



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108218991 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201810078511.3

(22)申请日 2018.01.26

(71)申请人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路
211号

(72)发明人 余国武 黄玉碧 吕亚楠 张军杰
刘汉梅 胡育峰 刘应红

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理
有限公司 11246

代理人 夏艳

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

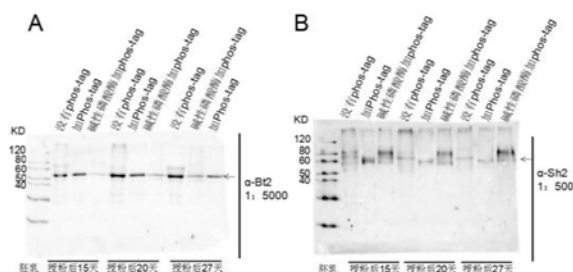
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法

(57)摘要

本发明公开了一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法,涉及生物化学与分子生物学领域,步骤为:AGPase亚基蛋白Sh2和Bt2抗体的制备,AGPase亚基Sh2和Bt2抗体的特异性验证,授粉后15天、20天和27天玉米胚乳蛋白的提取,授粉后15天、20天和27天玉米胚乳磷酸化蛋白的富集,授粉后15天、20天和27天玉米籽粒磷酸化蛋白的检测和验证;本发明在制备好抗体后,结合Phos-tag技术具有快速确定AGPase酶是否发生磷酸化的优势,并且不需要进行质谱,因而成本低。并且此方法只要有特异的相应蛋白抗体,具有推广到鉴定任意一种蛋白磷酸化的鉴定上,因此具有蛋白质磷酸化鉴定的广泛应用。



1. 一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法,其特征在于,包括如下顺序的步骤:

(1) 通过基因克隆、原核表达载体构建、蛋白诱导表达和纯化及动物的免疫和血清的分离制备AGPase亚基蛋白Sh2和Bt2抗体;

(2) 采用Western blot检测AGPase亚基Sh2和Bt2抗体的特异性;

(3) 取材玉米高淀粉自交系08-641授粉后15天、20天和27天的玉米籽粒胚乳,在液氮中研磨至粉末,称重;以1g/3mL的比例加入相应的裂解液,并加入蛋白酶抑制剂,混匀,放置冰上30min;在4℃下12000rpm离心15min,吸取上清于新的离心管,12000rpm离心5min,吸取上清;在3mL反应液中加入6μL的上清,测OD₅₉₅值,计算蛋白浓度;

(4) 取上步获得的蛋白,利用Phos-tag小磁珠富集结合磷酸化蛋白,经过杂蛋白洗涤,洗脱磷酸化蛋白;

(5) 利用制备的AGPase酶大小亚基抗体,将洗脱的磷酸化蛋白SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,封闭,大小亚基一抗杂交,曝光检测是否有条带判断AGPase酶大小亚基是否发生磷酸化;再取玉米胚乳裂解总蛋白10μg,加碱性磷酸酶4μL和2μL 10×碱性磷酸酶buffer,加蛋白裂解液将总体积调为20μL,37℃下反应3h,电泳后转膜,牛奶封闭,Western blot杂交,验证Sh2和Bt2是否去磷酸化,从而证明是否发生磷酸化。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,基因克隆时,Bt2基因所用上游引物序列为:‘5-CGGGATCCATGGACATGGCTTTGGCGTC-3’,下游引物序列为:‘5-CAGTCGACTCATATAACTGTTCCACTAG-3’;Sh2基因所用上游引物序列为:‘5-CGGGATCCATGCAGTTTGCACCTTGCAATTG-3’,下游引物序列为:‘5-CACTCGAGCTATATGACAGACCCATCGTTG-3’。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,基因克隆时,PCR反应程序为95℃、3min,98℃、10s、55℃、30s、68℃、45s、34个循环,72℃、10min。

一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明公开了玉米淀粉合成的关键酶腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 磷酸化的鉴定方法,涉及生物化学与分子生物学领域。

背景技术

[0002] 蛋白质的磷酸化是指蛋白质在激酶的作用下,将ATP或GTP γ 位的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基(丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)上的过程,是生物体内一种蛋白功能最有效的调节方式。同时,蛋白质的去磷酸化是在磷酸酶的作用下,去掉磷酸基团的过程。蛋白质的磷酸化和去磷酸化是一个可逆的过程。蛋白质的磷酸化是目前研究最广泛的蛋白质翻译后修饰之一,在生物的生长发育过程中起着非常关键的作用,几乎参与了所有的生物学过程,比如生物的代谢调控、基因表达调控、对外界环境的响应和细胞的信号转导等过程。有研究表明在生物体内约有三分之一的蛋白质发生磷酸化修饰,因此蛋白质磷酸化鉴定对蛋白质的功能研究显得非常重要。

[0003] 植物磷酸化蛋白质的富集与鉴定技术,是蛋白质磷酸化鉴定的关键。尽管在生物体内约有三分之一的蛋白质发生了磷酸化,但单个磷酸化蛋白在总蛋白中的占比比较小,相对含量比较低,因此直接鉴定单个蛋白的磷酸化比较困难。蛋白质磷酸化鉴定的前提是蛋白的分离与富集。目前对磷酸化蛋白质的富集技术主要有 ^{32}P 放射性标记法、特异性抗体的免疫共沉淀、荧光染料染色和色谱分离等技术。

[0004] ^{32}P 放射性标记法。该方法利用 ^{32}P 放射性同位素示踪标记蛋白质氨基酸上的磷酸基团,从而确定蛋白质磷酸化修饰的状态。Khan运用 γ ^{32}P 标记分析GA处理下水稻叶鞘中的磷酸化蛋白,鉴定出了44个发生磷酸化修饰的蛋白质。由于 ^{32}P 放射性标记法具有放射性,实验操作要求高,因此今年报道较少。

[0005] 免疫共沉淀法。该方法用磷酸化丝氨酸、磷酸化苏氨酸和磷酸化酪氨酸的特异抗体先后进行免疫共沉淀。蛋白质电泳分离蛋白质条带,胶上酶解后进行质谱分析鉴定。应用此方法Rush等富集了4中细胞的600多个酪氨酸磷酸化肽段,其中磷酸化位点约559个。因磷酸化丝氨酸和苏氨酸抗体的抗原决定簇较小,免疫共沉淀较为困难,且磷酸化丝氨酸、磷酸化苏氨酸和磷酸化酪氨酸的特异抗体获得较困难,因此报道也比较少。

[0006] 荧光染料染色法(Pro-Q diamond phosphoprotein stain,Pro-Q DPS)。Pro-Q可高效地与磷酸化的氨基酸残基结合,采用蛋白质电泳技术对组织细胞总蛋白进行分离,然后用Pro-Q对蛋白胶进行染色,只有磷酸化蛋白才会结合Pro-Q而显色。Agrawa等鉴定出了在油菜籽粒发育不同阶段均发生磷酸化修饰的70个蛋白质。

[0007] 固相金属离子亲和色谱(immobilized metal affinity chromatography,IMAC)。1975年Porath提出该方法,其原理是磷酸化蛋白质会与IMAC硅胶柱上的固相化金属离子(Ga^{2+} 或 Fe^{3+})通过静电作用结合,然后先洗脱非磷酸化的杂质,最后富集和分离出磷酸化蛋白质。但该方法也存在多个磷酸化位点较难洗脱,有非特异结合等缺陷。

[0008] 金属氧化物亲和色谱。金属氧化物亲和色谱是一种新兴的磷酸化多肽富集技术,

常用的金属氧化物有 TiO_2 。 TiO_2 是一种两性电解质，在酸性溶液中Ti带正电，能与磷酸盐结合；在高pH或磷酸缓冲液中又可被洗脱下磷酸化多肽。这种方法会受到酸性氨基酸的影响。Prak 等应用 TiO_2 柱层析法富集拟南芥细胞膜的磷酸化蛋白质，找到6个新的磷酸化蛋白。

[0009] Phos-tag技术。Phos-tag是一种对带有磷酸基团的化合物具有特殊亲和力的金属螯合物。在四个吡啶环的和两个主链上两个氮原子和羟基氧原子之间可螯合有如 Zn^{2+} 或 Mn^{2+} 等重金属原子并形成一个半封闭的空间。在适当的环境条件下，该空间恰好能够容纳一个磷酸基团，使得螯合有金属离子的Phos-tag分子能够与磷酸基团牢固而稳定地结合。

[0010] 反应体系的pH值对Phos-tag与磷酸基团的亲和力起至关重要的作用。在 $\text{pH} < 3$ 的酸性条件下，质子与磷酸基团竞争Phos-tag结合位点，使Phos-tag质子化成三价的阳离子；而在 $\text{pH} > 9$ 时，Phos-tag多以氢氧化物形式存在。只有在pH值在6~8的中性环境中Phos-tag才与磷酸基团结合最为稳定。Phos-tag对磷酸化蛋白质的富集正是利用了其在中性环境中捕获磷酸化蛋白质，在酸性环境中洗脱被捕获的蛋白质这一原理来达到富集磷酸化蛋白质的目的。

[0011] 蛋白质磷酸化的鉴定技术主要包括蛋白质或多肽的鉴定，蛋白质或是多肽是否发生磷酸化、磷酸化位点和形式，磷酸化发生的丰度及磷酸化发生的途径和作用的激酶。相应的检测技术主要包括蛋白质电泳、质谱等。

[0012] 凝胶电泳是应用最广泛的一种蛋白质磷酸化检测技术。富集的磷酸化蛋白，采用凝胶电泳进行分离，可检测丰度较高磷酸化蛋白。根据蛋白质磷酸化导致蛋白质再凝胶中迁移速度的不同可用来鉴定蛋白质磷酸化修饰。将磷酸化蛋白在胶中切出，酶解进一步做MALDI-TOF-MS鉴定或与LC-MS/MS联用，可直接鉴定磷酸化蛋白或肽段的种类，并确定蛋白质发生磷酸化的位点。

[0013] 在玉米中，针对蛋白质的磷酸化鉴定的报道最近几年呈增加趋势，尤其是大规模的磷酸化蛋白质组分析。Justin W.Walley等在玉米籽粒发育过程中蛋白组学分析鉴定了14165个蛋白质，用 CeO_2 富集磷酸化蛋白质质谱鉴定有4511个蛋白发生了磷酸化修饰。Michelle等在玉米叶片中鉴定了12000个蛋白质，用 CeO_2 富集磷酸化蛋白，质谱分析鉴定了其中有3500个蛋白质发生了磷酸化。玉米的磷酸化鉴定大部分是集中在大规模的蛋白质组分析研究中，针对单个特定蛋白的磷酸化鉴定还没有很好的方法。

[0014] 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)是玉米淀粉合成的关键限速酶，也是淀粉合成反应的第一步。其酶活性的高低直接决定了玉米淀粉含量的多少。AGPase酶在植物中是以异源四聚体 $\alpha_2\beta_2$ 的结构形式存在，在玉米中由6个基因编码。在胚乳中主要由Sh2和Bt2基因编码，因此AGPase酶主要由大亚基Sh2和小亚基Bt2组成四聚体。关于玉米AGPase磷酸化修饰的鉴定还未见报道。

发明内容

[0015] 本发明是针对目前现有技术的不足，提供了一种AGPase磷酸化新的鉴定方法，尤其是是否发生磷酸化的鉴定方法。

[0016] 为实现上述目的，本发明采用的技术方案是：一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法，

包括如下顺序的步骤:

[0017] (1) 通过基因克隆、原核表达载体构建、蛋白诱导表达和纯化 及动物的免疫和血清的分离制备AGPase亚基蛋白Sh2和Bt2抗体;

[0018] (2) 采用Western blot检测AGPase亚基Sh2和Bt2抗体的特 异性;

[0019] (3) 取材玉米高淀粉自交系08-641授粉后15天、20天和27 天的玉米籽粒胚乳,在液氮中研磨至粉末,称重;以1g/3mL的比例 加入相应的裂解液,并加入蛋白酶抑制剂,混匀,放置冰上30min; 在4℃下12000rpm离心15min,吸取上清于新的离心管,12000rpm 离心5min,吸取上清;在3mL反应液中加入6μL的上清,测OD₅₉₅值,计算蛋白浓度;

[0020] (4) 取上步获得的蛋白,利用Phos-tag小磁珠富集结合磷酸化 蛋白,经过杂蛋白洗涤,洗脱磷酸化蛋白;

[0021] (5) 利用制备的AGPase酶大小亚基抗体,将洗脱的磷酸化蛋白 SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,封闭,大小亚基一抗杂交,曝光检测是 否有条带判断AGPase酶大小亚基是否发生磷酸化;再取玉米胚乳裂 解总蛋白10μg,加碱性磷酸酶4μL和2μL 10×碱性磷酸酶buffer,加蛋白裂解液将总体积调为20μL,37℃下反应3h,电泳后转膜,牛 奶封闭,Western blot杂交,验证Sh2和Bt2是否去磷酸化,从而 证明是否发生磷酸化。

[0022] 作为本发明的一个优选实施方案,基因克隆时,设计Bt2基因 PCR扩增引物时,同时在上游引物上添加BamHI酶切位点,其序列为: '5-CGGGATCCATGGACATGGCTTTGGCGTC-3', 在下游引物序列上添加 SalI酶切位点,其序列为: '5-CAGTCGACTCATATAACTGTTCCACTAG-3'; 设计Sh2基因PCR扩增引物时,同时在上游引物上添加BamHI酶切位 点,其序列为: '5-CGGGATCCATGCAGTTTGCATTG-3',在下游引 物序列上添加SalI酶切位点,其序列为: '5-CACTCGAGCTATATGACAGACCCATCGTTG-3'。

[0023] 进一步的:步骤(1)中,基因克隆时,PCR反应程序为95℃、3 min,98℃、10s、55℃、30s、68℃、45s、34个循环,72℃、10 min。

[0024] 本发明的有益技术效果是:本发明在制备好抗体后,结合 Phos-tag技术具有快速确定AGPase酶是否发生磷酸化的优势, 并且不需要进行质谱,因而成本低。并且此方法只要有特异的相 应蛋白抗体,具有推广到鉴定任意一种蛋白磷酸化的鉴定上,因 此具有蛋白质磷酸化鉴定的广泛应用。

附图说明

[0025] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面 将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而 易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域 普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这 些附图获得其他的附图。

[0026] 图1为pGEX-GST-Bt2载体和pGEX-GST-Sh2转化BL21菌株后,在IPTG诱导不同的时间1-6小时,电泳检测GST-Bt2和GST-Sh2蛋 白;

[0027] 图2为pGEX-GST-Bt2载体和pGEX-GST-Sh2转化BL21菌株后,在IPTG诱导的蛋白表达后,用GST beads纯化GST-Bt2和GST-Sh2 的结果;A为GST-BT2(泳道1为GST-BT2;泳道2为BSA);B为GST-Sh2 蛋白(泳道1为分子Marker;2和3为BSA蛋白;4为纯化的GST-Sh2);

[0028] 图3为AGPase大小亚基的抗体评价效果;A为pGEX-GST-Bt2载 体和pGEX-GST-Sh2;

B为GST-Bt2和GST-Sh2蛋白分别用TEV酶0-6 小时不同时间酶切后,Western blot检测Bt2和Sh2蛋白,一抗为 Sh2,1:5000比例稀释,检测抗体的特异性,C与B类似,仅一抗不同,一抗为兔Bt2;

[0029] 图4为玉米胚乳内源性抗体Bt2和Sh2的检测;A为野生型W64A 玉米与Bt2突变的玉米籽粒授粉后20天,Western blot检测内源性 胚乳的Bt2条带,结果证明Bt2抗体比较特异,B为转录因子O2突变后,Sh2表达上升,检测Sh2的抗体特异性;

[0030] 图5为玉米不同授粉阶段胚乳AGPase亚基磷酸化蛋白的鉴定;图A为 Phos-tag技术的原理图;B为15天、20天和27天玉米胚乳蛋白在有无碱性磷酸酶的作用下,看能否结合Phos-tag验证是否发生了磷酸化;B为Bt2的验证。

具体实施方式

[0031] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 一种AGPase磷酸化新的鉴定方法,步骤包括:

[0033] 1、AGPase亚基蛋白Sh2和Bt2抗体的制备,包括基因的克隆、原核表达载体的构建、蛋白的诱导表达和纯化及动物的免疫和血清的分离。

[0034] (1)克隆玉米AGPase亚基Sh2和Bt2基因,构建原核表达 pGEX-6-GST-Sh2、pGEX-6-GST-Bt2载体。

[0035] 根据玉米数据库中公布的cDNA序列设计分别设计Sh2和Bt2基因的引物并添加酶切位点如下表方案。

[0036] 表1.Bt2基因引物序列与添加的酶切位点

<i>Bt2</i> 基因		
上游引物	‘5-CGGGATCCATGGACATGGCTTTGGCGTC-3’	BamHI
下游引物	‘5-CAGTCGACTCATATAACTGTTCCACTAG-3’	<i>Sa</i> II

[0038] 表2.Sh2基因引物序列与添加的酶切位点

<i>Sh2</i> 基因		
上游引物	‘5-CGGGATCCATGCAGTTTGCACCTTGCAATTG-3’	BamHI
下游引物	‘5-CACTCGAGCTATATGACAGACCCATCGTTG-3’	XhoI

[0040] 以玉米08-641材料胚乳的cDNA为模板,在PCR管中按照表3的组分分别添加各自的引物,进行PCR反应。PCR反应程序按照表4进行。然后DNA电泳,切胶回收,链接T载体,均按常规步骤进行。

[0041] 表3.PCR扩增反应组分如表

[0042]	反应组分	体积 (总 25 μL)
	10 \times KOD FX Buffer	12.5 μL
	KOD FX 酶	0.5 μL
	dNTPs	5 μL
	上游引物	0.5 μL
	下游引物	0.5 μL
	cDNA 模板	1 μL
	水	5 μL

[0043] 表4.PCR扩增反应程序

[0044]	预变性 95℃	3 min	
[0045]	变性 98℃	10 s	34 个循环
	退火 55℃	30 s	
	延伸 68℃	45 s	
	延伸 72℃	10 min	
	保温 12℃	For ever	
	程序完成后, 加 0.5μlTaq 酶 72 度 30min 加 A 尾进行链接反应		

[0046] pGEX-6t-1的酶切和连接转化。将用Sh2引物PCR后连接的T载体 阳性载体和载体 pGEX-6t-1用BamHI和SalI酶切、将用Bt2引物 PCR后连接的T载体阳性载体和载体pGEX-6t-1用BamHI和XhoI进 行酶切;纯化回收酶切后的产物;然后分别将Sh2回收片段、Bt2回 收片段与pGEX-6t-1酶切后的空载连接;将连接产物转入BL21 (DE3) 菌株的感受态细胞中,涂在 Amp平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

[0047] 表5.Bt2酶切反应体系 (总体积30 μL)

[0048]	Bt2 酶切反应体系 (总体积 30 μL)	
	反应组分	体积
	10 \times T Buffer	4.5 μL
	BamHI	1.5 μL
	SalI	1.5 μL
	质粒 DNA	2 μg
	水	X μL

[0049] 表6.Sh2酶切反应体系 (总体积30 μL)

[0050]	Sh2 酶切反应体系 (总体积 30 μL)	
	反应组分	体积
	10 \times H Buffer	3 μL
	BamHI	1.5 μL
	SalI	1.5 μL
	质粒 DNA	2 μg
	水	X μL

[0051] 表7.连接反应体系

连接体系 (10 μL)		
	链接组分	体积
[0052]	连接酶 I 及 buffer	5 μL
	DNA 目的片段	X μL
	水	Y μL

[0053] 转化感受态细胞和重组质粒的鉴定同常规方法,挑选阳性克隆用于下一步实验。

[0054] (2) 诱导玉米AGPase酶大小亚基全长的GST融合蛋白,GST亲和纯化制备AGPase大亚基Sh2和小亚基Bt2的蛋白(如图1和2)。

[0055] 1) 将重组质粒转入E.coli表达感受态细胞BL21 (DE3),涂板,过夜培养;挑取单克隆放入加有1mL LB/Amp的1.5mL EP管中,37℃ 摇4h。

[0056] 2) 取适量菌液于100mL LB/Amp中在37℃培养,测OD₆₀₀,使其在0.4-0.8之间;加入0.5mM IPTG于28℃诱导表达6h。

[0057] 3) 将菌液倒入50mL离心管,在4℃下4500rpm离心5min,去上清,收集菌体。

[0058] 4) 用PBS重悬菌体,离心去上清,重复2-3次。

[0059] 5) 用10mLPBS重悬菌体并加入蛋白酶抑制剂,放于冰上,超声(超6s,间隔10s,重复30次)破碎使细胞裂解,在4℃下10000 rpm离心10min,取上清于新的离心管中。

[0060] 6) 将上清倒入含有已洗涤的100 μL Glutathione beads的纯化柱中,在4℃摇荡,过夜结合。

[0061] 7) 去掉上清,用5-10倍柱体积的PBS洗涤beads。

[0062] 8) 加入200 μL 洗脱液,室温放置20min,用一新的1.5mL EP管接住留下的溶液,重复5-7次。

[0063] 9) 将蛋白加入20%甘油混匀后,放入-20℃保存;将所有的样品(诱导前、诱导后3h和6h、流穿液、纯化的蛋白)进行SDS-PAGE电泳检测(如图1A和图1B)。

[0064] (3) 抗血清制备。以纯化的AGPase大亚基Sh2和小亚基Bt2的蛋白与佐剂混合,200 μg 蛋白与佐剂混合乳化到1mL,免疫新西兰大白兔,每隔2周免疫1次,连续免疫四次,分离血清并Western blot检测评价抗血清。Western blot杂交同常规步骤。

[0065] 1) 购买2Kg左右的兔子,将其喂养3-4天,使其适应环境。

[0066] 2) 在兔子的耳动脉抽取约500 μL 的血液,室温放置2h,然后4℃放置过夜,4000rpm离心5min,吸取上清于新的离心管,加入15%的甘油和0.2%的叠氮化钠,放于-80℃保存。

[0067] 3) 第一次注射时,将纯化的蛋白和不完全佐剂1:1混合,直至1000rpm离心不分层,然后注射到兔子的皮下。其后注射时,是将纯化的蛋白和完全佐剂按体积1:1混合。每隔2周免疫1次,连续免疫四次。

[0068] 4) 在兔子的颈动脉处取所有血液,室温放置2h,然后4℃放置过夜,5000rpm离心5min,吸取上清于新的离心管,加入15%的甘油和0.2%的叠氮化钠,放于-80℃保存。

[0069] 5) Western blot检测评价抗血清。

[0070] 2、AGPase亚基Sh2和Bt2抗体的特异性验证(如图3B和图3C)

[0071] (1) 用rTEV Protease处理融合蛋白,然后进行Western blot检测。

[0072] 表8.蛋白酶酶切反应体系

[0073]	融合蛋白	20 μ g
	rTEV Protease	4 μ L
	rTEV buffer 2(100 \times)	1.5 μ L
	DDW(超纯水)	up to 150 μ L

[0074] 30℃孵育,在0、1、3、6小时分别吸出30 μ L上述反应液,置于单独的干净1.5mLEP管中,作为样品进行Western blot检测。

[0075] (2) O2和Bt2突变体的Western blot检测(如图4A和图4B)。

[0076] 取O2、W64-1、Bt2自然型和Bt2突变型的玉米籽粒,在液氮中研磨至粉末,称重;以1g/3mL的比例加入适当的裂解液,并加入蛋白酶抑制剂,混匀,放置冰上30min;在4℃下12000rpm离心15min,吸取上清于新的离心管,12000rpm离心5min,吸取上清;在3mL反应液中加入6 μ L的上清,测OD₅₉₅值;计算蛋白浓度,每个样品取20 μ g的蛋白,进行Western blot检测。

[0077] 表9.玉米胚乳细胞蛋白裂解液

[0078]	细胞蛋白裂解液	
	Tris-HCl (pH7.0)	100 mM/L
	β -mercaptoethanol	40 mM/L
	MgCl ₂	10 mM/L
	KCl ₂	100 mM/L
	Glycerol	15%

[0079] 3、授粉后15天、20天和27天玉米胚乳蛋白的提取

[0080] 取材玉米高淀粉自交系08-641授粉后15天、20天和27天的玉米籽粒胚乳,在液氮中研磨至粉末,称重;以1g/3mL的比例加入相应的裂解液(参照表9的组分),并加入蛋白酶抑制剂,混匀,放置冰上30min;在4℃下12000rpm离心15min,吸取上清于新的离心管,12000rpm离心5min,吸取上清;在3mL反应液中加入6 μ L的上清,测OD₅₉₅值,计算蛋白浓度,取100 μ g用于后续的实验。

[0081] 4、授粉后15天、20天和27天玉米胚乳磷酸化蛋白的富集(如图5A和图5B的加Phos-tag泳道)。取上步获得的蛋白,利用Phos-tag小磁珠富集结合磷酸化蛋白,经过杂蛋白洗涤,洗脱磷酸化蛋白,具体步骤如下:

[0082] (1) 用异丙醇洗涤旋转柱,1500rpm离心1min。

[0083] (2) 将100 μ L Phos-tag beads置于柱子内,1500rpm离心1min。

[0084] (3) 加入100 μ L的平衡液,静置5min,1500rpm离心1min。

[0085] (4) 加入100 μ L Binding/Wash buffer,1500rpm离心1min,重复一次。

[0086] (5) 加入50 μ g的蛋白样品,室温结合30min,1500rpm离心1min。

[0087] (6) 加入100 μ L Binding/Wash buffer,1500rpm离心1min,重复三次。

[0088] (7) 加入50 μ L Elution buffer,静置15min,1500rpm离心1min,重复3-5次。

[0089] 表10.Phos-tag试剂盒平衡溶液

平衡液		
[0090]	Tris-CH ₃ COOH (pH7.5)	0.1 mol/L
	CH ₃ COONa	1.0 mol/L
	Zn(CH ₃ COO) ₂	10 μmol/L

[0091] 表11.Phos-tag试剂盒结合/洗涤溶液

Binding/Washing buffer		
[0092]	MES-NaOH	10 mmol/L
	NaCl	0.1 mol/L
	Na ₂ C ₂ O ₄	5.0 mmol/L

[0093] 表12.Phos-tag试剂盒洗脱溶液

Elution buffer		
[0094]	Tris-CH ₃ COOH	0.1 mol/L
	Na ₂ HPO ₄ -NaOH (pH7.0)	10 mmol/L
	NaCl	1 mol/L

[0095] 5、授粉后15天、20天和27天玉米籽粒磷酸化蛋白的检测和验证(如图5A和图5B的碱性磷酸酶加Phos-tag泳道)。

[0096] 利用制备的AGPase酶大小亚基抗体,将洗脱的磷酸化蛋白 SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,封闭,大小亚基一抗杂交,曝光检测是否有条带判断AGPase酶大小亚基是否发生磷酸化。

[0097] 再取玉米胚乳裂解总蛋白10μg,加碱性磷酸酶4μL和2μL 10× 碱性磷酸酶buffer,加蛋白裂解液将总体积调为20μL。碱性磷酸酶可以去磷酸化,37℃下反应3h。跑电泳,转膜,牛奶封闭,Western blot杂交,验证Sh2和Bt2是否去磷酸化,从而证明是否发生磷酸化(如图5A和图5B的碱性磷酸酶加Phos-tag泳道);从图5A和图5B的碱性磷酸酶加Phos-tag泳道会发现比没有加碱性磷酸酶的泳道条带变弱,因此证明其去了磷酸基团,从而证明是真正发生了Bt2和 Sh2的磷酸化。。

[0098] 表13.蛋白裂解体系

反应体系		
[0099]	总蛋白	10 μg
	碱性磷酸酶	4 μL
	10× 碱性磷酸酶 buffer	2 μL
	裂解液	up to 20 μL

[0100] 本技术领域技术人员可以理解,除非另外定义,这里使用的所有术语(包括技术术语和科学术语)具有与本发明所属领域中的普通技术人员的一般理解相同的意义。还应该理解的是,诸如通用字典中定义的那些术语应该被理解为具有与现有技术的上下文中的意义一致的意义,并且除非像这里一样定义,不会用理想化或过于正式的含义来解释。

[0101] 最后所应说明的是:以上实施例仅用以说明而非限制本发明的技术方案,尽管参照上述实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应该理解:依然可以对本发明进行修改或者等同替换,而不脱离本发明的精神和范围的任何修改或局部替换,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

序列表

<110> 四川农业大学

<120> 一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法

<130> 说明书、权利要求书

<141> 2018-01-26

<160> 4

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

cgggatccat ggacatggct ttggcgct 28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

cagtcgactc atataactgt tccactag 28

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

cgggatccat gcagtttgca cttgcattg 29

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

cactcgagct atatgacaga cccatcgttg 30

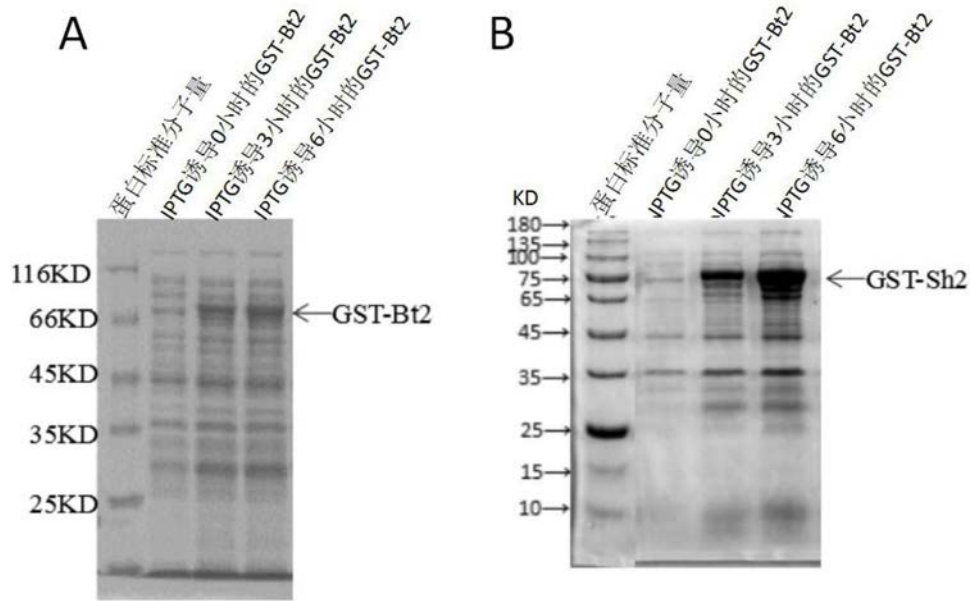


图1

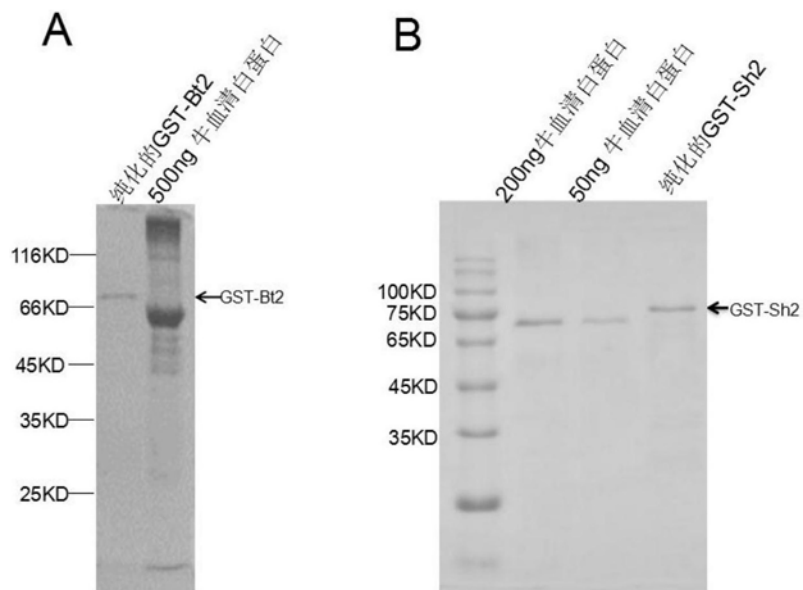


图2

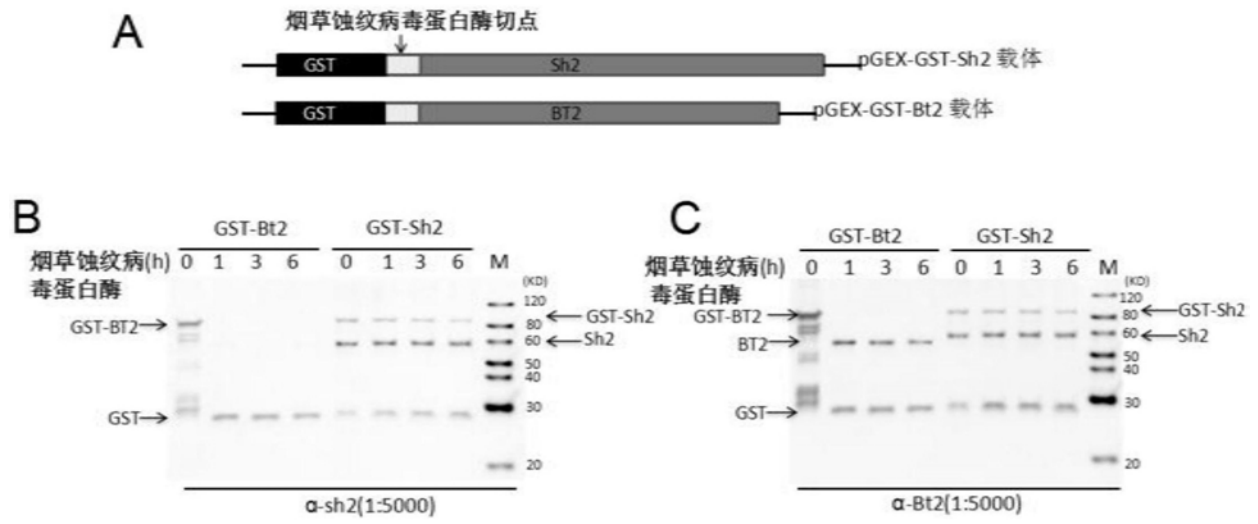


图3

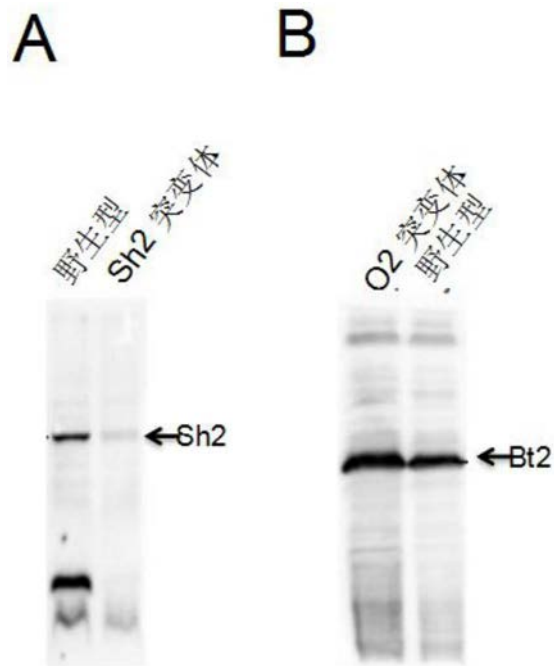


图4

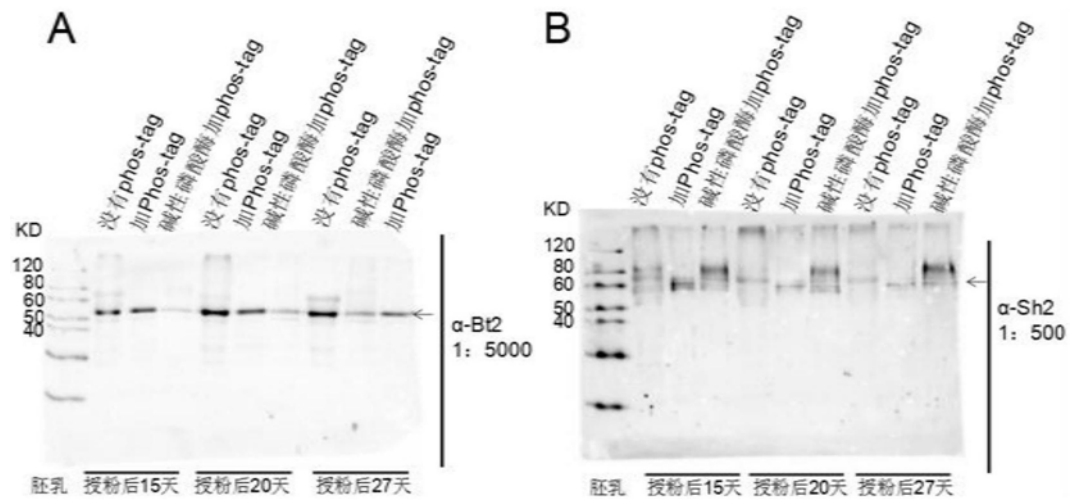


图5

专利名称(译)	一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法		
公开(公告)号	CN108218991A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201810078511.3	申请日	2018-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
[标]发明人	余国武 黄玉碧 吕亚楠 张军杰 刘汉梅 胡育峰 刘应红		
发明人	余国武 黄玉碧 吕亚楠 张军杰 刘汉梅 胡育峰 刘应红		
IPC分类号	C07K16/40 C07K16/06 G01N33/531 G01N33/573		
CPC分类号	C07K16/06 C07K16/40 G01N33/531 G01N33/573 G01N2333/9125		
代理人(译)	夏艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种玉米AGPase磷酸化鉴定方法，涉及生物化学与分子生物学领域，步骤为：AGPase亚基蛋白Sh2和Bt2抗体的制备，AGPase亚基Sh2和Bt2抗体的特异性验证，授粉后15天、20天和27天玉米胚乳蛋白的提取，授粉后15天、20天和27天玉米胚乳磷酸化蛋白的富集，授粉后15天、20天和27天玉米籽粒磷酸化蛋白的检测和验证；本发明在制备好抗体后，结合Phos-tag技术具有快速确定AGPase酶是否发生磷酸化的优势，并且不需要进行质谱，因而成本低。并且此方法只要有特异的相应蛋白抗体，具有推广到鉴定任意一种蛋白磷酸化的鉴定上，因此具有蛋白质磷酸化鉴定的广泛应用。

