



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104120112 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201410305802.3

C12N 1/21(2006.01)

(22)申请日 2014.06.30

C12P 7/40(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

(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

专利权人 杭州中美华东制药有限公司

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

(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 9/04(2006.01)

C12N 15/53(2006.01)

## (56)对比文件

CN 102373190 A,2012.03.14,说明书第43段.

朱国萍.大肠杆菌异柠檬酸脱氢酶分子进化机制的普遍性研究.《第四届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会论文集》.2012,38-39.

Hu,X., et al..GenBank accession number: EQL00885.1.《GenBank》.2013,1.

审查员 李艳丽

权利要求书1页 说明书11页  
序列表3页 附图4页

## (54)发明名称

冬虫夏草3-异丙基苹果酸脱氢酶B、编码基因及其应用

## (57)摘要

本发明提供了一种来自冬虫夏草中国被毛孢参与生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸的3-异丙基苹果酸脱氢酶B、编码基因及其应用,所述3-异丙基苹果酸脱氢酶B氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,编码基因如SEQ ID No.1所示;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3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的表达,赋予宿主3-异丙基苹果酸脱氢酶B的高表达性,为扩大3-异丙基苹果酸脱氢酶B的生物应用提供了有效途径,具有重大应用前景。

1. 一种冬虫夏草3-异丙基苹果酸脱氢酶B,其特征在於所述脱氢酶B的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

2. 如权利要求1所述的冬虫夏草3-异丙基苹果酸脱氢酶B在生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸中的应用。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在於所述的应用为:以冬虫夏草含3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组工程菌经诱导培养获得的湿菌体用pH8.0磷酸盐缓冲液悬浮,超声破碎后,将破碎混合液离心,取上清液为催化剂,以3-异丙基苹果酸水溶液为底物,以辅酶I为辅助底物,于Tris-HCl缓冲液中,37℃、150rpm条件下反应,反应结束后,将反应液离心,取上清液即获得含4-甲基-2-氧代戊酸的混合液,将混合液分离纯化,获得4-甲基-2-氧代戊酸。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在於:所述底物3-异丙基苹果酸水溶液浓度为0.1M,所述反应体系中底物的初始浓度为0.02M,所述催化剂的体积用量以超声破碎前湿菌体质量计为0.01g/L,所述辅酶I的终浓度为10g/L。

5. 如权利要求3所述的应用,其特征在於所述催化剂按如下方法制备:将含3-异丙基苹果酸脱氢酶B的重组工程菌接种于含终浓度50 $\mu$ g/ml的Kan抗性的LB液体培养基中,37℃、250r/min培养过夜,取培养物,以体积浓度2%的接种量转接于含有终浓度50 $\mu$ g/ml Kan抗性的LB液体培养基中,37℃、250r/min培养至菌体浓度OD600为0.6~0.8,向培养物中加入终浓度0.05mmol/L的IPTG诱导培养8h,收集湿菌体,将湿菌体在功率40%、破1s停1s条件下超声破碎,取细胞破碎混合液离心,取上清液即为催化剂。

6. 一种编码权利要求1所述3-异丙基苹果酸脱氢酶B的基因。

7. 如权利要求6所述的基因,其特征在於所述基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

8. 如权利要求6或7所述的基因在构建能够生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸的基因工程菌中的应用。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在於所述的应用为:构建含有所述3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的重组载体,将所述重组载体转化至大肠杆菌中,获得的重组基因工程菌进行诱导培养,培养液分离纯化获得含有3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的菌体细胞。

## 冬虫夏草3-异丙基苹果酸脱氢酶B、编码基因及其应用

### (一)技术领域

[0001] 本发明涉及来自“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢的3-异丙基苹果酸脱氢酶B(3-isopropylmalate dehydrogenase)、编码基因及其应用。

### (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] 但是,对冬虫夏草中国被毛孢中3-异丙基苹果酸脱氢酶B的研究几乎为空白,以及对3-异丙基苹果酸脱氢酶B在中国被毛孢中生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸的作用的研究。

[0005] 3-异丙基苹果酸脱氢酶(IPMDH, EC:1.1.1.85)是生物合成亮氨酸中的一个关键酶,是一种以 $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 为受体、作用于供体 $\text{CH-OH}$ 基团上的氧化还原酶。这种酶能催化以下酶促反应: $(2R,3S)\text{-3-异丙基苹果酸} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons 4\text{-甲基-2-氧代戊酸} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$ ,此反应实际上由两步组成: $(2R,3S)\text{-3-异丙基苹果酸} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons (2S)\text{-2-异丙基-3-氧代琥珀酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 和 $(2S)\text{-2-异丙基-3-氧代琥珀酸} \rightleftharpoons 4\text{-甲基-2-氧代戊酸} + \text{CO}_2$ ,亦即上述第一步反应的产物可通过第二步反应自发脱羧产生4-甲基-2-氧代戊酸。

[0006] 1981年,Tanaka等人从极端嗜热菌*Thermus thermophilus* HB8中克隆到了一个3-异丙基苹果酸脱氢酶,并且用pBR322作为载体克隆到大肠杆菌中。携带重组质粒的大肠杆菌的3-异丙基苹果酸脱氢酶酶活是野生型菌株的7倍。

[0007] 1986年,Kazuhiro Hamasawa等人从产朊假丝菌的基因文库中克隆到一个3-异丙基苹果酸脱氢酶基因,利用质粒pYKL30克隆到大肠杆菌和酿酒酵母中。这个基因的开放读码框大小为1089bp,编码363个氨基酸残基。Southern杂交证实,该片段是从三产朊假丝菌而得。

[0008] 1991年,H Kirino等人从极端嗜热菌*Thermus aquaticus* YT-1中克隆到了一个3-

异丙基苹果酸脱氢酶1euB,并且在大肠杆菌中进行了表达,它包含1035bp,编码344个氨基酸残基的开放阅读框。和嗜热菌*T.thermophilus* HB8的3-异丙基苹果酸脱氢酶的核苷酸序列具有87.0%同源性,氨基酸序列具有91.3%同源性。

[0009] 1992年,Mats Ellerström等人从互补的酵母突变株1eu2中克隆到了一个3-异丙基苹果酸脱氢酶基因,这个基因编码一个52kDa大小的蛋白,其具有推定的叶绿体转运肽。在体外由蛋白质导入到叶绿体中,与之同时蛋白裂解。

[0010] 2011年,Sikdar等人从水稻的基因组中克隆得到了一个3-异丙基苹果酸脱氢酶基因,该基因的开放读码框能编码389个氨基酸,对应于约41.2kD的蛋白质。这个水稻来源的3-异丙基苹果酸脱氢酶的氨基酸序列与植物和细菌来源的3-异丙基苹果酸脱氢酶氨基酸序列高度同源。

[0011] 但是,目前NCBI数据库中目前还检索不到中国被毛孢中3-异丙基苹果酸脱氢酶B的基因相关信息。

### (三)发明内容

[0012] 本发明目的是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3-异丙基苹果酸脱氢酶B在生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸进行深入研究,提供了“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢的一种3-异丙基苹果酸脱氢酶B、编码基因及其应用。

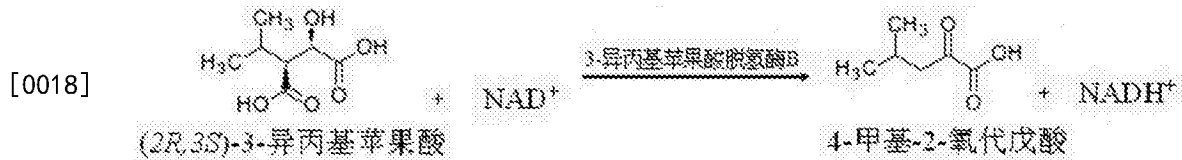
[0013] 本发明采用的技术方案是:

[0014] 本发明提供一种来自冬虫夏草中国被毛孢参与生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸的3-异丙基苹果酸脱氢酶B,其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示(记为isoB蛋白)。

[0015] SEQ ID No.1序列如下:MATVQSDLFK PAKFGGKYTV TLIPGDGIGA EVAESVKTVF KADNVPVEWE QIAVSGLEDEA GSGRTDEAFR ESVASLKRNK LGLKGILHTP ISRSGHQSFN VAMRQELDIY ASISLIKNMP GYETRHRGVD LCIIRENTEG EYSGLEHQS SV PGVVESLKII TRAKSERIAR FAFALANG RQKVTCIHKA NIMKLADGLF RNTFHAVAKE YPTLEVNDMI VDNASMQAVS RPQQFDVMVM PNLVYGGILSN IGAALVGGPG IVPGCNRARD MPVFEPACRH VGLDIKGDQ ANPTAMVLSG SMLLRHLGLD DPANRISKAM Y\*

[0016] 由于氨基酸序列的特殊性,任何含有SEQ ID NO.1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。

[0017] 本发明还涉及所述的3-异丙基苹果酸脱氢酶B在生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸中的应用。由3-异丙基苹果酸经过3-异丙基苹果酸脱氢酶B的催化获得对应4-甲基-2-氧代戊酸的路径如下所示:



[0019] 具体,所述3-异丙基苹果酸脱氢酶B在生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸中的应用为:以含冬虫夏草3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组工程菌经诱导培养获得的湿菌体用磷酸盐缓冲液(50mM、pH8.0)悬浮,超声破碎后,将破碎混合液离心,取上清液为催化剂,以3-异丙基苹果酸水溶液为底物,以辅酶I(即NADH)为辅助底物,于pH自然的Tris-HCl缓冲液中,37℃、150rpm条件下反应,反应结束后,将反应液离心,取上清液即获得含有4-甲基-2-氧代戊酸的混合液,将混合液分离纯化即获得4-甲基-2-氧代戊酸;所述分离纯化的方法为本领域公知操作,通常采用亲和层析方法;所述混合液采用高效液相色谱检测混合液中产物,流动相:V(乙腈):V[pH3.0(0.86%)磷酸三乙胺]=55:45,波长237nm,柱温:25℃,流量1mL/min;进样体积:20μL,溶剂:乙腈,色谱柱:Diamondsil250mm×4.6mm C18柱,仪器:岛津LC-20AT高效液相色谱仪。

[0020] 所述催化剂的制备方法为:将含3-异丙基苹果酸脱氢酶B的重组工程菌接种于含有Kan抗性(终浓度50μg/ml)的LB液体培养基中,37℃、250r/min培养过夜。取1mL培养物,将其转接(体积浓度接种量为2%)于50mL含有Kan抗性(终浓度50μg/ml)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,向培养物中加入一定浓度(终浓度0.05mmol/L)的IPTG诱导培养8h,收集湿菌体,将湿菌体在功率40%、破1s停1s条件下超声破碎3次,每次5min,取细胞破碎混合液离心,取上清液即为催化剂。

[0021] 一个酶活性单位(U)定义为:3-异丙基苹果酸脱氢酶B在37℃条件下,1min催化3-异丙基苹果酸生成1μmol的4-甲基-2-氧代戊酸所需的酶量。

[0022] 所述底物3-异丙基苹果酸水溶液的浓度为0.1M,所述底物的初始浓度为0.02M,所述催化剂的体积用量以超声破碎前湿菌体质量计为10g/L(终浓度),所述辅酶I的终浓度为0.01g/L。

[0023] 本发明还涉及编码所述3-异丙基苹果酸脱氢酶B的基因。具体的,所述基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示(记为isoB基因,isoB基因编码isoB蛋白)。

[0024] 由于核苷酸序列的特殊性,任何SEQ ID NO.2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。

[0025] 所述的编码3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因在构建能够生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸的基因工程菌中的应用,以扩大3-异丙基苹果酸脱氢酶B的应用,具体为:构建含有所述3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的重组载体,将所述重组载体转化至大肠杆菌(优选E.coli BL21(DE3))中,获得的重组基因工程菌进行诱导培养,培养液分离纯化获得含有3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的菌体细胞。

[0026] 本发明的要点在于提供了SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列和SEQ ID NO.2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。

[0027] 能够提供本发明所述冬虫夏草3-异丙基苹果酸脱氢酶B及其编码基因的菌株为中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)L0106,该菌种保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC No:M2011278,已在先前申请的专利CN102373190A中披露。

[0028] 本发明的有益效果主要体现在:本发明从原理上对3-异丙基苹果酸脱氢酶B在中国被毛孢中生物催化3-异丙基苹果酸制备4-甲基-2-氧代戊酸的过程进行了详细研究,提供了“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢的3-异丙基苹果酸脱氢酶B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,通过调节蛋白水解酶基因的表达,赋予宿主3-异丙基苹果酸脱氢酶B的高表达性,为扩大3-异丙基苹果酸脱氢酶B的生物应用提供了有效途径,具有重大应用前景。

#### (四)附图说明

- [0029] 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;  
[0030] 图2为亮氨酸代谢途径及3-异丙基苹果酸脱氢酶所在的催化过程注释图;  
[0031] 图3为3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因PCR扩增产物凝胶电泳图;  
[0032] 图4为克隆载体pMD18-T Vector与表达载体pET-28a物理图谱;  
[0033] 图5为重组克隆质粒pMD18-T/isoB物理图谱;  
[0034] 图6为重组表达质粒pET-28a/isoB构建过程示意图;  
[0035] 图7为重组表达质粒pET-28a/isoB物理图谱;  
[0036] 图8为3-异丙基苹果酸脱氢酶B蛋白的SDS-PAGE图。

#### (五)具体实施方式

[0037] 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:

[0038] 实施例1:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢的培养

[0039] 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:M2011278,已在先前申请的专利CN102373190A中披露。

[0040] 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。

[0041] 实施例2:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢总RNA的提取

[0042] 用TRIzol试剂提取总RNA,步骤具体为:

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 3)RNA沉淀:加入500μL异丙醇,在冰上静置10min,4℃、12000rpm离心10min,弃上清。

[0046] 4)RNA洗涤:加入1mL75%(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。

[0047] 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。

[0048] 实施例3:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢RNA样品测序

[0049] 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。

[0050] 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

[0051] 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。

[0052] 实施例5:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢Unigene功能注释

[0053] 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。

[0054] 实施例6:亮氨酸代谢途径及3-异丙基苹果酸脱氢酶B作用的分析

[0055] 图2是亮氨酸代谢途径及3-异丙基苹果酸脱氢酶B所在的催化步骤和过程注释图,首先,丙酮酸在乙酰乳酸合酶的催化作用下合成(S)-2-乙酰乳酸,然后在酮醇酸还原异构酶的作用下合成3-羟基-3-甲基-2-氧代丁酸,经过5步催化反应后生成(2R,3S)-3-异丙基苹果酸,在3-异丙基苹果酸脱氢酶B的催化作用下生成4-甲基-2-氧代戊酸,最后在亮氨酸脱氢酶的作用下催化生成L-亮氨酸。从中国被毛孢转录组测序以及注释信息中检测到了3-异丙基苹果酸脱氢酶B的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)并得到了相应的蛋白质序列(SEQ ID No.1)。

[0056] 实施例7:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因引物设计

[0057] 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亮氨酸的3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因,引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,引物序列如下所列:

[0058] isoB基因:正向引物5'AGAGAATTCATGGCGACGGTGCAGTCGGA3'

[0059] 反向引物5'ATAGCGGCCGCTTAGTACATGGCCTTGAG3'

[0060] isoB基因长度为966bp。

[0061] 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

[0062] 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。

[0063] 采用PrimeScript1st 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:

[0064] 1)在Microtube管中配制下列混合液。

	dNTP Mixture (10 mM each)	1 $\mu$ L
[0065]	Oligo dT Primer (2.5 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
	Total RNA	0.5 $\mu$ g
	RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ L

[0066] 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:

[0067] 65 $^{\circ}$ C,5min



- [0068] 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。  
[0069] 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	10 $\mu$ L
	5 $\times$ PrimeScript Buffer	4 $\mu$ L
[0070]	RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
	PrimeScript RTase (for 2 Step)	0.5 $\mu$ L
	RNase Free dH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ L
	Total Volume	20 $\mu$ L

- [0071] 5)在PCR仪上按下列条件进行反转录反应。

[0072] 42 $^{\circ}$ C 15~30min

[0073] 70 $^{\circ}$ C 15min

[0074] 一般情况,在真核生物mRNA3'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(PrimeScript1st 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。实施例9:“百令”生产菌冬虫夏草中国被毛孢3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的克隆、表达以及蛋白活力的检测

[0075] 1、3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的PCR扩增

[0076] 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3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因引物:5'AGAGAATTTCATGGCGACGGTGCAAGTCGGA3'和5'ATAGCGGCCGCTTAGTACATGGCCTTGAG3'进行Pfu DNA聚合酶PCR扩增反应,条件设置如下:

[0077] Pfu PCR扩增反应体系:

	体系构成	体积 ( $\mu$ L)
	无核酸水	85
	10 $\times$ 缓冲液	10
[0078]	4 $\times$ dNTP	1
	正向引物 (50 $\mu$ M)	1
	反向引物 (50 $\mu$ M)	1
	cDNA 第一链 (50ng/ $\mu$ l)	1
	Pfu	1
[0079]	总体系	100

[0080] Pfu DNA Ploymerase PCR扩增条件:

	步骤	温度 (°C)	时间	
	1	94	5 min	
[0081]	35	94	45 s	
	2	退火	55-68	1 min
		延伸	72	2 min
	3	后延伸	72	20 min

[0082] 2、3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因PCR产物凝胶电泳检测

[0083] 具体检测方法为：

[0084] 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；

[0085] 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；

[0086] 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；

[0087] 4)取5μL样品(即步骤1获得的PCR扩增产物)，然后加入6×Loading Buffer1.5μL和ddH<sub>2</sub>O4μL混合后用移液枪上样，上样量为10μL；

[0088] 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；

[0089] 6)开启电源，开始电泳，最高电压不超过5V/cm；

[0090] 7)当样品跑过胶板的2/3时可终止电泳；

[0091] 8)切断电源后，将凝胶取出，放入凝胶成像仪中观察、拍照。

[0092] 转录组测序，预测3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的大小为966bp，琼脂糖凝胶电泳结果表明已成功扩增出了3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因，大小约为1000bp。图3为“百令”生产菌中国被毛孢3-异丙基苹果酸脱氢酶B功能基因PCR产物凝胶电泳图。

[0093] 3、3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因PCR产物的加碱基A处理以及纯化

[0094] 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 (μL)
	胶回收产物	25
[0095]	10×Taq DNA Polymerase Buffer	5
	4×dNTPs (20 mmol/50 μL 反应体系)	2
	Taq DNA Polymerase (5 U/μL)	1
	无菌水	17
[0096]	总体系	50

[0097] PCR仪中72℃加A碱基20min，最后用AxyPrep PCR清洁试剂盒纯化。

[0098] 4、3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因与克隆载体的连接

[0099] 克隆载体pMD18-T Vector购自TaKaRa公司(TaKaRa code D101A),其物理图谱见图4,将步骤3纯化后的3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因与克隆载体连接,构建重组质粒pMD18-T/isoB,物理图谱见图5,连接体系和连接条件如下。

		体系构成	体积 ( $\mu\text{L}$ )
[0100]	连接体系:	T Vector	1
		T4 DNA Ligase	1
		目的基因	3
		2×Buffer	5
		总体系	10

[0101] 连接条件:16°C,16h;灭活:65°C,15min。

[0102] 5、3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组质粒pMD18-T/isoB的转化

[0103] 将重组质粒pMD18-T/isoB转入大肠杆菌*E. coli* JM109中,构建携带3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的重组菌*E. coli* JM109/pMD18-T/isoB,具体步骤为:1)将10 $\mu\text{L}$ 反应体系(即步骤4获得的连接产物)转至感受态细胞*E. coli* JM109中,冰浴30min;2)热击:42°C,90s;3)冰浴:2~3min;4)加入800 $\mu\text{L}$  LB液体培养基,37°C,250rpm,1h;5)涂布LB平板(含Amp抗性,终浓度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ );6)37°C培养箱培养过夜。

[0104] LB液体培养基组成:胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,氯化钠5g/L,溶剂为水,pH自然;LB平板为LB液体培养基+终浓度15g/L琼脂。

[0105] 6、3-异丙基苹果酸脱氢酶B *E. coli* JM109/pMD18-T/isoB阳性重组菌的筛选

[0106] 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 $\mu\text{L}$ 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。

[0107] 7、3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组质粒pMD18-T/isoB的测序

[0108] 对菌落PCR检测出的阳性重组菌LB液体培养基,37°C、150rpm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已重组至pMD18-T/isoB中。

[0109] 8、3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组表达质粒pET-28a/isoB的构建

[0110] 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3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因酶切位点比对情况,确定了isoB用EcoRI/NotI双酶切位点,并对重组大肠杆菌*E. coli* JM109/pMD18-T/isoB进行液体LB试管摇床培养、重组质粒提取。

[0111] 3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因的重组质粒pMD18-T/isoB及表达载体pET-28a分别用EcoRI/NotI限制性内切酶在37°C分别酶切处理6h,酶切体系如下所示:

[0112] EcoRI/NotI双酶切体系:

	体系组成	体积
	载体/目的基因	25 $\mu$ L
	10 $\times$ Tango Buffer	5 $\mu$ L
[0113]	<i>EcoR</i> I	1 $\mu$ L
	<i>Not</i> I	1 $\mu$ L
	ddH <sub>2</sub> O	18 $\mu$ L
	总体系	50 $\mu$ L

[0114] 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。

[0115] 3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因及表达载体pET-28a经双酶切、纯化后再用T4连接酶16 $^{\circ}$ C连接过夜,构建重组表达质粒pET-28a/isoB,其构建过程见图6,构建得到的重组表达质粒pET-28a/isoB图谱见图7。连接体系组成如下:

[0116] 连接体系:

	体系组成	体积
	表达载体 pET-28a	5 $\mu$ L
	目的基因	12 $\mu$ L
[0117]	10 $\times$ Ligation Buffer	2 $\mu$ L
	T4 DNA Ligase	1 $\mu$ L
	总体系	20 $\mu$ L

[0118] 9、3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组表达质粒的转化以及阳性单克隆的筛选

[0119] 将构建好的表达质粒热激转化至*E. coli* BL21(DE3)宿主菌中,然后涂布到含有卡那霉素(Kan)抗性(终浓度50 $\mu$ g/ml)的LB平板上,37 $^{\circ}$ C培养过夜。从平板上随机挑选单菌落,以步骤7中合成的3-异丙基苹果酸脱氢酶B基因引物进行PCR扩增,挑选阳性克隆。

[0120] 10、3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组菌的诱导表达

[0121] 将鉴定为阳性的单克隆接种于5mL含有Kan抗性(终浓度50 $\mu$ g/ml)的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250r/min培养过夜。取1mL培养物,将其转接于50mL含有Kan抗性(终浓度50 $\mu$ g/ml)的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250r/min培养至菌体浓度OD<sub>600</sub>约为0.6~0.8左右。向培养物中分别加入一定浓度(终浓度0.05mmol/L)的IPTG诱导培养8h。收集菌体电泳分析以及酶活检测。

[0122] 11、3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组菌表达产物SDS-PAGE分析

[0123] 以转入空载体的*E. coli* BL21(DE3)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7h后,取0.5mL诱导培养物,离心,收集菌体,重悬于50 $\mu$ L蒸馏水中,加入50 $\mu$ L上样缓冲液,混匀后煮沸10min,进行SDS-PAGE电泳分析,图8中的“A”泳道为大肠杆菌BL21(DE3)空细胞的SDS-PAGE图,“B”泳道为重组菌*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a加IPTG诱导后的SDS-PAGE图,“C”泳道为重组菌*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a/isoB未加IPTG的对照SDS-PAGE图,“D”泳道即为重组菌*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a/isoB诱导表达的

SDS-PAGE图。表明重组菌E.coli BL21(DE3)/pET-28a/isoB中含有3-异丙基苹果酸脱氢酶B(经测序验证其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示)。

[0124] 12、3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组菌的蛋白活力检测

[0125] 酶液制备:称取步骤10收集的重组菌E.coli BL21(DE3)/pET-28a/isoB2g,用磷酸盐缓冲液(50mM、pH8.0)100mL悬浮,高压破碎仪(型号FS-600,上海生析超声仪器有限公司)在功率40%、破1s停1s条件下破碎3次(35Kpa),每次5min,离心除去菌体,收集上清液即得到粗酶液84.2ml。

[0126] 3-异丙基苹果酸脱氢酶B转化体系:准备一个洁净的50mL转化瓶,分别加入E.coli BL21(DE3)/pET-28a/isoB粗酶液2mL,0.1M的3-异丙基苹果酸水溶液1mL,Tris-HCl缓冲液(pH7.0)1mL和0.05g/L的辅酶I1mL。37℃、150rpm条件下反应1h,反应结束后,将反应液离心,取上清液检测4-甲基-2-氧代戊酸的含量。

[0127] 高效液相色谱检测产物4-甲基-2-氧代戊酸的含量,流动相:V(乙腈):V[pH3.0(0.86%)磷酸三乙胺]=55:45,波长237nm,柱温:25℃,流量1mL/min;进样体积:20uL,溶剂:乙腈,色谱柱:Diamondsil250mm×4.6mm C18柱,仪器:岛津LC-20AT高效液相色谱仪。

[0128] 一个酶活性单位(U)定义为:3-异丙基苹果酸脱氢酶B在37℃条件下,1min催化3-异丙基苹果酸生成1μmol的4-甲基-2-氧代戊酸所需的酶量。

[0129] 检测3-异丙基苹果酸脱氢酶B酶活的空白对照为煮沸20min后失活的粗酶液替代酶液。另外,同样条件下也检测了E.coli BL21(DE3)和E.coli BL21(DE3)/pET-28a诱导后的粗酶液的活力,均未检测到3-异丙基苹果酸脱氢酶B酶活。

[0130] 利用考马斯亮蓝法测得3-异丙基苹果酸脱氢酶B粗酶液中的蛋白含量为0.285mg/mL,通过Bandscan软件,对SDS-PAGE中的粗酶液条带含量进行分析,3-异丙基苹果酸脱氢酶B占总蛋白的16.5%,故参与催化反应的3-异丙基苹果酸脱氢酶B为 $0.285\text{mg/mL} \times 2\text{mL} \times 0.165 = 0.094\text{mg}$ 。根据酶活定义,3-异丙基苹果酸脱氢酶B的最大比酶活为: $81.4\mu\text{mol}/(0.094\text{mg} \times 60\text{min}) = 14.4\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min} = 14.4\text{U}/\text{mg}$ 。因此,上述3-异丙基苹果酸脱氢酶B重组菌所表达的3-异丙基苹果酸脱氢酶B的最大比酶活为25.8U/mg,上述反应的转化率为81.4%。比酶活计算公式为:比酶活=酶活/酶的蛋白总量。转化率计算公式为:转化率=(初始浓度-平衡浓度)/初始浓度。

## 说明书核苷酸和氨基酸序列表

## 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 3-异丙基苹果酸脱氢酶 B、编码基因及其应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 321

<212> PRT

<213> *Hirsutella sinensis*

<400> 1

Met Ala Thr Val Gln Ser Asp Leu Phe Lys Pro Ala Lys Phe Gly Gly  
1                   5                   10                   15

Lys Tyr Thr Val Thr Leu Ile Pro Gly Asp Gly Ile Gly Ala Glu Val  
                  20                   25                   30

Ala Glu Ser Val Lys Thr Val Phe Lys Ala Asp Asn Val Pro Val Glu  
                  35                   40                   45

[0001]

Trp Glu Gln Ile Ala Val Ser Gly Leu Asp Glu Ala Gly Ser Gly Arg  
50                   55                   60

Thr Asp Glu Ala Phe Arg Glu Ser Val Ala Ser Leu Lys Arg Asn Lys  
65                   70                   75                   80

Leu Gly Leu Lys Gly Ile Leu His Thr Pro Ile Ser Arg Ser Gly His  
                  85                   90                   95

Gln Ser Phe Asn Val Ala Met Arg Gln Glu Leu Asp Ile Tyr Ala Ser  
                  100                   105                   110

Ile Ser Leu Ile Lys Asn Met Pro Gly Tyr Glu Thr Arg His Arg Gly  
115                   120                   125

Val Asp Leu Cys Ile Ile Arg Glu Asn Thr Glu Gly Glu Tyr Ser Gly  
130                   135                   140

Leu Glu His Gln Ser Val Pro Gly Val Val Glu Ser Leu Lys Ile Ile  
145                   150                   155                   160

Thr Arg Ala Lys Ser Glu Arg Ile Ala Arg Phe Ala Phe Ala Phe Ala  
                  165                   170                   175

Leu Ala Asn Gly Arg Gln Lys Val Thr Cys Ile His Lys Ala Asn Ile  
180                   185                   190

Met Lys Leu Ala Asp Gly Leu Phe Arg Asn Thr Phe His Ala Val Ala  
195                   200                   205

Lys Glu Tyr Pro Thr Leu Glu Val Asn Asp Met Ile Val Asp Asn Ala  
 210 215 220

Ser Met Gln Ala Val Ser Arg Pro Gln Gln Phe Asp Val Met Val Met  
 225 230 235 240

Pro Asn Leu Tyr Gly Gly Ile Leu Ser Asn Ile Gly Ala Ala Leu Val  
 245 250 255

Gly Gly Pro Gly Ile Val Pro Gly Cys Asn Arg Ala Arg Asp Met Pro  
 260 265 270

Val Phe Glu Pro Ala Cys Arg His Val Gly Leu Asp Ile Lys Gly Lys  
 275 280 285

Asp Gln Ala Asn Pro Thr Ala Met Val Leu Ser Gly Ser Met Leu Leu  
 290 295 300

Arg His Leu Gly Leu Asp Asp Pro Ala Asn Arg Ile Ser Lys Ala Met  
 305 310 315 320

Tyr

- <210> 2
- <211> 966
- <212> DNA
- <213> *Hirsutella sinensis*

[0002]

<400> 2  
 atggcgacgg tgcagtcgga cctgttcaag ccggccaagt ttggcggcaa gtatcacgtg 60  
 acgetgatac cgggcgacgg catcggggcc gaggtggccg agtcggtaaa gacggtcttc 120  
 aaggccgaca acgtgccctg cgagtgggag cagatggccg tgtcgggctt cgacgagcgg 180  
 ggctcggggc gcaccgacga ggctctccgc gagagcgtcg cgtcgtctca ggcgaacaag 240  
 ctcggectca agggcatcct gcacacgccc atcagccgct cgggccacca gagctcaac 300  
 gtggccatgc gccaggagct cgacatatac gccagcatca gcctcatcaa gaacatgccc 360  
 ggctatgaga cgcgccaccg cggcgtgac ctgtgcatca tacggagaa cacagagggc 420  
 gactactcgg ggctcgagca ccagagcgtc cccggcgtcg tcgagtcgct caagatcatic 480  
 acgcgcgcaa agtcggagcg catcgcccgc ttgcctttg cctttgacct cgcaaacgge 540  
 cgccagaagg tgactgcat ccacaaggcg aacatcatga agctggccga cggcctgttc 600  
 cgcaaacagt tccacgccgt cgcaaaggag taccgacgc tcgaggtaaa cgacatgatt 660  
 gtcgacaacg cctcgtatga ggcccgtgct cggccccagc agttgacgt catggtcatg 720  
 cccaacctgt acggcggcat cctgtccaac attggcggcg cctcgtcggg cgggccccgc 780  
 atcgtccccg gctgcaacag ggccccgac atgcccgtct ttgagccccg ctgcgccac 840

	gtcggcctcg acatcaaggg caaggaccag gccaacccca cggccatggt gctctcgggg	900
	agcatgctgc tgcgccacct ggggctcgac gaccccgcca accgcctctc caaggccatg	960
	tactaa	966
	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> unkonw	
[0003]	<400> 3	
	agagaattca tggcgacggt gcagtcgga	29
	<210> 4	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> unkonw	
	<400> 4	
	atagcggccg cttagtacat ggccttgag	30



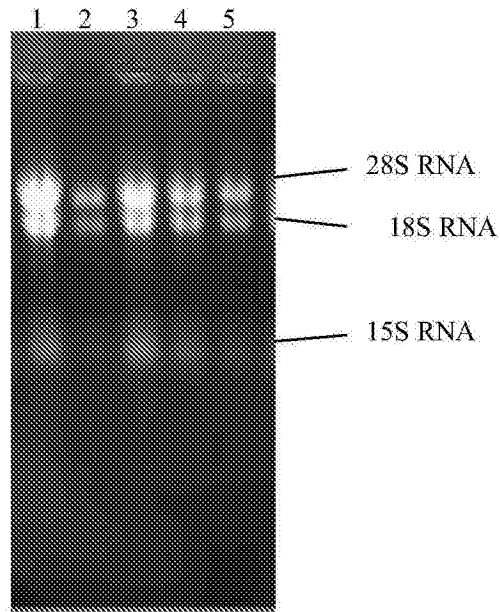


图1

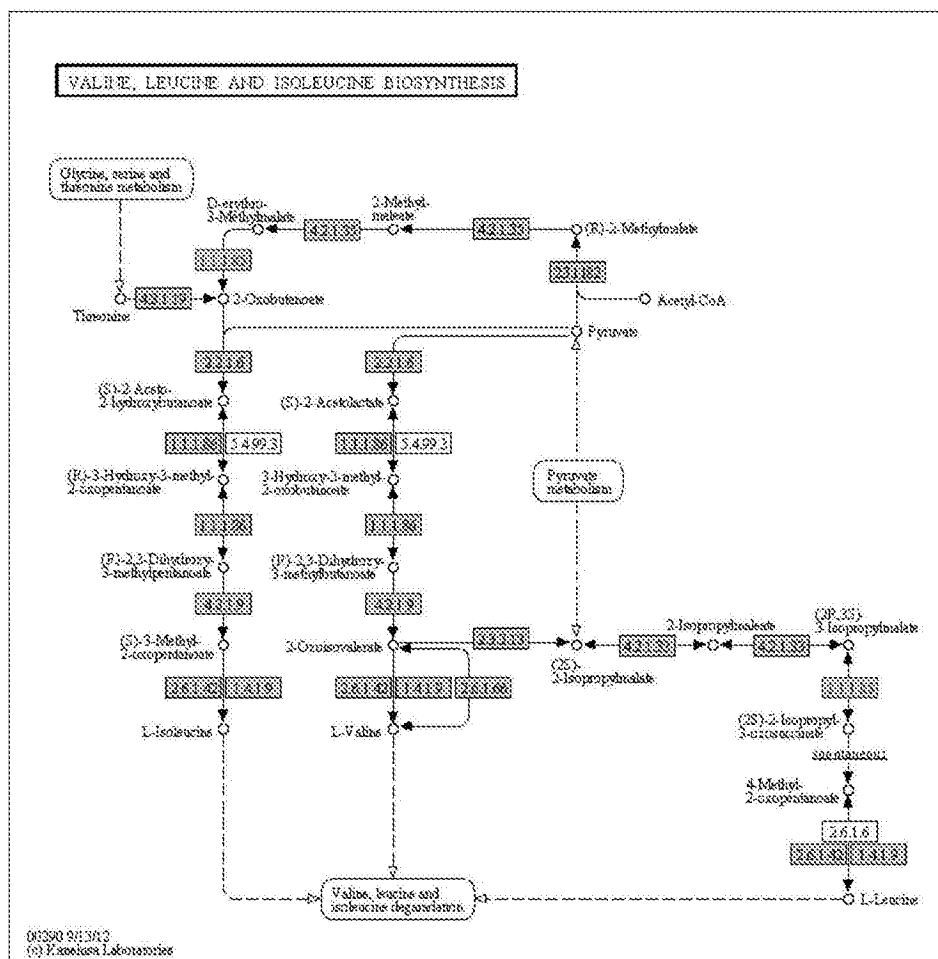


图2

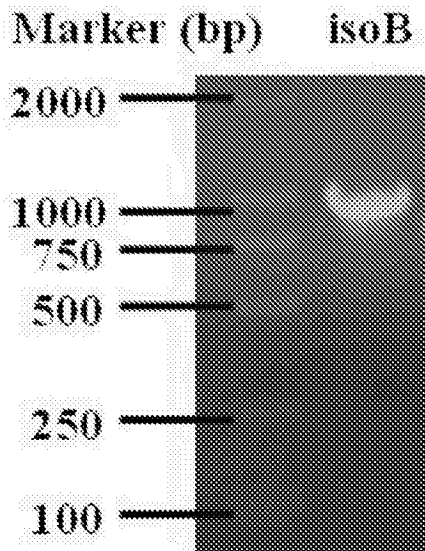


图3

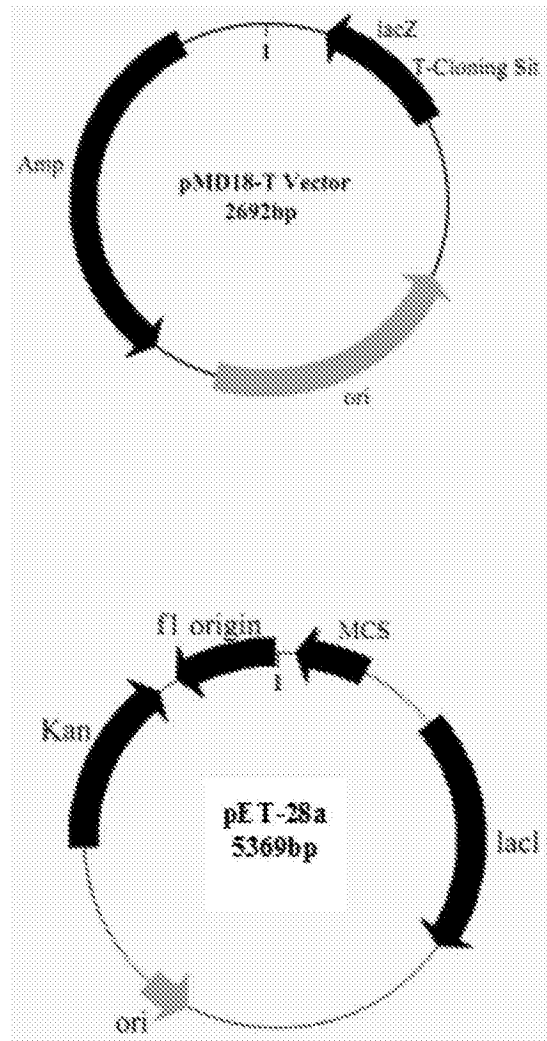


图4

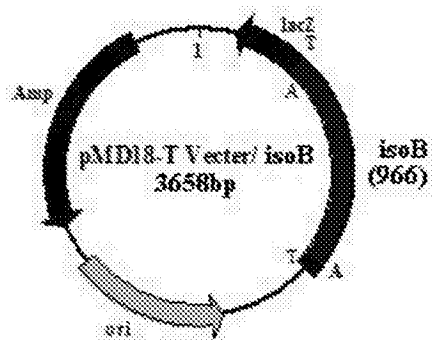


图5

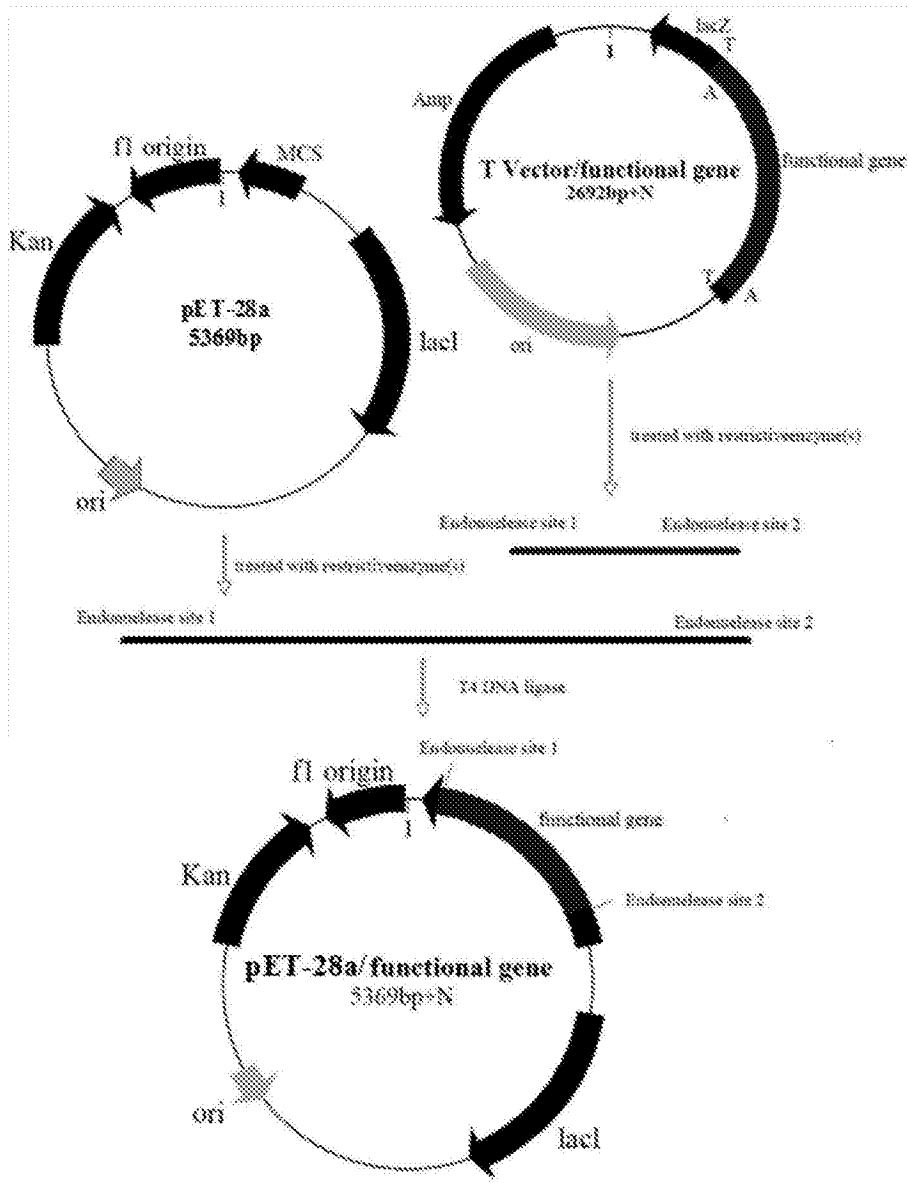


图6

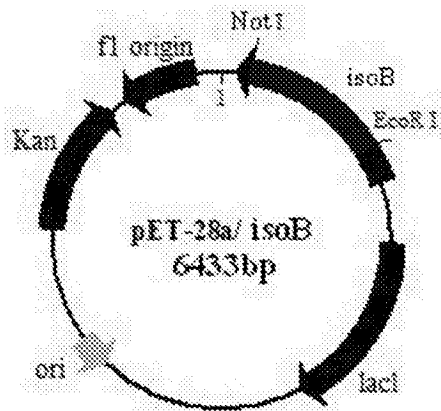


图7

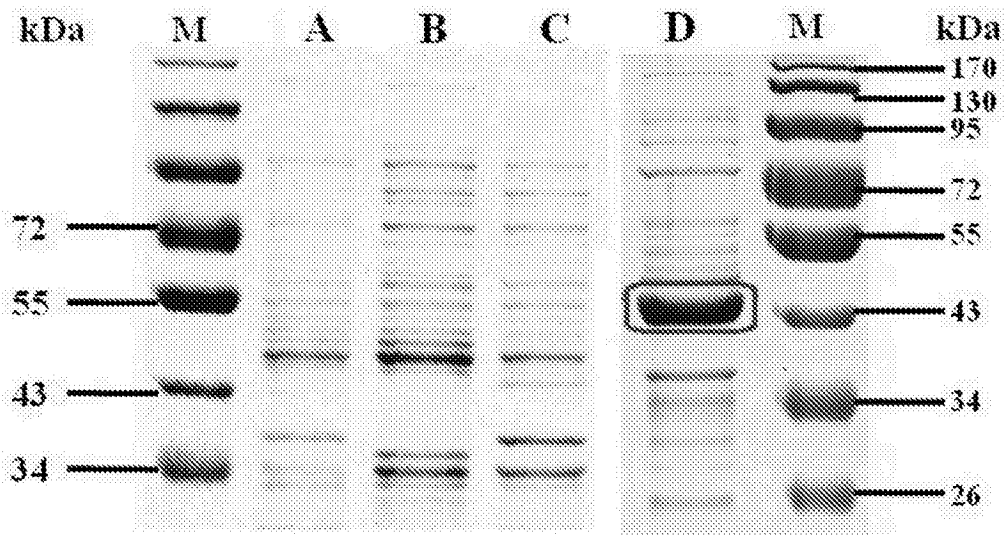


图8