



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104388400 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201410653007.3

C12P 7/54(2006.01)

(22)申请日 2012.10.30

C12N 15/70(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104388400 A

(56)对比文件

CN 101182525 A,2008.05.21,
Paul N. Black, Concetta C.

(43)申请公布日 2015.03.04

DiRusso.Yeast acyl-CoA synthetases at the
crossroads of fatty acid metabolism and
regulation.《Biochimica et Biophysica
Acta》.2006,286-298.

(62)分案原申请数据
201210424658.6 2012.10.30

Ru Li,et al.Purification and
characterization of the acetyl-CoA
synthetase from Mycobacterium
tuberculosis.《Acta Biochim Biophys Sin》
.2011,第43卷891-899.

(73)专利权人 浙江工业大学
地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路
18号

Stefanie Berger,et al.Acetate
Activation in Methanosaeta thermophila:
Characterization of the Key Enzymes
Pyrophosphatase and Acetyl-CoA
Synthetase.《Archaea》.2012,第2012卷1-10.

专利权人 杭州中美华东制药有限公司

(72)发明人 郑裕国 柳志强 吴晖 李邦良
许静 林善 许峰 薛亚平
袁水金 王鸿艳

审查员 徐丹

(74)专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201
代理人 黄美娟 李世玉

(51)Int.Cl.

C12N 9/00(2006.01)

C12N 15/52(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表5页 附图6页

(54)发明名称

冬虫夏草中国被毛孢合成乙酸的酶、基因及其
应用

(57)摘要

冬虫夏草中国被毛孢合成乙酸的酶、基因及其
应用。本发明涉及一种来自“百令”生产菌冬虫
夏草中国被毛孢参与从乙酰辅酶A出发合成代谢
乙酰基-酰基载体蛋白的酶,编码这个酶的基因
及其应用。所述脂肪-酰基辅酶A合酶的氨基酸序
列为SEQ ID No.3所示的蛋白。本发明从原理上
对乙酰辅酶A合成乙酰基-酰基载体蛋白的代谢
途径进行了详细研究,提供了“百令”生产菌冬虫
夏草中国被毛孢参与乙酰辅酶A出发合成代谢乙
酰基-酰基载体蛋白的酶及其编码基因,本发明
所提供的核苷酸序列的克隆DNA可以用来通过转

导、转化、结合转移的方法转入工程菌中,通过调
节乙酰基-酰基载体蛋白生物合成基因的表达,
赋予宿主脂肪-酰基辅酶A合酶的高表达性,为扩
大乙酸的产量提供了有效途径,具有重大应用前
景。

1. 一种参与乙酰辅酶A合成代谢乙酰基-酰基载体蛋白的脂肪-酰基辅酶A合酶,其特征
在于所述脂肪-酰基辅酶A合酶的氨基酸序列如SEQ ID No.3所示。
2. 如权利要求1所述的脂肪-酰基辅酶A合酶在生物催化制备乙酸中的应用。
3. 编码权利要求1所述脂肪-酰基辅酶A合酶的基因。
4. 如权利要求3所述的基因,其特征
在于所述基因的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示。
5. 如权利要求3所述的基因在构建能够生物催化乙酰辅酶A制备乙酰基-酰基载体蛋白
的基因工程菌中的应用。

冬虫夏草中国被毛孢合成乙酸的酶、基因及其应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种来自“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢的参与乙酰辅酶A出发合成代谢乙酰基-酰基载体蛋白的脂肪-酰基辅酶A合酶(Acyl-coenzyme A synthetase), 编码这个酶的基因及其应用, 乙酰基-酰基载体蛋白可再经过水解生成乙酸。

(二) 背景技术

[0002] 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.) 是冬虫夏草菌寄生在鳞翅目(Lepidoptera) 蝙蝠蛾科昆虫(*Hepialus armoricanus* Oberthur) 幼虫上的子座及幼虫尸体上的复合体(包括子座和虫体)。冬虫夏草是一类珍惜的传统真菌药材资源, 具有代谢产物和生物活性多样的特点, 在生物医药领域展现出巨大的应用和发展前景。冬虫夏草以其多种药用功效广泛、明显而备受关注, 在世界范围内备受推崇。中医认为, 冬虫夏草入肺肾二经, 既能补肺阴, 又能补肾阳, 主治肾虚, 阳痿遗精, 腰膝酸痛, 病后虚弱, 久咳虚弱, 劳咳痰血, 自汗盗汗等, 是唯一的一种能同时平衡、调节阴阳的中药。现代药理学已证实, 冬虫夏草具有免疫调节、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、降血糖血脂、性激素样作用等广泛的生物活性。

[0003] 冬虫夏草菌是一种子囊菌, 在其生活史中具有分生孢子阶段(无性型) 和子囊孢子阶段(有性型)。而在人工培养、液体发酵等实际生产中使用的是无性阶段的冬虫夏草菌, 因而冬虫夏草无性型的鉴定非常重要。国内外学者在冬虫夏草资源调查、无性型确证、活性成分分离分析和作用机理、开发应用方面做了大量工作。冬虫夏草中国被毛孢已被证明是冬虫夏草的无性型存在形式, 具有与天然冬虫夏草相同的活性成分和药效。

[0004] 天然虫草具有严格的寄生性以及特殊的生态环境, 故其产量很低, 价格高昂。野生冬虫夏草由于受生长环境等因素制约, 资源匮乏。由于近几年在人工栽培上进展不大, 野生冬虫夏草代用品研究多集中在液体发酵上。利用液体深层发酵培养冬虫夏草菌丝体、提取物或发酵液, 是解决冬虫夏草药源的一种有效途径。虫草发酵生产虫草替代品, 既可有效保护虫草这一珍贵资源, 又不受气候、地理环境和虫草寄生条件严格的限制, 适合于工业化大规模生产。生产出的替代品如菌丝体其成分和药效也与天然虫草相似, 因而国内外一直致力于虫草菌丝体的发酵培养。人工发酵培养冬虫夏草中国被毛孢得到的菌丝, 经毒理、药理、植化研究, 证明与天然虫草化学组成、药理作用基本一致, 可代替天然虫草生产虫草制品, 以弥补自然资源的短缺, 通过对发酵条件的优化, 菌丝体生物量和代谢产物的量均有明显提高。

[0005] 近年来, 随着天然产物化学和现代色谱技术的飞速发展, 在对虫草产品研发中已逐步由虫草原料或粗提物的直接利用转向更深层次的功能性代谢产物研究。国内外已对虫草代谢产物做了大量的研究, 代谢产物主要包括核苷、多糖、多肽、甾醇等几大类化合物, 其中嘌呤类核苷、虫草多糖、甘露醇等具有代表性的功能性代谢产物在生物合成、药理作用等方面的研究初见成效。

[0006] 不饱和脂肪酸是指分子中含有一个或多个双键的脂肪酸, 其熔点较饱和脂肪酸

低。不饱和脂肪酸是构成体内脂肪的一种脂肪酸,人体必需的脂肪酸,不饱和脂肪酸根据双键个数的不同,分为单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸二种。多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acids,PUFAs)相对饱和脂肪酸来说具有更多的功效,它可以降低血中胆固醇和甘油三酯,调节心脏功能,降低血液黏稠度,改善血液微循环,提高脑细胞的活性,增强记忆力和思维能力,增强人体防御系统的功能等,此外它还可以排除体内多余的“垃圾”,也就是由于摄入了过量的饱和脂肪酸形成的多余脂肪,从而达到减肥的目的。因此,其潜在的医用药用价值受到了世界的广泛关注,引起了食品、医药甚至化妆品等行业的高度重视。

[0007] 1999年Yung-Sheng引克隆了高山被孢霉(Mortiere Uaalpina)的 $\Delta 6$ 和 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶基因并在酿酒酵母中进行了表达。2004年,Dyer等人将桐树中的 $\Delta 3$ 去饱和酶转入酵母,成功地获得了产亚麻酸的酵母菌。2007年Maali-Amiri等人将藻青菌(Cyanobacterium)的 $\Delta 12$ 去饱和酶转入马铃薯,成功检测到马铃薯脂肪酸成分发生了明显变化。2008年,Hao等人将卷枝毛霉的 $\Delta 6$ 去饱和酶转入转基因烟草中,成功获得了高产 γ -亚麻酸的菌株。此外,还有许多脂肪酸去饱和酶相关的基因被克隆并转化应用。由于大部分去饱和酶为膜结合蛋白,其分离纯化十分困难,已经分离纯化并鉴定的去饱和酶屈指可数,而绝大多数的研究是围绕去饱和酶基因及其表达调控来进行的。

[0008] 目前,所应用的不饱和脂肪酸生产菌以枯草芽孢杆菌为主,而作为重要合成代谢不饱和脂肪酸的冬虫夏草菌,还只停留在代谢产物成分分析和功效的研究上,对冬虫夏草菌不饱和脂肪酸合成代谢途径中相关基因和蛋白的研究还很少见。

(三) 发明内容

[0009] 本发明目的在于针对以上存在的不足和需要解决的技术问题,对“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢合成代谢乙酸的酶及其编码基因进行深入研究,提供了“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢参与乙酰辅酶A出发合成代谢乙酰基-酰基载体蛋白的酶、编码基因及其应用。

[0010] 本发明采用的技术方案是:

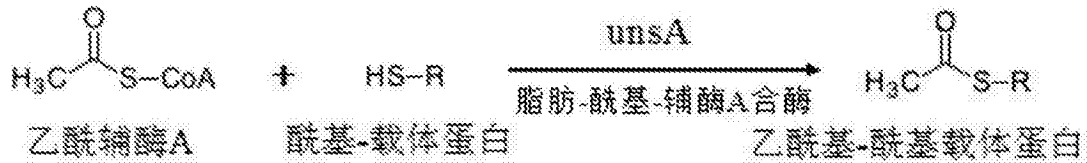
[0011] 一种参与乙酰辅酶A出发合成代谢乙酰基-酰基载体蛋白的脂肪-酰基辅酶A合酶,与SEQ ID No.1或SEQ ID No.3所示序列具有90%以上同源性。由于氨基酸序列的特殊性,任何含有SEQ ID NO.1或SEQ ID No.3所示氨基酸序列的肽蛋白的片段或其变体,如其保守性变体、生物活性片段或衍生物,只要该肽蛋白的片段或肽蛋白变体与前述氨基酸序列同源性在90%以上,均属于本发明保护范围之列。具体的所述改变可包括氨基酸序列中氨基酸的缺失、插入或替换;其中,对于变体的保守性改变,所替换的氨基酸具有与原氨基酸相似的结构或化学性质,如用亮氨酸替换异亮氨酸,变体也可具有非保守性改变,如用色氨酸替换甘氨酸。

[0012] 优选的,所述脂肪-酰基辅酶A合酶氨基酸序列如SEQ ID No.1或SEQ ID No.3所示(分别记为unsA₁,unsA₂蛋白);该酶可催化乙酰辅酶A和酰基-载体蛋白制备相应的乙酰基-酰基载体蛋白,乙酰基-酰基载体蛋白再经过水解酶的作用生成乙酸。

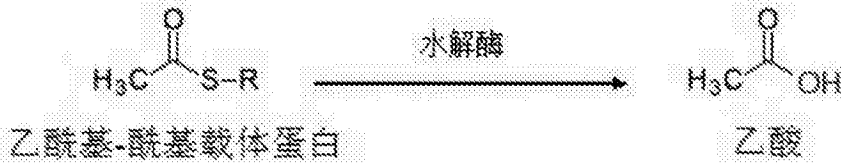
[0013] 本发明所述脂肪-酰基辅酶A合酶来自“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢。

[0014] 由乙酰辅酶A合成代谢获得对应乙酰基-酰基载体蛋白、乙酰基-酰基载体蛋白水

解获得乙酸的路径如下所示 (HS-R中的R为酰基载体蛋白Acyl-carrier protein) :



[0015]



[0016] 本发明还涉及所述的脂肪-酰基-辅酶A合酶在生物催化制备乙酸中的应用,具体的,所述应用为:以本发明脂肪-酰基-辅酶A合酶催化乙酰辅酶A制备乙酰基-酰基载体蛋白,乙酰基-酰基载体蛋白再经水解获得乙酸。

[0017] 本发明还涉及上述脂肪-酰基-辅酶A合酶的编码基因,即脂肪-酰基-辅酶A合酶基因,具体的,该编码基因可为与SEQ ID NO:2或SEQ ID No.4所示多核苷酸具有90%以上同源性的基因序列。由于核苷酸序列的特殊性,任何SEQ ID NO:2或SEQ ID No.4所示多核苷酸的变体,只要其与该多核苷酸具有90%以上同源性,均属于本发明保护范围之列。所述多核苷酸的变体是指一种具有一个或多个核苷酸改变的多核苷酸序列。此多核苷酸的变体可以使生的变位变异体或非生的变异体,包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个多核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的肽蛋白的功能。

[0018] 优选的,核苷酸序列如SEQ ID No.2或SEQ ID No.4所示(分别记为unsA₁,unsA₂基因;unsA₁基因编码unsA₁蛋白,unsA₂基因编码unsA₂蛋白)。

[0019] 所述的基因可用于构建能够生物催化乙酰辅酶A制备乙酰基-酰基载体蛋白的基因工程菌,以扩大乙酸或其衍生物的产量。

[0020] 本发明的要点在于提供了SEQ ID NO:1或3所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:2或4所示的核苷酸序列,在已知该氨基酸序列和核苷酸序列的情况下,该氨基酸序列和核苷酸序列的获得,以及相关载体、宿主细胞的获得,对于本领域技术人员来说均是显而易见的。

[0021] 本发明的有益效果主要体现在:本发明从原理上对乙酰辅酶A合成乙酰基-酰基载体蛋白代谢途径进行了详细研究,提供了“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢参与乙酰辅酶A出发合成代谢乙酰基-酰基载体蛋白的酶及其编码基因,本发明所提供的核苷酸序列的克隆DNA可以用来通过转导、转化、结合转移的方法转入工程菌中,通过调节乙酰基-酰基载体蛋白生物合成基因的表达,赋予宿主脂肪-酰基辅酶A合酶的高表达性,为扩大乙酸或其衍生物的产量提供了有效途径,具有重大应用前景。

(四)附图说明

[0022] 图1为“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢总RNA的甲醛变性凝胶电泳图;

[0023] 图2为脂肪酸合成代谢途径注释图;

[0024] 图3为脂肪酸代谢途径注释图;

- [0025] 图4为不饱和脂肪酸合成代谢途径注释图；
[0026] 图5为脂肪-酰基-辅酶A合酶基因PCR扩增产物凝胶电泳图；
[0027] 图6为克隆载体pMD18-T Vector与表达载体pET-28a物理图谱；
[0028] 图7为重组克隆质粒pMD18-T/uns A物理图谱；
[0029] 图8为重组表达质粒pET-28a/uns A构建过程示意图；
[0030] 图9为重组表达质粒pET-28a/uns A物理图谱；
[0031] 图10为脂肪-酰基-辅酶A合酶蛋白的SDS-PAGE图。

(五) 具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0033] 实施例1:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢的培养

[0034] 菌株来源:首先从青海采集天然冬虫夏草,并将其带回杭州进行分离筛选,得到了L0106菌株,并经菌种鉴定该菌株为中国被毛孢(*Hirsutella Sinensis*),该菌种保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC No:M 2011278,已在先前申请的专利CN102373190A中披露。

[0035] 将该菌种接种于斜面,培养基配方(此为固化之前的液体配方,按下述比例配制好之后再制成斜面)为:葡萄糖2.0% (w/v,1%表示100mL培养基中含有1g,下同)、玉米粉1.0%、土豆汁0.5%、糊精0.5%、酵母粉0.5%、麸皮1.0%、蚕蛹粉2.0%、蛋白胨1.0%、硫酸镁0.05%、磷酸二氢钾0.05%、琼脂粉1.0%,余量为水;在12~16℃培养25天;然后将菌种接种于发酵培养基,培养基配方为葡萄糖1.0%、糖蜜1.0%、蚕蛹粉0.5%、黄豆饼粉1.0%、酵母膏0.5%、硫酸镁0.01%、磷酸二氢钾0.02%,余量为水;置于摇床上,温度12~16℃培养25天,培养结束后在无菌条件下,进行固液分离,并将固体置于无菌器具,备用。

[0036] 实施例2:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢总RNA的提取

[0037] 用TRIzol试剂提取总RNA,步骤具体为:

[0038] 1) 液氮研磨:取1g新鲜菌体放入研钵中,反复加入液氮充分研磨至粉末状,分装到预冷的1.5mL离心管中,加入1mL TRIzol试剂,混匀,冰上静置5min,使核酸蛋白复合物完全分离。

[0039] 2) RNA分离:加入0.2mL氯仿,用力震荡混匀15s,冰上静置2~3min,4℃、12000rpm离心15min,分层,取上层水相,约600μL。

[0040] 3) RNA沉淀:加入500μL异丙醇,在冰上静置10min,4℃、12000rpm离心10min,弃上清。

[0041] 4) RNA洗涤:加入1mL 75% (v/v) 乙醇,将沉淀悬起,冰上静置10min,4℃、7500rpm离心15min;重复上面洗涤步骤,再洗一遍。

[0042] 5) 溶解RNA:将离心管置于冰上敞开干燥5~10min,加适量DEPC水溶解。

[0043] 实施例3:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢RNA样品测序

[0044] 提取样品总RNA后,用带有Oligo (dT) 的磁珠富集mRNA。加入fragmentation buffer将mRNA打断成短片段(200~700bp),以mRNA为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成第一条cDNA链,然后合成第二条cDNA链,再经过QiaQuick PCR试剂盒纯化并

加EB缓冲液洗脱之后做末端修复、加polyA并连接测序接头,然后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择,最后进行PCR扩增,建好的测序文库用Illumina GA IIx进行测序。测序得到的原始图像数据经base calling转化为序列数据,即raw data或raw reads。除去原始测序reads中只含adaptor序列的reads,备以后续分析。

[0045] 实施例4:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢RNA短读序列组装

[0046] 使用短reads组装软件SOAPdenovo (Li,Zhu et al.De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing [J].Genome Res,2010,20:265-272.)做转录组从头组装。SOAPdenovo首先将具有一定长度overlap的reads连成更长的不含N的Contig片段。然后将reads比对回Contig,通过paired-end reads确定来自同一转录本的不同Contig以及这些Contig之间的距离,SOAPdenovo将这些Contig连在一起,中间未知序列用N表示,这样就得到Scaffold。进一步利用paired-end reads对Scaffold做补洞处理,最后得到含N最少,两端不能再延长的Unigene序列。最后,将Unigene序列与蛋白数据库nr、Swiss-Prot、KEGG和COG做blastx比对 (evalue<0.00001),取比对结果最好的蛋白确定Unigene的序列方向。如果不同库之间的比对结果有矛盾,则按nr、Swiss-Prot、KEGG和COG的优先级确定Unigene的序列方向,跟以上四个库皆对比不上的Unigene用软件ESTScan (Iseli,Jongeneel et al.ESTScan:a program for detecting,evaluating,and reconstructing potential coding regions in EST sequences [J].In Proceedings of 9th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology.AAAIPress, Menlo Park, CA, pp.1999,138-148.)预测其编码区并确定序列的方向。对于能确定序列方向的Unigene给出其从5'到3'方向的序列,对于无法确定序列方向的Unigene给出组装软件得到的序列。

[0047] 实施例5:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢Unigene功能注释

[0048] 功能注释信息给出Unigene的蛋白功能注释、Pathway注释、COG功能注释和Gene Ontology (GO) 功能注释。首先,通过blastx将Unigene序列比对到蛋白数据库nr、Swiss-Prot、KEGG和COG (evalue<0.00001),得到跟给定Unigene具有最高序列相似性的蛋白,从而得到该Unigene的蛋白功能注释信息。根据KEGG注释信息能进一步得到Unigene的Pathway注释。将Unigene和COG数据库进行比对,预测Unigene可能的功能并对其做功能分类统计。根据nr注释信息,使用Blast2GO软件 (Conesa,Gotz et al.Blast2GO:a universal tool for annotation,visualization and analysis in functional genomics research [J].Bioinformatics,2005,21 (18):3674-3676.)得到Unigene的GO注释信息。得到每个Unigene的GO注释后,用WEGO软件 (Ye,Fang et al.WEGO:a web tool for plotting GO annotations [J].Nucleic Acids Research,2006,34:293-297.)对所有Unigene做GO功能分类统计,从宏观上认识该物种的基因功能分布特征。

[0049] 实施例6:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢乙酸代谢途径分析

[0050] 图2是KEGG代谢途径注释中的脂肪酸合成代谢 (map00061),图3是KEGG代谢途径注释中的脂肪酸代谢 (map00071),图4是KEGG代谢途径注释中的不饱和脂肪酸合成代谢 (map01040),已注释的酶是已检测到的“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢乙酸代谢途径相关酶类,从图中可以看出,检测到了从乙酰辅酶A出发合成对应乙酰-酰基载体蛋白的脂肪-酰基-辅酶A合酶2个Unigene。通过NCBI中的ORF Finder软件在线检测,找出了这个基因的

开放阅读框 (SEQ ID No.2, SEQ ID No.4) 并得到了相应的蛋白质序列 (SEQ ID No.1, SEQ ID No.3)。

[0051] 实施例7: “百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢脂肪-酰基-辅酶A合酶基因引物设计

[0052] 运用GENE RUNNER引物设计软件根据预测得到的各基因开放阅读框DNA序列设计引物,用于克隆“百令”生产菌中国被毛孢合成代谢乙酸的脂肪-酰基-辅酶A合酶基因,引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列如下所列:

[0053] unsA₁基因:正向引物5' ACGGAATTCATGGCCATGACTTTCGAGACAG 3'

[0054] 反向引物5' AGCAAGCTTTCACAGGAATGACCGGAAAGG 3'

[0055] unsA₁基因长度为777bp。

[0056] unsA₂基因:正向引物5' ATAGGATCCATGTACGGCACGGGAACCGG 3'

[0057] 反向引物5' ATAAAGCTTCATCGTCTGGTCAAGGCCTGTG 3'

[0058] unsA₂基因长度为1254bp。

[0059] 实施例8: “百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢cDNA第一链的制备

[0060] 先按照实施例1提供的方法培养出中国被毛孢发酵菌丝体后,再按照实施例2所提供的方法对中国被毛孢进行总RNA的提取,得到总RNA后按下述进行“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢cDNA第一链的合成,用于后续各基因克隆实验。

[0061] 采用PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(TaKaRa)从Total RNA中反转录合成cDNA第一链,实验步骤如下:

[0062] 1) 在Microtube管中配制下列混合液。

	dNTP Mixture (10 mM each)	1μL
[0063]	Oligo dT Primer (2.5 μM)	1μL
	Total RNA	0.5μg
	RNase Free dH ₂ O	up to 10μL

[0064] 2) 变性、退火操作有利于模板RNA的变性以及反转录引物和模板的特异性退火,可提高反转录反应效率,所以在PCR仪上进行变性、退火反应,条件设置如下:

[0065] 65°C, 5min

[0066] 3) 退火结束后离心数秒钟使模板RNA/引物等的混合液聚集于Microtube管底部。

[0067] 4) 在上述Microtube管中配制下列反转录反应液。

	上述变性、退火后反应液	10μL
	5×PrimeScript Buffer	4μL
[0068]	RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5μL
	PrimeScript RTase (for 2 Step)	0.5μL
	RNase Free dH ₂ O	5μL
	Total Volume	20μL

[0069] 5) 在PCR仪上按下列条件进行反转录反应。

[0070] 42°C 15~30min

[0071] 70℃ 15min

[0072] 一般情况,在真核生物mRNA 3'末端都有一个PolyA结构,A碱基的数量在十至几百个不等,利用这一结构可以利用Oligo(dT)引物,在反转录酶的作用下,以mRNA为模板合成cDNA第一链,本发明采用由TaKaRa独自开发的dT区域的序列(PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit中提供)为引物,如果获得的mRNA完整性较好,那么通过逆转录过程可以得到物种中所有酶蛋白编码基因的cDNA第一链。

[0073] 实施例9:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢合成代谢乙酸功能基因脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA基因的克隆、表达以及蛋白活力的检测

[0074] 1、脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁和unsA₂基因的PCR扩增

[0075] 以实施例8中得到的cDNA第一链为模板,用实施例7中合成的unsA₁基因引物:5' ACG GAA TTC ATG GCC ATG ACT TTC GAG AC AG3' 和5' AGC AAG CTT TCACAG GAA TGA CCG GAA AGG3',unsA₂基因引物:5' ATA GGA TCC ATG TAC GGCACG GGA ACC GG3' 和5' ATA AAG CTT CAT CGT CTG GTC AAG GCC TGT G 3' 进行Pfu DNA聚合酶PCR扩增反应,条件设置如下:

[0076] Pfu PCR扩增反应体系:

	体系构成	体积 (μL)
	无核酸水	85
	10×缓冲液	10
	4×dNTP	1
[0077]	正向引物 (50uM)	1
	反向引物 (50uM)	1
	cDNA 第一链 (50ng/ul)	1
	Pfu	1
	总体系	100

[0078] Pfu DNA Ploymerase PCR扩增条件:

	步 骤	温 度 (°C)	时 间
	1 变性	94	5 min
[0079]	2 35个 循环	变性	94
		退火	55-68
		延伸	72
	3 后延伸	72	20 min

[0080] 2、脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁和unsA₂基因PCR产物凝胶电泳检测

[0081] 具体检测方法为:

[0082] 1) 将配制好的0.9%的琼脂糖凝胶用微波炉加热使其溶解均匀;

[0083] 2) 取15mL凝胶,待凝胶冷却至50℃左右时,加入1μL染色液Gold view,混合均匀后倒入电泳凝胶板上,除去气泡后插入点样梳;

[0084] 3) 凝胶凝固后,小心取出点样梳,将胶板放入电泳槽中(点样孔一端靠近电泳槽的负极),在电泳槽中加入TAE电泳缓冲液;

[0085] 4) 取5 μ L样品然后加入6 \times Loading Buffer 1.5 μ L和ddH₂O 4 μ L混合后用移液枪上样,上样量为10 μ L;

[0086] 5) 连接电泳槽与电泳仪之间的电源线,正极为红色,负极为黑色;

[0087] 6) 开启电源,开始电泳,最高电压不超过5V/cm;

[0088] 7) 当样品跑过胶板的2/3时可终止电泳;

[0089] 8) 切断电源后,将凝胶取出放入凝胶成像仪中观察、拍照。

[0090] 转录组测序预测脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁基因的大小为777bp,unsA₂基因的大小为1254bp,琼脂糖凝胶电泳结果表明已成功扩增出了脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁基因,大小约为770bp,unsA₂基因,大小约为1250bp。图5为“百令”生产菌中国被毛孢合成代谢乙酸功能基因PCR产物凝胶电泳图。

[0091] 3、脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁和unsA₂基因PCR产物的加碱基A处理以及纯化

[0092] 由于Pfu DNA聚合酶PCR产物末端为平端,所以在胶回收后还需进行加碱基A处理、纯化后才可用于T载体连接。胶回收产物加碱基A体系如下:

	体系构成	体积 (μ L)
	胶回收产物	25
	10 \times Taq DNA Polymerase Buffer	5
[0093]	4 \times dNTPs (20 mmol/50 μ L 反应体系)	2
	Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L)	1
	无菌水	17
	总体系	50

[0094] PCR仪中72 $^{\circ}$ C加A碱基20min,最后用AxyPrep PCR清洁试剂盒纯化。

[0095] 4、脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁和unsA₂基因与克隆载体的连接

[0096] 克隆载体pMD18-T Vector购自TaKaRa公司(TaKaRa code D101A),其物理

[0097] 图谱见图6,将脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁,unsA₂基因与克隆载体连接构建重组质粒pMD18-T/unsA₁,pMD18-T/unsA₂,物理图谱见图7,连接体系和连接条件如下。

[0098] 连接体系:

体系构成	体积 (μ L)
T Vector	1
T4 DNA Ligase	1
目的基因	3
2 \times Buffer	5
总体系	10

[0099] 连接条件:16 $^{\circ}$ C,16h;灭活:65 $^{\circ}$ C,15min。

[0100] 5、脂肪-酰基-辅酶A合酶重组质粒pMD18-T/unsA₁和pMD18-T/unsA₂的转化

[0101] 将重组质粒pMD18-T/unsA₁和pMD18-T/unsA₂分别转入大肠杆菌E.coli JM109中构建携带脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA基因的重组菌E.coli JM109/pMD18-T/unsA₁和E.coli JM109/pMD18-T/unsA₂,具体步骤为:1)将10 μ L反应体系转至感受态细胞E.coli JM109中,冰浴30min;2)热击:42 $^{\circ}$ C,90s;3)冰浴:2-3min;4)加入800 μ L液体LB,37 $^{\circ}$ C,250rpm,1h;5)涂布平板(含Amp抗性);6)37 $^{\circ}$ C培养箱培养过夜。

[0102] 6、脂肪-酰基-辅酶A合酶E.coli JM109/pMD18-T/unsA₁和E.coli JM109/pMD18-T/unsA₂阳性重组菌的筛选

[0103] 菌落PCR可不必提取基因组DNA,而直接以菌体热解后暴露的DNA为模板进行PCR扩增,该方法操作简便、快捷、可以快速鉴定菌落是否为含有目的质粒的阳性菌落,在转化鉴定中较为常见。实验中,将接种到液体培养基中对应的单菌落进行菌落PCR,以验证是否转入目的基因。首先,用牙签挑取单菌落加入含50 μ L无菌水的1.5mL离心管中,沸水浴30min,然后离心以上清作为模板,进行PCR扩增,PCR程序设定为Taq酶扩增一般程序。最后采用0.9%的琼脂糖凝胶电泳检测菌落PCR产物。

[0104] 7、脂肪-酰基-辅酶A合酶重组质粒pMD18-T/unsA₁和pMD18-T/unsA₂的测序

[0105] 对菌落PCR检测出的阳性重组菌液体LB培养基培养过夜后,取4mL菌液提取质粒,方法按AxyPrep质粒DNA小量试剂盒提供的操作说明。测序由上海桑尼生物科技有限公司完成。经测序验证,序列SEQ ID No.2和SEQ ID No.4已分别重组至pMD18-T/unsA₁和pMD18-T/unsA₂中。

[0106] 8、脂肪-酰基-辅酶A合酶重组表达质粒pET-28a/unsA₁和pET-28a/unsA₂的构建

[0107] 实验根据外源基因在大肠杆菌中表达的原则,以及表达载体pET-28a和脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA基因酶切位点比对情况,确定了unsA₁用EcoRI/HindIII双酶切位点,unsA₂用BamHI/HindIII双酶切位点,并对重组大肠杆菌E.coli JM109/pMD18-T/unsA₁和E.coli JM109/pMD18-T/unsA₂进行液体LB试管摇床培养、重组质粒提取。

[0108] 脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA基因的重组质粒pMD18-T/unsA₁和pMD18-T/unsA₂及表达载体pET-28a分别用EcoRI/HindIII和BamHI/HindIII限制性内切酶在37 $^{\circ}$ C分别酶切处理6h,酶切体系如下所示:

[0109] EcoRI (BamHI) /HindIII双酶切体系:

体系组成	体积
载体/目的基因	25 μ L
10 \times Tango Buffer	5 μ L
[0110] <i>EcoR</i> I (<i>Bam</i> HI)	1 μ L
<i>Hind</i> III	1 μ L
ddH ₂ O	18 μ L
总体系	50 μ L

[0111] 酶切结束后65 $^{\circ}$ C灭活15min,然后分别用Axygen DNA凝胶回收试剂盒进行回收、纯化。

[0112] 脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA基因及表达载体pET-28a经双酶切、纯化后再用T4连接

酶16℃连接过夜,构建重组表达质粒pET-28a/unsA,其构建过程见图8,构建得到的重组表达质粒pET-28a/unsA₁,pET-28a/unsA₂图谱见图9。连接体系组成如下:

[0113] 连接体系:

	体系组成	体积
	表达载体 pET-28a	5μL
[0114]	目的基因	12μL
	10×Ligation Buffer	2μL
	T4 DNA Ligase	1μL
	总体系	20μL

[0115] 9、脂肪-酰基-辅酶A合酶重组表达质粒的转化以及阳性单克隆的筛选

[0116] 将构建好的表达质粒热激转化至E.coli BL21宿主菌中,然后涂布到含有卡那霉素(Kan)抗性的LB琼脂平板上,37℃培养过夜。从平板上随机挑选单菌落,以各功能基因的引物进行PCR扩增,挑选阳性克隆。

[0117] 10、脂肪-酰基-辅酶A合酶重组菌的诱导表达

[0118] 将鉴定为阳性的单克隆接种于5mL含有Kan抗性的LB液体培养基中,37℃、250r/min培养过夜。取1mL培养物,将其转接于50mL含有Kan抗性的LB液体培养基中37℃、250r/min培养至菌体浓度OD₆₀₀约为0.6~0.8左右。向培养物中分别加入一定浓度的IPTG诱导培养8h。收集菌体供电泳分析以及酶活检测。

[0119] 11、脂肪-酰基-辅酶A合酶重组菌表达产物SDS-PAGE分析

[0120] 以转入空载体的E.coli BL21菌及未加入诱导剂IPTG的重组菌作为对照。鉴定为阳性的重组菌经IPTG诱导培养8h后,取0.5mL诱导培养物,离心收集菌体,重悬于50μL蒸馏水中,加入50μL上样缓冲液,混匀后煮沸10min,进行SDS-PAGE电泳分析,图10中的“A”泳道即为重组菌E.coli BL21/pET-28a/unsA₁表达的脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁(经测序验证其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示)的SDS-PAGE图,“B”泳道即为重组菌E.coli BL21/pET-28a/unsA₂表达的脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₂(经测序验证其氨基酸序列如SEQ ID No.3所示)的SDS-PAGE图。

[0121] 12、脂肪-酰基-辅酶A合酶重组菌的蛋白活性检测

[0122] (1) 脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁的蛋白活性检测

[0123] 酶液制备:称取收集的重组菌E.coli BL21/pET-28a/unsA₁0.5g用磷酸盐缓冲液(50mM、pH8.0)15mL悬浮,超声破碎(功率350W、破碎2s、间隔2s、共超声破碎5min)。

[0124] 脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁转化体系:在50mL转化瓶中加入E.coli BL21/pET-28a/unsA₁超声破碎菌体各10mL、0.1g乙酰辅酶A,0.1g酰基-载体蛋白,30℃、150r/min转化,转化结束后,离心取上清备以后续检测。

[0125] 检测方法:气相色谱条件:30m×0.32mm×0.25mm弹性石英毛细管柱;柱初温柱初温190℃,保温1min,以6℃/min升温至230℃,然后恒温;气化室温度250℃;载气为高纯He(99.999%);柱前压62.6KPa;载气流速1.4mL/min;进样量1μL;分流比60:1。质谱条件:离子源为EI源;离子源温度230℃;四极杆温度150℃;电子能量70eV;接口温度260℃;溶剂延迟2min;质量范围10-550u。

[0126] 经过上述的色谱条件检测和计算,得出以下结论:脂肪-酰基-辅酶A合酶重组菌所表达的脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₁的最大比酶活(Specific Activity)为4mol/min/mg,底物转化率为82.53%。

[0127] (2) 脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₂的蛋白活性检测

[0128] 酶液制备:称取收集的重组菌E.coli BL21/pET-28a/unsA₂0.5g用磷酸盐缓冲液(50mM、pH8.0)15mL悬浮,超声破碎(功率350W、破碎2s、间隔2s、共超声破碎5min)。

[0129] 脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₂转化体系:在50mL转化瓶中加入E.coli BL21/pET-28a/unsA₂超声破碎菌体各10mL、0.1g乙酰辅酶A,0.1g酰基-载体蛋白,30℃、150r/min转化,转化结束后,离心取上清液以后续检测。

[0130] 检测方法:气相色谱条件:30m×0.32mm×0.25mm弹性石英毛细管柱;柱初温柱初温190℃,保温1min,以6℃/min升温至230℃,然后恒温;气化室温度250℃;载气为高纯He(99.999%);柱前压62.6KPa;载气流速1.4mL/min;进样量1μL;分流比60:1。质谱条件:离子源为EI源;离子源温度230℃;四极杆温度150℃;电子能量70eV;接口温度260℃;溶剂延迟2min;质量范围10-550u。

[0131] 经过上述的色谱条件检测和计算,得出以下结论:脂肪-酰基-辅酶A合酶重组菌所表达的脂肪-酰基-辅酶A合酶unsA₂的最大比酶活(Specific Activity)为4.5mol/min/mg,底物转化率为84.73%。

SEQUENCE LISTING

<110> 浙江工业大学
杭州中美华东制药有限公司

<120> 冬虫夏草中国被毛孢合成乙酸的酶、基因及其应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 258

<212> PRT

<213> Hirsutella Sinensis

<400> 1

Met Ala Met Thr Phe Glu Thr Val Ala Thr Asp Ser Ser Ile Lys Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ile Phe Lys Asp Ile Asn Glu Ser Thr Thr Ser Tyr Thr Tyr
 20 25 30

Arg Ser Pro Thr Gly Leu Leu Ser Ala Thr Gln Phe Thr Gln Pro Ala
 35 40 45

[0001]

Leu Thr Leu Met Glu Lys Ala Ser Phe Glu Asp Met Lys Ala Lys Gly
 50 55 60

Leu Val Pro Arg Asp Ser Thr Phe Ala Gly His Ser Leu Gly Glu Tyr
65 70 75 80

Ser Ala Leu Ala Ala Leu Ala Asp Val Met Pro Ile Glu Ser Leu Val
 85 90 95

Ser Val Val Phe Tyr Arg Gly Leu Thr Met Gln Val Ala Val Glu Arg
 100 105 110

Asp Ala Ser Gly Arg Ser Asn Tyr Ser Met Cys Ala Val Asn Pro Ser
 115 120 125

Arg Ile Ser Lys Thr Phe Asn Glu Glu Ala Leu Gln Phe Val Val Asn
 130 135 140

Asn Ile Ala Glu Glu Thr Gly Trp Leu Leu Glu Ile Val Asn Tyr Asn
145 150 155 160

Ile Ala Asn Met Gln Tyr Val Cys Ala Gly Asp Leu Arg Ala Leu Asp
 165 170 175

Thr Leu Ala Gly Val Thr Asn Phe Val Lys Lys Gln Gln Ile Asp Ile
 180 185 190

Glu Glu Met Arg Ser Asn Ile Glu Glu Ala Lys Gly Ala Leu Arg Glu
 195 200 205

Ile Ile Arg Gly Cys Ala Glu Ala Thr Leu Arg Lys Pro Gln Pro Leu
 210 215 220

Glu Leu Asp Arg Gly Phe Ala Thr Ile Pro Leu Arg Gly Ile Asp Val
 225 230 235 240

Pro Phe His Ser Thr Phe Leu Arg Ser Gly Val Lys Pro Phe Arg Ser
 245 250 255

Phe Leu

<210> 2
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Hirsutella Sinensis

<400> 2
 atggccatga ctttcgagac agtggcgacc gacagctcca tcaagtcgga gcgcattctc 60
 aaggacatca acgagagcac gacttcgtac acgtaccggf cgccgacggg ettgctctcg 120
 gegaocgagt tcacgcagcc cgcgctcacg ctcattgaaa aggccagctt cgaggacatg 180
 aaagccaagg gectcgttcc cagagacagc actttgccc ggcatteget gggcgagiac 240
 tcggcgctgg ccgcgctggc cgatgtgatg ccgattgagt cgetcgtctc tctctcttcc 300
 [0002] tatecgggct tgaccatgca agtggcggtc gaacgagatg ccagcggccg gtccaattac 360
 tcgatgtgcg ccgtgaacc cagccgcata tccaagacgt taacgagga ggcgctgcag 420
 tttgctgta acaacatcgc cgaggagact ggggtgctct tggagattgt caactacaac 480
 attgccaaca tgcagctacgt gtgcgcgggc gacttgaggg cgctcgacac gctggetggc 540
 gtgaccaact ttgtcaagaa gcagcaaatc gacattgagg agatgaggag caacattgag 600
 gaggccaagg gggctttgag agagattatc cgcggatgag cagaggcgac gctcaggaag 660
 ccgcagccgc tggagctgga ccgagggctc gcgacgattc cctfctgagg catgacgtg 720
 cccctccact cgacctttt gcgatcgggc gteaaccct tccggtcatt cctgtga 777

<210> 3
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Hirsutella Sinensis

<400> 3

Met Tyr Gly Thr Gly Thr Gly Pro Gln Thr Gly Leu Ser Thr Pro Arg
 1 5 10 15

Ser Asn Asn Ser Leu Arg Pro Leu Thr Leu Ile His Gly Ser Leu Glu
 20 25 30

Thr Ser Phe Leu Val Pro Thr Ser Leu His Phe His Ala Ser Gln Leu
 35 40 45
 Lys Asp Arg Phe Val Ala Ser Leu Pro Ala Ala Thr Asp Glu Leu Ala
 50 55 60
 Gln Asp Asp Glu Pro Ser Ser Val Pro Glu Leu Val Ala Arg Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gly Phe Val Ala Arg Glu Val Glu Asp Gly Glu Asp Asp Thr Gln Gly
 85 90 95
 Ser Tyr Glu Glu Val Leu Lys Leu Val Leu Asn Glu Phe Glu Arg Ala
 100 105 110
 Phe Leu Arg Gly Asn Glu Ala His Ala Ile Ala Ala Thr Leu Pro Gly
 115 120 125
 Ile Glu Ala Lys Lys Leu Glu Val Ile Arg Ser Tyr Tyr Leu Ala Arg
 130 135 140
 Ala Val Ser Asn Arg Thr Ile Lys Pro His Glu Ser Ala Leu Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Ser Asp Asp Gly Ser Ala Glu Ile Tyr Thr Ile Phe Gly Gly Gln
 165 170 175
 Gly Asn Ile Glu Glu Tyr Phe Glu Glu Leu Arg Glu Ala Phe Gln Thr
 [0003] 180 185 190
 Tyr Pro Ser Phe Val Gly Glu Leu Ile Thr Ser Ala Ala Glu Gln Leu
 195 200 205
 Gln Thr Leu Ser Asn His Pro Ser Ala Glu Lys Met Phe Pro Lys Gly
 210 215 220
 Leu Asp Ile Met Ser Trp Leu Gln His Pro Asp Ser Thr Pro Asp Val
 225 230 235 240
 Glu Tyr Leu Ile Ser Ala Pro Val Ser Phe Pro Leu Ile Ser Leu Val
 245 250 255
 Gln Met Ala His Tyr Glu Val Ala Cys Lys Val Leu Gly Ile Asp Pro
 260 265 270
 Gly Gln Phe Arg Glu Arg Ile Ser Gly Thr Thr Gly His Ser Gln Gly
 275 280 285
 Ile Val Arg Pro Ala Ala Thr Ala Ala Ala Asp Ser Trp Asp Ser Trp
 290 295 300
 Arg Ala Ile Val Ser Ser Thr Leu Ala Ile Leu Phe Trp Ile Gly Thr
 305 310 315 320
 Arg Ser Gln Gln Ala Phe Pro Thr Thr Ser Met Thr Pro Thr Met Leu
 325 330 335

Arg Glu Ser Met Asp Asn Gly Glu Gly Ser Pro Thr Pro Met Leu Ser
 340 345 350
 Ile Arg Asp Leu Ser Gln Gln Glu Val Gln Lys His Ile Asp Ala Thr
 355 360 365
 Asn Gln Tyr Leu Pro Ser His Arg His Ile Ser Val Ser Leu Val Asn
 370 375 380
 Ser Pro Arg Asn Leu Val Val Thr Gly Pro Pro Thr Ser Leu Tyr Gly
 385 390 395 400
 Leu Asn Ser Gln Leu Arg Lys Val Lys Ala Pro Thr Gly Leu Asp Gln
 405 410 415

Thr Met

<210> 4
 <211> 1254
 <212> DNA
 <213> Hirsutella Sinensis

[0004]

<400> 4
 atgtacggca cgggaaccgg cctcagaagc gggctttcca ctcccagatc caacaactct 60
 ctccgacct tgacctgat tcatggctcc ctgaaaagc ccttctctgt cccgaccage 120
 ctccactcc acgctceca gctaaaagac cgettctgtg cgagcttgc ccgcccaca 180
 gacgagcttg cccaggatga cgagccatcg tccgtcccgc agctggctgc aagataccta 240
 ggcttctgtg cccgcgaggt ggaagatgga gaagacgata cccagggtc ctacgaggag 300
 gtttcaaac ttgtctcaa cgagttttag agagccttc tccgcccga tgagcccac 360
 gccatgccg ccacgtccc gggaatcgag gccaagaagc tcgaggtgat tgcagctac 420
 tatcttccc gggccgtct caatcggacc atcaagctc acgagtcgc ctgtctcgg 480
 gcttccgacg atggctccgc cgaatctac accatcttg cgggtcaggg aaacattgag 540
 gagtacttg aggagctcg cgaggcttt cagacgtacc ccagcttctg cggcgagctc 600
 atcacctcg ccgcccagca actccagacg ctatcgaatc atcccagcgc cgaaaagatg 660
 ttcccgaagg gtcttgacat catgagctgg ctccagcacc cagactccac cccggatgct 720
 gactacctga tctcggcacc ggtcagcttc ccctgatca gcttgggtgca gatggcgcac 780
 tacgaggttg cttgcaaggt tctcggcacc gaccgggccc aattccggga gcgcatcagt 840
 ggcaccaccg gacattcaca gggcattgct agcccgcgc cgaccctgc cggcgactcc 900
 tgggattctg ggcgcgcaat cgtcagctcg accctcgcga tecttctctg gatcggcaca 960
 cgaagccagc aggcgtttcc caccacctcc atgacgccga ccatgttgcg tgaattatg 1020

	gacaatggcg agggctcccc tacgcccattg cttagcattc gegatctgtc gcagcaagag	1080
	gtgcaaaagc acatcgatgc caccaaccag tacctcccaa gccaccgtca catcagcgtg	1140
[0005]	tcgctcgtca acagccctcg caatcttgtc gtgacgggtc cccccacgtc gctctacggt	1200
	ctgaattegc agctgcgcaa agtcaaggcc cccacaggcc ttgaccagac gatg	1254

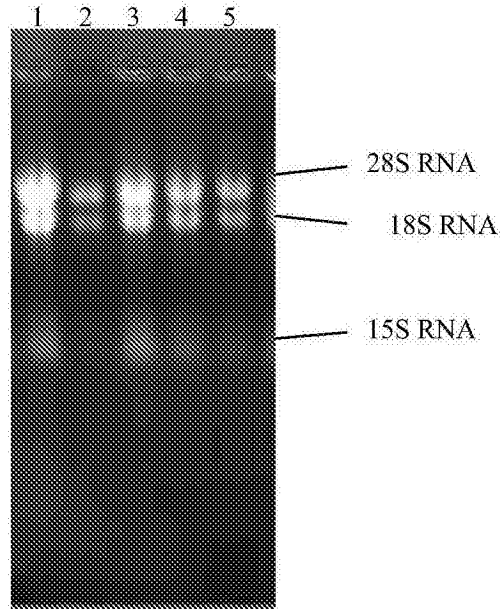


图1

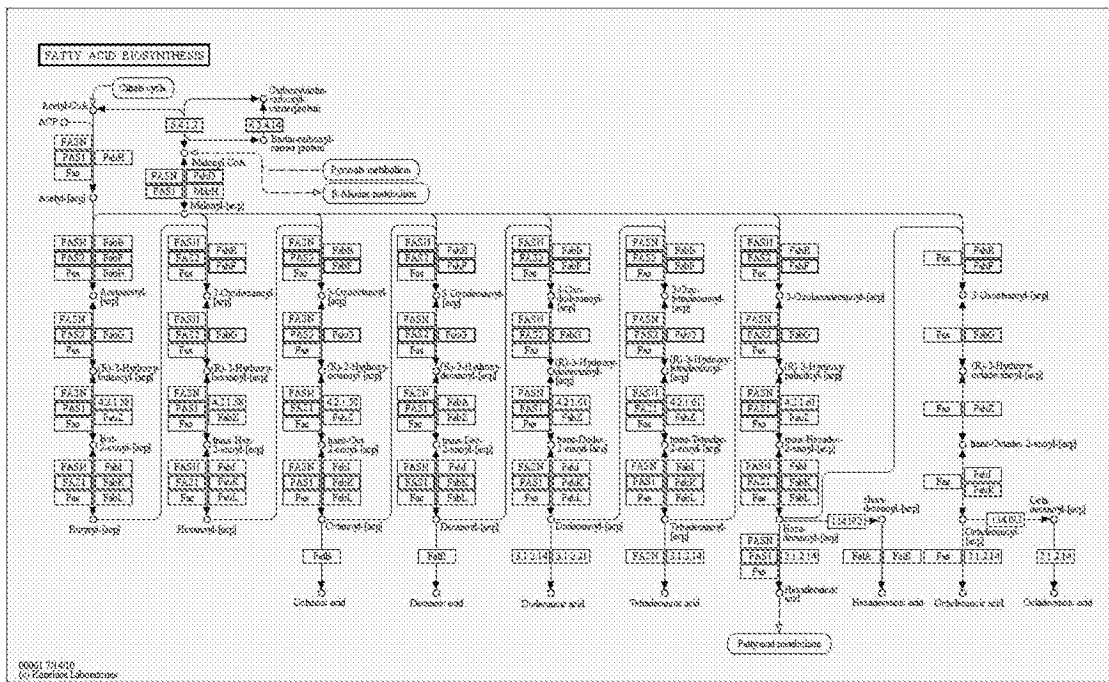


图2

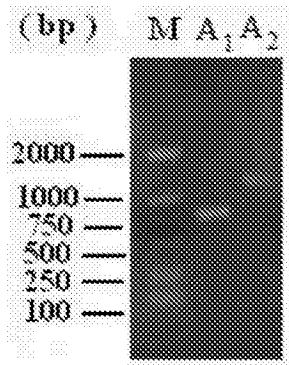


图5

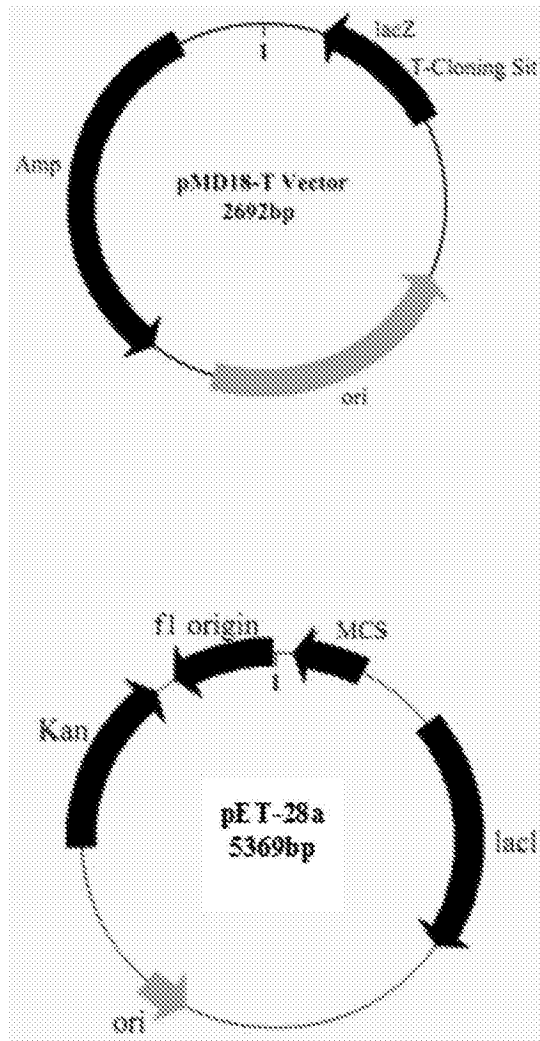


图6

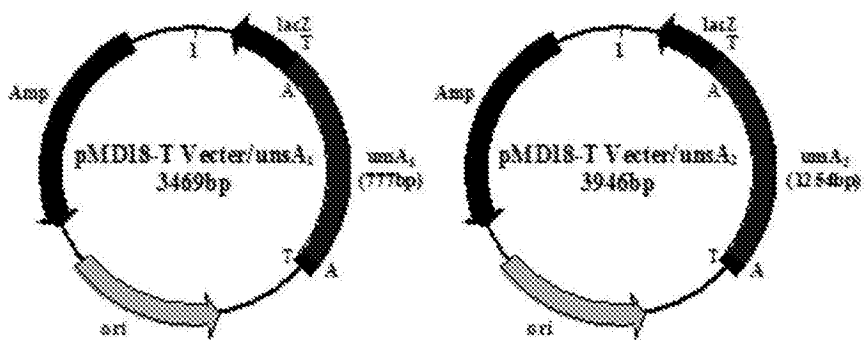


图7

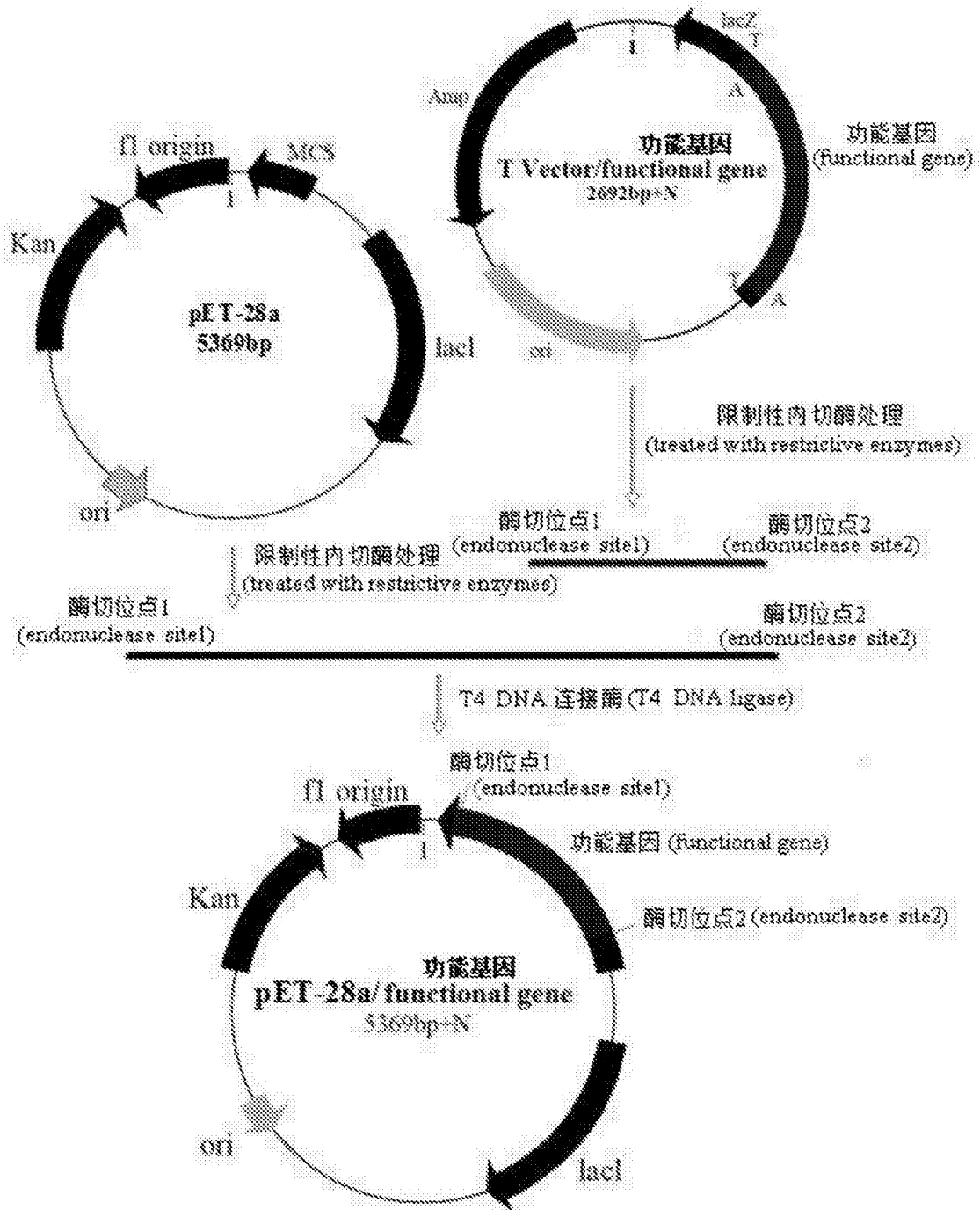


图8

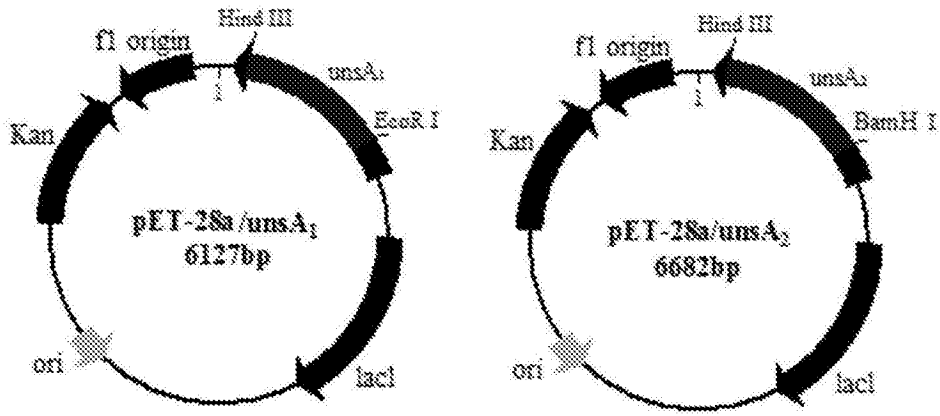


图9

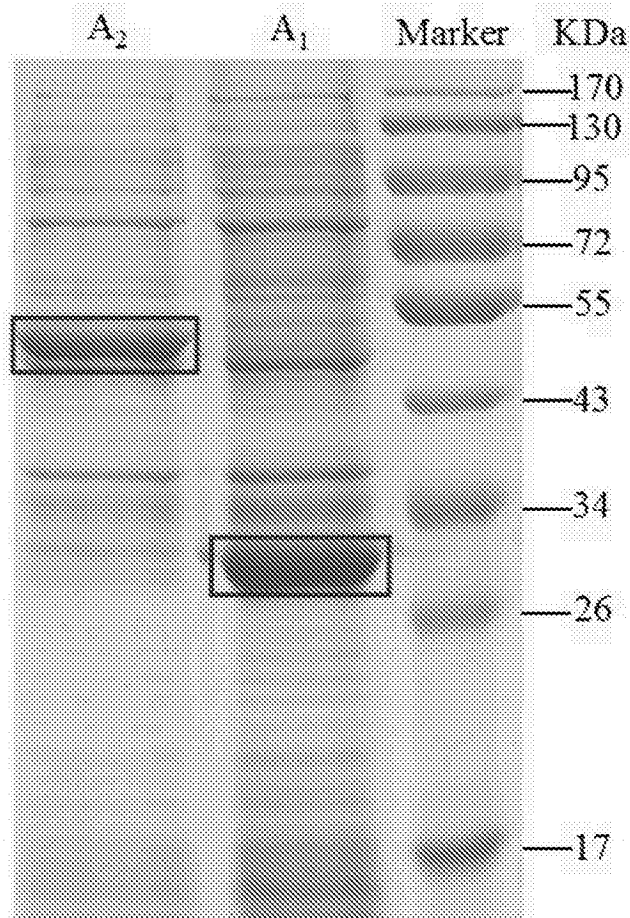


图10