵坐标。右图以质荷比为横坐标,以乙酰化木糖的相对丰度为纵坐标。Tri-Ac-Mexyl代表三乙酰基甲基木糖、Di-Ac-Mexyl代表二乙酰基甲基木糖、Ac-Mexyl代表单乙酰基甲基木糖。BS1为加入融合蛋白BS1-CT-His的实验组,Mock为不加入融合蛋白BS1-CT-His的对照组。

[0064] 图4为用乙酸测定试剂盒测定的融合蛋白BS1-CT-His对乙酰化木糖的的动力学曲线。以梯度浓度的三乙酰基甲基木糖(mM)为横坐标,以乙酸释放速度($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)为纵坐标。

[0065] 图5为融合蛋白BS1-CT-His对从水稻中抽提的乙酰木聚糖和经木聚糖内切酶作用产生的乙酰寡聚木糖的活性比较。左图以从水稻中抽提的乙酰木聚糖为横坐标,以反应释放的乙酸量($\mu\text{mol mg}^{-1}$ 乙酰木聚糖)为纵坐标。右图以经木聚糖内切酶作用产生的乙酰寡聚木糖为横坐标,以反应释放的乙酸量($\mu\text{mol mg}^{-1}$ 乙酰寡聚木糖)为纵坐标。BS1为加入融合蛋白BS1-CT-His的实验组,Mock为不加入融合蛋白BS1-CT-His的对照组。

[0066] 图6为用LC-QTOF-MS方法检测融合蛋白BS1-CT-His对水稻乙酰寡聚木糖的去乙酰化活性。以四种乙酰寡聚木糖(分别为三聚木糖DP3、四聚木糖DP4、五聚木糖DP5和六聚木糖DP6)为横坐标,以乙酰寡聚木糖的相对丰度为纵坐标。-代表对照组,+代表加入融合蛋白BS1-CT-His实验组。

[0067] 图7为融合蛋白BS1-CT-His对水稻寡聚木糖的去乙酰化反应的的动力学曲线。以梯度浓度的乙酰寡聚木糖(mg mL^{-1})为横坐标,以乙酸释放速度($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)为纵坐标。

[0068] 图8为NMR方法检测融合蛋白BS1-CT-His对突变体bs1乙酰寡聚木糖的去乙酰化活性。

具体实施方式

[0069] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0070] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0071] 下述实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0072] 下述实施例中的粳稻品种“黄金晴”(WT,又称野生型植株)购买于中国水稻所。

[0073] 下述实施例中的载体pCAMBIA1300购自CAMIA公司,澳大利亚。

[0074] 下述实施例中的农杆菌EHA105购自CAMIA公司,澳大利亚。

[0075] 下述实施例中的pDONR207载体购自Life Technologies公司,货号12213-013。

[0076] 下述实施例中的pGEM-T-easy载体购自Invitrogen公司。

[0077] 下述实施例中的pPICZαC载体购自Invitrogen公司,该载体上具有His标签的编码序列,表达具有His标签的外源蛋白。

[0078] 下述实施例中的酵母菌株X33购自Invitrogen公司。

[0079] 下述实施例中的去乙酰化反应是指通过乙酰酯酶特异作用于乙酰化修饰的细胞壁多糖,使其去乙酰化的反应。

[0080] 实施例1、水稻脆鞘突变体及BS1-CT蛋白的获得

[0081] 一、水稻脆鞘突变体的获得及其BS1蛋白序列分析

[0082] 1、水稻脆鞘突变体的表型

[0083] 水稻脆鞘突变体brittle sheath1 (简称bs1或突变体bs1) 为粳稻品种“黄金晴”的自发突变材料。突变体bs1与粳稻品种“黄金晴”相比,其主要表现为:(1)叶鞘变脆(叶鞘的机械强度显著下降,木质部导管结构异常);(2)植株变矮。

[0084] 2、水稻脆鞘突变体的BS1蛋白序列分析

[0085] 通过测序表明:和野生型水稻植株(黄金晴)相比,水稻脆鞘突变体仅是BS1基因第二个内含子自5'端起第一位碱基由G突变为A,基因组的其余序列与野生型水稻植株全部相同。该碱基突变造成BS1基因第二个内含子未被正常剪切,从而造成BS1蛋白翻译提前终止。

[0086] BS1蛋白的蛋白序列如序列表的序列1所示,BS1基因的核苷酸序列如序列表的序列2所示。BS1蛋白的结构示意图见图1。TM代表跨膜结构域,GDSL代表BS1蛋白主要结构域,AG代表BS1抗血清的抗原片段。

[0087] 二、突变体bs1和野生型植株中乙酰基含量的检测

[0088] 分别取生长4周的突变体bs1和野生型植株(粳稻品种“黄金晴”),每个株系随机选6株植株,混合并打粉,检测待测植物细胞壁中乙酰木聚糖上的乙酰基含量。具体操作如下:

[0089] 1、乙酰木聚糖的提取

[0090] 将生长4周的植物幼苗冻干至重量不发生变化,将其打磨成粉,并用200目筛筛去粗粒。用70%乙醇水溶液洗三次,用等体积混合的氯仿-甲醇混合液洗三次,每次漂洗后均以12000rpm离心10min收集沉淀。所得沉淀用丙酮洗涤后烘干,得到以细胞壁成分为主的醇不溶性组分(Alcohol insoluble residue/简称AIR)。称取400mg植物茎秆醇不溶物(AIR),加入40mL 1% (质量分数)的草酸铵溶液,于37℃反应过夜,除去果胶组分。将样品离心后收集沉淀,用5mL 11% (体积分数)的过氧乙酸溶液漂洗,弃上清。然后加入20mL 11% (体积分数)的过氧乙酸溶液,85℃反应30分钟。2500rpm离心15分钟,弃上清,得到去木质素化的样品。用5mL MES/Tris缓冲液(Tris,Sigma,77-86-1;MES,Sigma,1266615-59-1)漂洗沉淀,弃上清。然后加入20mL MES/Tris缓冲液和40U的淀粉酶(Megazyme,K-TDFR-100A),于97℃反应35min后,转移至60℃水浴锅反应1h,除掉淀粉。2500rpm离心15分钟后,弃上清,加入5mL丙酮漂洗沉淀三次,真空干燥。用20mL的DMSO于70℃过夜进行抽提,重复两次后,将上清转移到新管中。加入5倍体积的乙醇:甲醇:水(7:2:1,v/v,pH 2-3),于4℃,沉淀3天,得到乙酰木聚糖沉淀。2500rpm离心15分钟收集到的沉淀再用无水乙醇漂洗三次,真空干燥,即得到乙酰木聚糖组分。

[0091] 2、乙酰基含量检测

[0092] 取1mg乙酰木聚糖溶解于100μL 1N NaOH,28℃200rpm反应1h。再加入100μL 1N HCl中和,12,000rpm离心10分钟,取上清液待测。采用乙酸测定试剂盒(Megazyme,K-ACET)测定上清液中反应释放的乙酸量(反应释放的乙酸来自于细胞壁中的乙酰基,代表细胞壁中参与反应的一部分乙酰基)。取10μL上清液于UV capable 96孔平度板中,并加入94μL水。随后依次加入溶液1和溶液2的混合液42μL(2.5:1)、溶液3和溶液4。分别读取340nm处相应的吸光值A0、A1和A2。利用溶液5来绘制标准曲线,样品中释放的乙酸量利用如下公式进行计算:

[0093] 样品 = $(A2 - A0) - (A1 - A0) (A1 - A0) / (A2 - A0) - \text{Blank}$;

[0094] 空白对照 = $(A2 - A0) - (A1 - A0) (A1 - A0) / (A2 - A0)$ 。

[0095] 结果表明。与野生型植株相比,突变体bs1细胞壁中乙酰木聚糖上的乙酰基含量

(释放的乙酸量)显著增加。

[0096] 三、BS1-CT蛋白的获得

[0097] 将序列2第73-1149位所示的基因命名为BS1-CT基因,BS1-CT基因编码的蛋白的氨基酸序列如序列1第25-382位所示,将序列1第25-382位所示蛋白质命名为BS1-CT蛋白。

[0098] 实施例2、BS1-CT蛋白的制备

[0099] 一、重组质粒的构建

[0100] 1、提取粳稻品种“黄金晴”的总RNA并反转录为cDNA。

[0101] 2、以步骤1提取的cDNA为模板,用F2和R2组成的引物对进行PCR扩增,回收PCR扩增产物,并连接T载体。

[0102] F2:5'-TCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCAGAGGGGAAGGTGAACGGGA-3';

[0103] R2:5'-TTCTAGACCTGAAGATTGGAAGATCGGTTGG-3'。

[0104] 3、用限制性内切酶XhoI和XbaI双酶切步骤2的T载体,并回收酶切产物。

[0105] 4、用限制性内切酶XhoI和XbaI双酶切pPICZαC载体,回收约3600bp的载体骨架。

[0106] 5、将步骤3的酶切产物和步骤4的载体骨架连接,得到重组质粒pPICZαC-BS1-CT。根据测序结果,对重组质粒pPICZαC-BS1-CT进行结构描述如下:在pPICZαC载体的XhoI和XbaI酶切位点之间插入了序列表的序列2自5'末端第73-1146位核苷酸所示的双链DNA分子。重组质粒pPICZαC-BS1-CT中,外源插入序列与载体骨架上的部分核苷酸形成融合蛋白BS1-CT-His的编码基因,重组质粒pPICZαC-BS1-CT表达融合蛋白BS1-CT-His,融合蛋白BS1-CT-His的氨基酸序列如序列表的序列3所示。

[0107] 二、重组菌的制备

[0108] 将重组质粒pPICZαC-BS1-CT导入酵母菌株X33中,得到重组菌株。

[0109] 将pPICZαC载体导入酵母菌株X33中,得到对照菌株。

[0110] 三、融合蛋白BS1-CT-His的诱导表达及纯化

[0111] 1、融合蛋白BS1-CT-His的诱导表达

[0112] 挑选单克隆于25mL BMGY培养基进行培养,当菌液OD值达到2-6时,1500rpm离心5min,弃上清,收集菌体,并用100-200mL BMMY培养基重悬菌体,调整重悬后的菌体浓度,使其OD₆₀₀值约为1.0。开始诱导蛋白表达,按以下时间点进行取样:0h、6h、12h、24h、36h、48h、60h、72h、84h和96h。将蛋白样品用甲醇/醋酸铵沉淀处理,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western检测。对比单克隆表达结果,挑选表达量最高的菌株和最适的表达时间进行大量诱导。实验中所用的培养基和详细操作流程参见EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen)。融合蛋白BS1-CT-His溶液的电泳图见图2,融合蛋白BS1-CT-His的大小约为60kDa。而对照菌株中没有目的条带。

[0113] 2、融合蛋白BS1-CT-His的纯化

[0114] 用ÄKTA Pure系统对融合蛋白BS1-CT-His进行纯化。具体步骤如下:添加硫酸铵至大量诱导的蛋白溶液中,使硫酸铵的终浓度为1M,12000rpm离心10min,取上清,使其流穿已被缓冲液(1M硫酸铵,50mM Tris-HCl,pH 7.0)平衡的HiTrap phenyl FF(HS)柱,并以(1-0)M梯度浓度硫酸铵溶液洗脱,用HiTrap脱盐柱进行脱盐处理,得到纯化后的融合蛋白BS1-CT-His。

[0115] 实施例3、融合蛋白BS1-CT-His在体外调控木聚糖去乙酰化反应中的应用

[0116] 一、融合蛋白BS1-CT-His对乙酰化单糖的底物特异性

[0117] 1、乙酰化单糖样品

[0118] 乙酰化单糖样品如下:1,2,3,4,6-5-0-乙酰基- β -D-葡萄糖(Glc)(北京凯森莱医药科技有限公司,604-69-3);1,2,3,4,6-5-0-乙酰基- β -D-半乳吡喃糖(Gal)(北京凯森莱医药科技有限公司,4163-60-4);1,2,3,5-4-0-乙酰基- α -L-阿拉伯呋喃糖(Ara)(天津希恩思生化科技有限公司,79120-81-3);1,2,3,4,6-5-0-乙酰基- β -D-甘露吡喃糖(Man)(北京凯森莱医药科技有限公司,4026-35-1);甲基2,3,4-3-0-乙酰基- β -D-木吡喃糖(Xyl)(北京凯森莱医药科技有限公司,13007-37-9)(简称三乙酰基甲基木糖)。

[0119] 2、融合蛋白BS1-CT-His对乙酰化单糖的活性的测定

[0120] 采用乙酸测定试剂盒(Megazyme,K-ACET)测定融合蛋白BS1-CT-His对乙酰化单糖的活性,同时以不加融合蛋白BS1-CT-His为对照组(Mock)。具体步骤如下:分别取2mM乙酰化单糖作为反应底物,以50mM Tris-HCl为反应缓冲液,加入2 μ g纯化后的融合蛋白BS1-CT-His,37 $^{\circ}$ C催化反应2h,然后用乙酸测定试剂盒检测反应释放的乙酸量(反应释放的乙酸来自于细胞壁中的乙酰基,代表细胞壁中参与反应的一部分乙酰基),并根据释放的乙酸量计算乙酸释放速度($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)。具体步骤如下:取10 μ L上清于UV capable 96孔平度板中,并加入94 μ L水。随后依次加入溶液1和溶液2的混合液42 μ L(2.5:1)、溶液3和溶液4。分别读取340nm处相应的吸光值A0、A1和A2。利用溶液5来绘制标准曲线,样品中释放的乙酸量利用如下公式进行计算:

[0121] 样品 = $(A2-A0) - (A1-A0) \times (A1-A0) / (A2-A0) - \text{Blank}$;

[0122] 空白对照 = $(A2-A0) - (A1-A0) \times (A1-A0) / (A2-A0)$ 。

[0123] 结果见图3A。结果表明:和对照组相比,加入融合蛋白BS1-CT-His的实验组的乙酸释放速度($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)明显提高,说明本发明的融合蛋白BS1-CT-His对Glc、Gal、Ara、Man和Xyl均具有更高的去乙酰化活性。

[0124] 二、融合蛋白BS1-CT-His对乙酰化木糖的去乙酰化活性及酶活动力学曲线的测定

[0125] 1、融合蛋白BS1-CT-His对乙酰化木糖的去乙酰化活性的测定

[0126] 采用四级杆-飞行时间质谱仪(LC-QTOF-MS)方法测定融合蛋白BS1-CT-His对乙酰化木糖的去乙酰化活性,同时以不加融合蛋白BS1-CT-His为对照组(Mock)。取2mM三乙酰基甲基木糖(Xyl)作为反应底物,以50mM Tris-HCl为反应缓冲液,加入2 μ g纯化后的融合蛋白BS1-CT-His,反应时间为16h。使用10KDa的浓缩离心管过滤反应体系中的蛋白质。将反应液转移到液相色谱进样瓶中,上机检测。实验数据的分析采用Aglient Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00。

[0127] 结果见图3B。结果表明:和对照组相比,本发明的融合蛋白BS1-CT-His能特异催化三乙酰基甲基木糖去掉两个乙酰基,分别生成二乙酰基甲基木糖和单乙酰基甲基木糖。

[0128] 2、测定融合蛋白BS1-CT-His对三乙酰基甲基木糖(Xyl)的酶活动力学曲线

[0129] 采用乙酸测定试剂盒测定融合蛋白BS1-CT-His对三乙酰基甲基木糖(Xyl)的酶活动力学曲线。具体步骤如下:以三乙酰基甲基木糖(Xyl)为底物,底物设定一系列浓度梯度:0.5mM、1mM、1.5mM、2.0mM、4.0mM、6mM、8mM、10mM、14mM、20mM、25mM,酶活反应体系同步步骤1,然后用乙酸测定试剂盒测定融合蛋白BS1-CT-His催化不同浓度底物所释放的乙酸量,最后以三乙酰基甲基木糖(Xyl)的浓度为横坐标,以乙酸的释放速度为纵坐标,得到融合蛋白

BS1-CT-His对三乙酰基甲基木糖(Xyl)的酶活动力学曲线。用Origin v8.0软件进行数据分析,计算得到Km值为 4.4 ± 0.78 mM。酶活动力学曲线见图4。

[0130] 三、融合蛋白BS1-CT-His对从水稻中抽提出的乙酰木聚糖和乙酰寡聚木糖的去乙酰化活性的测定

[0131] 1、乙酰木聚糖和乙酰寡聚木糖的制备

[0132] 分别从野生型水稻植株(黄金晴)和突变体bs1中抽提乙酰木聚糖。同实施例1的步骤二中的1。

[0133] 将抽提得到的乙酰木聚糖制备成乙酰寡聚木糖。具体步骤如下:称取1mg按上述方法抽提得到的乙酰木聚糖,以200 μ L 50mM NaAc为缓冲液(pH6.0),加入8U β -Xylanase M6木聚糖内切酶(Megazyme, E-XYRU6)处理得到乙酰寡聚木糖,12000rpm离心10min,取上清,冻干得到乙酰寡聚木糖。

[0134] 2、融合蛋白BS1-CT-His对乙酰木聚糖和乙酰寡聚木糖的去乙酰化活性测定

[0135] 采用乙酸测定试剂盒测定融合蛋白BS1-CT-His对乙酰木聚糖和乙酰寡聚木糖的去乙酰化活性,同时以不加融合蛋白BS1-CT-His为对照组(Mock)。具体步骤如下:分别称取1mg野生型水稻植株(黄金晴)和突变体bs1乙酰木聚糖和乙酰寡聚木糖各4份,50mM Tris-HCl(pH7.0)为反应缓冲液,加入2 μ g纯化后的融合蛋白BS1-CT-His,37 $^{\circ}$ C催化反应2h,采用乙酸测定试剂盒测定反应所释放的乙酸量(反应释放的乙酸来自于细胞壁中的乙酰基,代表细胞壁中参与反应的一部分乙酰基)。具体步骤同步骤一中的2。

[0136] 结果见图5。由于突变体bs1细胞壁中乙酰木聚糖上乙酰基含量高于野生型,反应完后,突变体bs1中乙酰木聚糖释放的乙酸量也高于野生型(图5左图)。而将等量的1mg野生型和突变体bs1中乙酰木聚糖经等量 β -Xylanase M6木聚糖内切酶处理后得到的乙酰寡聚木糖,再在上述相同酶活反应体系下进行反应,检测反应后释放的乙酸量均高于乙酰木聚糖(图5右图)。说明融合蛋白BS1-CT-His以乙酰寡聚木糖作为反应底物具有更高的活性。

[0137] 3、融合蛋白BS1-CT-His对不同乙酰寡聚木糖的去乙酰化活性测定

[0138] 采用四级杆-飞行时间质谱仪(LC-QTOF-MS)方法测定融合蛋白BS1-CT-His对不同乙酰寡聚木糖(三聚木糖DP3、四聚木糖DP4、五聚木糖DP5和六聚木糖DP6)的去乙酰化活性,同时以不加融合蛋白BS1-CT-His为对照组(Mock)。取2mM乙酰寡聚木糖作为反应底物,以50mM Tris-HCl为反应缓冲液,加入2 μ g纯化后的融合蛋白BS1-CT-His,反应时间为16h。使用10KDa的浓缩离心管过滤反应体系中的蛋白质。将反应液转移到液相色谱进样瓶中,上机检测。实验数据的分析采用Aglient Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00。

[0139] 结果见图6。从图中可以看出:融合蛋白BS1-CT-His对于三聚乙酰木聚糖(三聚木糖)具有显著活性,更倾向作用于短链的乙酰寡聚木糖。

[0140] 4、融合蛋白BS1-CT-His对突变体bs1乙酰寡聚木糖的酶活动力学曲线的测定

[0141] 采用乙酸测定试剂盒测定融合蛋白BS1-CT-His对突变体bs1乙酰寡聚木糖的酶活动力学曲线。测定方法同步骤二中的4。以从突变体bs1中抽提的乙酰寡聚木糖为底物,底物设定一系列浓度梯度:0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.5mg/mL、0.8mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、3.6mg/mL、7.2mg/mL,然后用乙酸测定试剂盒测定融合蛋白BS1-CT-His催化不同浓度底物所释放的乙酸量,最后以乙酰寡聚木糖浓度为横坐标,以乙酸释放速度为纵坐标,得到融合蛋白BS1-CT-His对乙酰寡聚木糖的酶活动力学曲线。用Origin v8.0软件进行数

据分析,计算得到 K_m 值为 $1.58 \pm 0.52 \text{ mg/mL}$ 。酶活动力学曲线结果见图7。

[0142] 四、利用核磁共振技术NMR检测融合蛋白BS1-CT-His对植物木聚糖乙酰化位点的影响

[0143] 1、突变体bs1中乙酰寡聚木糖的制备

[0144] 抽提突变体bs1中乙酰木聚糖,并制备得到乙酰寡聚木糖,抽提及制备方法同步骤三中的1。

[0145] 2、利用NMR实验测定乙酰寡聚木糖的乙酰化修饰位点

[0146] 取1mg突变体bs1中的乙酰寡聚木糖作为底物,在50mM Tris (pH7.0) 缓冲液中,加入50 μg 纯化后的融合蛋白BS1-CT-His,于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应16h,同时以不加融合蛋白作为对照组,加热15min失活蛋白,12000rpm离心10min,将上清转移至核磁共振(NMR)样品管中。NMR实验中,质子共振频率为599.90MHz,1H-NMR和HSQC-NMR实验温度设置为298K,所用探头为5-mm HCN triple resonance的低温探头。Agilent标准脉冲序列gHSQCAD用来检测细胞壁中13C-1H相关单键。所有的1H-13C HSQC谱图的采集范围为:F2 (1H) 方向谱宽10ppm,F1 (13C) 谱宽200ppm。采集得到 2048×512 (F2 $\times$ F1) 的数据矩阵,采样参数:接收增益为30,扫描次数为64次/FID,Interscan delay (d1) 为1s。DMSO溶剂峰 (dC 39.5ppm和dH 2.49ppm) 用来校准波谱。NMR数据的加工和分析使用MestReNova 10.0.2软件。

[0147] 结果如图8所示。结果表明:突变体bs1中的乙酰寡聚木糖的0-2位和0-3位乙酰化修饰明显低于对照组,表明融合蛋白BS1-CT-His特异参与木聚糖0-2位和0-3的去乙酰化修饰。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 中国科学院遗传与发育生物学研究所															
[0003]	<120> BS1-CT蛋白在调控植物细胞壁木聚糖去乙酰化反应中的应用															
[0004]	<160> 3															
[0005]	<210> 1															
[0006]	<211> 382															
[0007]	<212> PRT															
[0008]	<213> 人工序列															
[0009]	<220>															
[0010]	<223>															
[0011]	<400> 1															
[0012]	Met	Gly	Ala	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	Val	Val	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Val
[0013]	1				5					10					15	
[0014]	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Glu	Gly	Lys	Val	Asn	Gly	Lys	Ala
[0015]					20					25					30	
[0016]	Lys	Gly	Lys	Tyr	Arg	Ala	Leu	Phe	Asn	Phe	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Asp
[0017]					35					40					45	
[0018]	Ala	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Asp	Phe	Arg	Leu	Ala	Thr	Ala
[0019]					50					55					60	
[0020]	Gln	Leu	Pro	Tyr	Gly	Gln	Thr	Phe	Pro	Gly	His	Pro	Thr	Gly	Arg	Cys
[0021]	65					70					75					80
[0022]	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val	Asp	His	Leu	Ala	Asp	Glu	Phe	Gly	Leu
[0023]					85						90					95
[0024]	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Ser	Lys	Leu	Lys	Asn	Ser	Ser	Phe	Ala	His	Gly
[0025]					100					105					110	
[0026]	Ala	Asn	Phe	Ala	Ile	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Asp	Thr	Pro	Tyr	Phe
[0027]					115					120					125	
[0028]	Glu	Ala	Lys	Gly	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Leu
[0029]					130					135					140	
[0030]	Thr	Gln	Ile	Gln	Trp	Phe	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Phe	Phe	Cys	Asn	Ser
[0031]	145					150					155					160
[0032]	Thr	Lys	Val	Glu	Cys	Asp	Glu	Phe	Tyr	Ala	Asn	Ser	Leu	Phe	Val	Val
[0033]					165					170					175	
[0034]	Gly	Glu	Phe	Gly	Gly	Asn	Asp	Tyr	Asn	Ala	Pro	Leu	Phe	Ala	Gly	Lys
[0035]					180					185					190	
[0036]	Gly	Leu	Glu	Glu	Ala	Tyr	Lys	Phe	Met	Pro	Asp	Val	Ile	Gln	Ala	Ile
[0037]					195					200					205	
[0038]	Ser	Asp	Gly	Ile	Glu	Gln	Leu	Ile	Ala	Glu	Gly	Ala	Arg	Glu	Leu	Ile

[0039]	210	215	220
[0040]	Val Pro Gly Val Met Pro Thr Gly Cys Phe Pro Val Tyr Leu Asn Met		
[0041]	225	230	235
[0042]	Leu Asp Glu Pro Ala Asp Gly Tyr Gly Pro Gln Ser Gly Cys Val Arg		
[0043]	245	250	255
[0044]	Arg Tyr Asn Thr Phe Ser Trp Val His Asn Ala His Leu Lys Arg Met		
[0045]	260	265	270
[0046]	Leu Glu Lys Leu Arg Pro Lys His Pro Asn Val Arg Ile Ile Tyr Gly		
[0047]	275	280	285
[0048]	Asp Tyr Tyr Thr Pro Val Ile Gln Phe Met Leu Gln Pro Glu Lys Phe		
[0049]	290	295	300
[0050]	Gly Phe Tyr Lys Gln Leu Pro Arg Ala Cys Cys Gly Ala Pro Gly Ser		
[0051]	305	310	315
[0052]	Val Ala Lys Ala Ala Tyr Asn Phe Asn Val Thr Ala Lys Cys Gly Glu		
[0053]	325	330	335
[0054]	Ala Gly Ala Thr Ala Cys Asp Asp Pro Ser Thr His Trp Ser Trp Asp		
[0055]	340	345	350
[0056]	Gly Ile His Leu Thr Glu Ala Ala Tyr Gly His Ile Ala Arg Gly Trp		
[0057]	355	360	365
[0058]	Val Tyr Gly Pro Phe Ala Asp Gln Pro Ile Phe Gln Ser Ser		
[0059]	370	375	380
[0060]	<210> 2		
[0061]	<211> 1149bp		
[0062]	<212> DNA		
[0063]	<213> 人工序列		
[0064]	<220>		
[0065]	<223>		
[0066]	<400> 2		
[0067]	atgggggcag ttcgggggat tttggtcgtg gcggtggttc ttgcggtggc ggcgattctt 60		
[0068]	gctggggcgg cggaggggaa ggtgaacggg aaggcgaagg ggaagtacag ggcgctgttc 120		
[0069]	aacttcgggg actcgctggc cgacgcggc aacctcctcg ccaacggcgt cgacttccgc 180		
[0070]	ctcgctaccg ccagctccc ctacggccag accttcccc gccacccac cgcccgctgc 240		
[0071]	tccgacggcc gctcgtcgt cgaccacctc gccgacgagt tcggcctgcc gctgctgccg 300		
[0072]	ccgtccaage tcaagaactc cagcttcgct cagggcgcca acttcgccat caccggcgcc 360		
[0073]	accgcgctcg acacccccta cttcgaggcc aaggggctcg gcgccgtcgt ctggaactcc 420		
[0074]	ggcgccctcc tcacccaaat ccagtggttc cgcgatctca agcccttctt ctgcaactcc 480		
[0075]	accaaggtgg aatgcgatga attctatgcg aattcgctct tcgtcgtcgg cgagtttggt 540		
[0076]	ggcaacgact acaatgcgcc gctgtttgcg gggaagggcc ttgaggaggc ctacaagtcc 600		
[0077]	atgccgatg tcatccaggc tatctccgat ggcacgcagc aattgattgc tgagggcgca 660		

[0078]	agggagctga ttgtacccgg tgtgatgccc actggatgct tccctgtcta cttgaacatg	720
[0079]	ctcgatgagc cggccgatgg gtatggcccc cagagcggct gcgtccgtcg gtacaacaca	780
[0080]	ttctcatggg tgcacaatgc acatctcaag cgcattgcttg agaagctccg gccaagcac	840
[0081]	cccaatgtga ggatcatata tggcgattac tacacgcctg ttatccagtt catgcttcag	900
[0082]	cccgagaagt ttggatttta caagcagcta cctagggcat gctgcggggc tcctgggtcc	960
[0083]	gttgcaagg cgcgttaca cttcaatgtc acagccaaat gtggtgaggc tgggtgaacc	1020
[0084]	gcgtgtgatg atccatcaac ccattggagc tgggatggca ttcacctgac agaggcggct	1080
[0085]	tacggtcaca ttgccagagg ttgggtatat ggtcctttcg ctgaccaacc gatcttccaa	1140
[0086]	tcttcatga	1149
[0087]	<210> 3	
[0088]	<211> 381	
[0089]	<212> PRT	
[0090]	<213> 人工序列	
[0091]	<220>	
[0092]	<223>	
[0093]	<400> 3	
[0094]	Glu Gly Lys Val Asn Gly Lys Ala Lys Gly Lys Tyr Arg Ala Leu Phe	
[0095]	5 10 15	
[0096]	Asn Phe Gly Asp Ser Leu Ala Asp Ala Gly Asn Leu Leu Ala Asn Gly	
[0097]	20 25 30	
[0098]	Val Asp Phe Arg Leu Ala Thr Ala Gln Leu Pro Tyr Gly Gln Thr Phe	
[0099]	35 40 45	
[0100]	Pro Gly His Pro Thr Gly Arg Cys Ser Asp Gly Arg Leu Val Val Asp	
[0101]	50 55 60	
[0102]	His Leu Ala Asp Glu Phe Gly Leu Pro Leu Leu Pro Pro Ser Lys Leu	
[0103]	65 70 75 80	
[0104]	Lys Asn Ser Ser Phe Ala His Gly Ala Asn Phe Ala Ile Thr Gly Ala	
[0105]	85 90 95	
[0106]	Thr Ala Leu Asp Thr Pro Tyr Phe Glu Ala Lys Gly Leu Gly Ala Val	
[0107]	100 105 110	
[0108]	Val Trp Asn Ser Gly Ala Leu Leu Thr Gln Ile Gln Trp Phe Arg Asp	
[0109]	115 120 125	
[0110]	Leu Lys Pro Phe Phe Cys Asn Ser Thr Lys Val Glu Cys Asp Glu Phe	
[0111]	130 135 140	
[0112]	Tyr Ala Asn Ser Leu Phe Val Val Gly Glu Phe Gly Gly Asn Asp Tyr	
[0113]	145 150 155 160	
[0114]	Asn Ala Pro Leu Phe Ala Gly Lys Gly Leu Glu Glu Ala Tyr Lys Phe	
[0115]	165 170 175	
[0116]	Met Pro Asp Val Ile Gln Ala Ile Ser Asp Gly Ile Glu Gln Leu Ile	

[0117]	180							185							190													
[0118]	Ala	Glu	Gly	Ala	Arg	Glu	Leu	Ile	Val	Pro	Gly	Val	Met	Pro	Thr	Gly												
[0119]	195							200							205													
[0120]	Cys	Phe	Pro	Val	Tyr	Leu	Asn	Met	Leu	Asp	Glu	Pro	Ala	Asp	Gly	Tyr												
[0121]	210							215							220													
[0122]	Gly	Pro	Gln	Ser	Gly	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Trp	Val												
[0123]	225							230							235							240						
[0124]	His	Asn	Ala	His	Leu	Lys	Arg	Met	Leu	Glu	Lys	Leu	Arg	Pro	Lys	His												
[0125]	245							250							255													
[0126]	Pro	Asn	Val	Arg	Ile	Ile	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Pro	Val	Ile	Gln												
[0127]	260							265							270													
[0128]	Phe	Met	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Phe	Tyr	Lys	Gln	Leu	Pro	Arg												
[0129]	275							280							285													
[0130]	Ala	Cys	Cys	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Val	Ala	Lys	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe												
[0131]	290							295							300													
[0132]	Asn	Val	Thr	Ala	Lys	Cys	Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Cys	Asp	Asp												
[0133]	305							310							315							320						
[0134]	Pro	Ser	Thr	His	Trp	Ser	Trp	Asp	Gly	Ile	His	Leu	Thr	Glu	Ala	Ala												
[0135]	325							330							335													
[0136]	Tyr	Gly	His	Ile	Ala	Arg	Gly	Trp	Val	Tyr	Gly	Pro	Phe	Ala	Asp	Gln												
[0137]	340							345							350													
[0138]	Pro	Ile	Phe	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu												
[0139]	355							360							365													
[0140]	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	His	His	His	His	His	His															
[0141]	370							375							380													

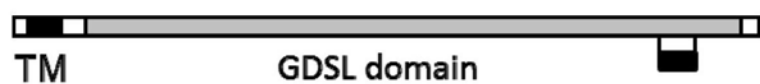
BS1

图1

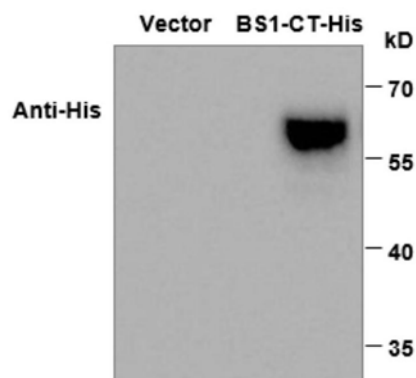


图2

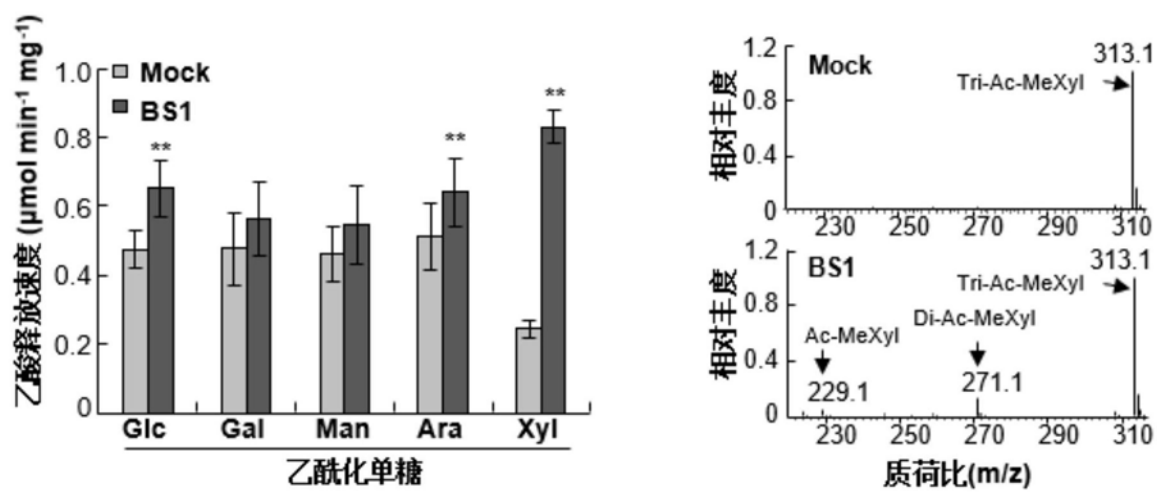


图3

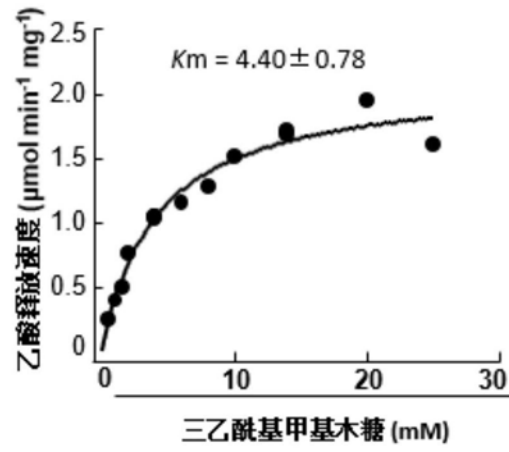


图4

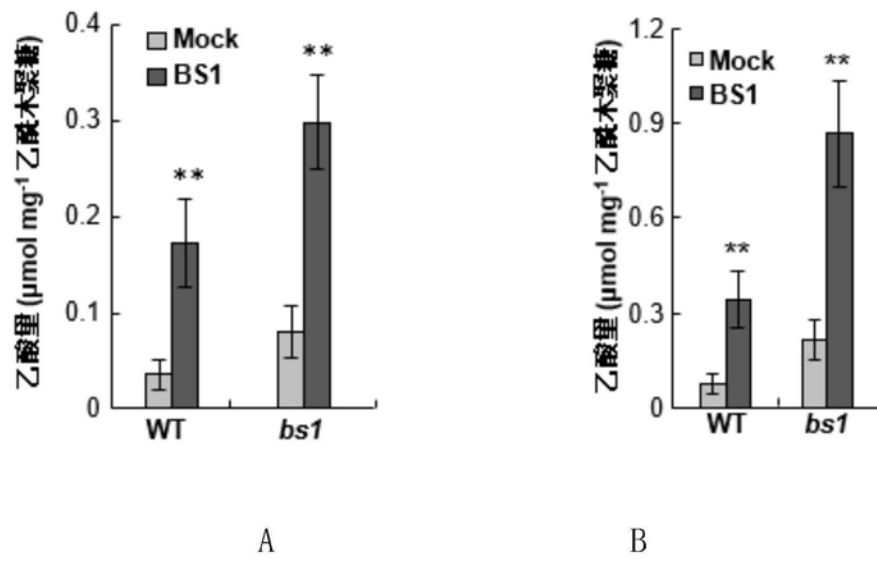


图5

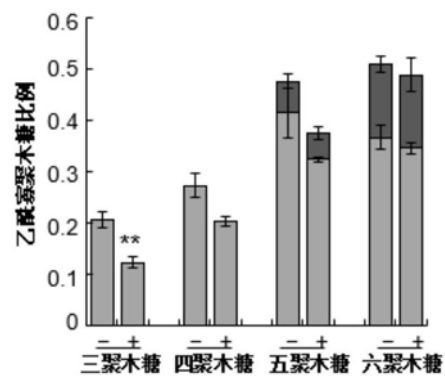


图6

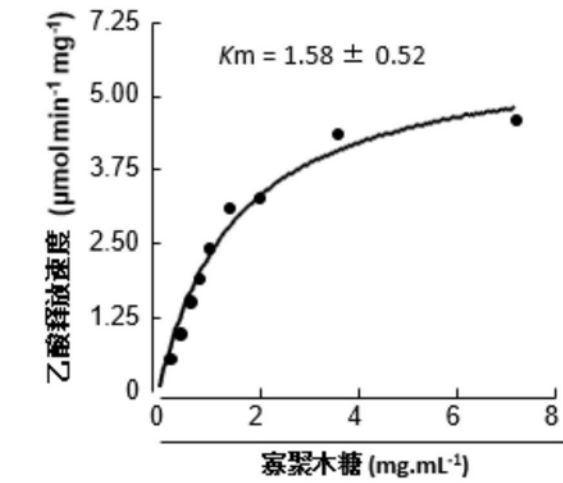


图7

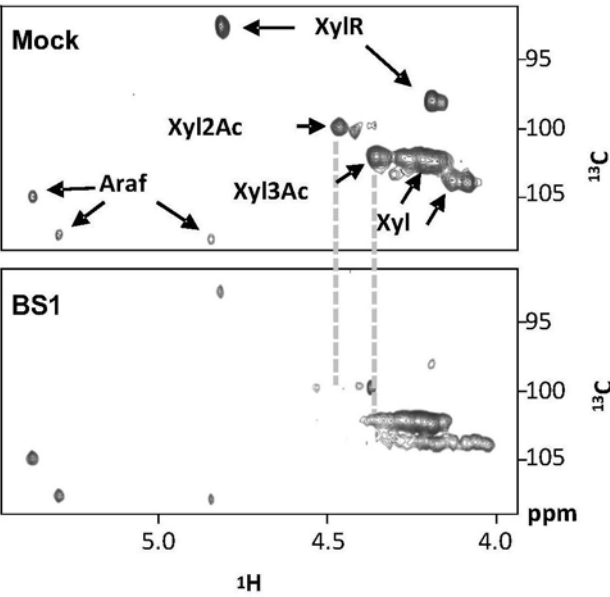


图8