



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113186183 B

(45) 授权公告日 2023.05.16

(21) 申请号 202110479022.0

A01H 6/82 (2018.01)

(22) 申请日 2021.04.30

A61K 31/015 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 31/045 (2006.01)

申请公布号 CN 113186183 A

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.07.30

C12R 1/19 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(56) 对比文件

(72) 发明人 黎胜红 刘燕 陈月桂 凌伊
刘艳春

CN 113015807 A, 2021.06.22

CN 109371020 A, 2019.02.22

CN 109735523 A, 2019.05.10

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 李博

CN 103923076 A, 2014.07.16

CN 101787007 A, 2010.07.28

(51) Int. Cl.

US 2018008717 A1, 2018.01.11

WO 2019046941 A1, 2019.03.14

US 2011111457 A1, 2011.05.12

CA 3126477 A1, 2020.07.23

(续)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/84 (2006.01)

C12P 5/00 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

审查员 刘波

权利要求书1页 说明书10页
序列表4页 附图3页

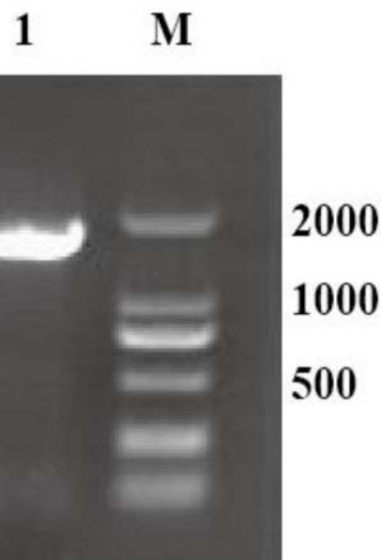
(54) 发明名称

性。

双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2、编码基因及其产物和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2、编码基因及其应用,涉及合成生物学和天然药物化学技术领域。本发明从唇形科植物米团花出发,克隆并功能鉴定了一个合成14-/18-元环萜类化合物的萜类合酶LcTPS2编码基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明构建的该基因工程细胞安全稳定,生产周期短,合成的大环二倍半萜产物具有抗炎和免疫抑制活性,对植物血凝素联合12-十四酸佛波酯-13-乙酸盐诱导Jurkat细胞系分泌IL-2,以及CD3、CD28单抗刺激小鼠T细胞生成细胞因子IFN-γ有明显抑制作用,但对Jurkat和脾细胞无明显细胞毒



CN 113186183 B

[接上页]

(56) 对比文件

张艺丹等.水稻二萜合成途径中代谢流调控机制研究进展.《植物生理学报》.2019,(第12期),

Fei Luo等.Characterization of a sesquiterpene cyclase from the glandular trichomes of *Leucosceptum canum* for sole production of cedrol in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*.《Phytochemistry》.2019,第162卷

Yue-Gui Chen等.A cryptic plant terpene cyclase producing unconventional 18- and 14-membered macrocyclic C25 and C20 terpenoids with immunosuppressive activity.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2021,第60卷

Chen,Y.G.等.sester/di-terpenoid synthase, partial [*Leucosceptum canum*].《Genbank database》.2021,

1. 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2, 其特征在于, 所述合酶LcTPS2为SEQ ID NO.1所示氨基酸序列构成的蛋白。

2. 权利要求1所述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2的编码基因, 其特征在于, 所述编码基因为SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

3. 含有权利要求2所述的双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的重组载体、表达盒、重组菌。

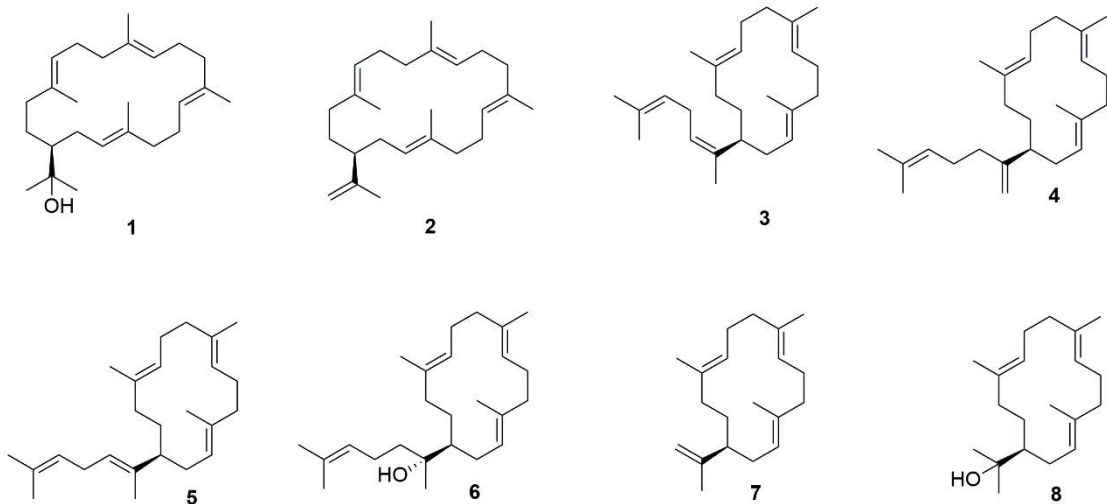
4. 一种含有14-/18-元大环萜类化合物发酵液的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

构建含权利要求2所述编码基因的重组载体, 将所述重组载体转化至大肠杆菌或酿酒酵母中, 发酵培养后即得所述发酵液。

5. 一种转基因植株的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

构建含权利要求2所述编码基因的重组载体, 将所述重组载体转化至植株中, 所得阳性植株即为所述转基因植株。

6. 权利要求1所述的双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2或权利要求2所述的双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因在制备具有下述1-8结构式的14-/18-元大环萜类化合物中的应用,



7. 权利要求6所述的14-/18-元大环萜类化合物在制备抗炎药物或免疫抑制药物中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述抗炎药物或免疫抑制药物包括细胞因子抑制剂。

9. 一种药物组合物, 包括药剂学上可接受的药物辅料和权利要求6所述14-/18-元大环萜类化合物中的一种或几种。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物包括片剂、胶囊剂、冲剂、口服液体剂、静脉注射剂或肌肉注射剂。

双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2、编码基因及其产物和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及合成生物学和天然药物化学技术领域,具体涉及双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2、编码基因及其产物和应用。

背景技术

[0002] 萜类化合物为种类最多、化学结构变化最为丰富的一类天然产物,广泛存在于高等植物和微生物中,具有重要的经济和药用价值。含有12元环及以上环状结构的大环萜类化合物是一类结构独特的萜类天然产物,通常具有显著的防御功能以及抗癌、抗白血病、抗炎和抗菌活性。

[0003] 近年来,研究人员采用功能基因组学和代谢组学技术对不同萜类的合成途径进行了深入研究,为萜类的合成生物学研究提供了大量的数据支撑。目前,已经通过合成生物学方法构建出萜类高产的酵母工程菌株,实现了多种目标产物的高效生产,有效提高了萜类的总体生产水平。因此,采用合成生物学策略合成萜类化合物,有望成为植物源萜类生产的有效技术手段。然而,目前尚未从任何生物中分离得到天然14-/18-元环二倍半萜,负责环合14-/18元环二倍半萜的萜类合酶编码基因及其应用尚未报道,其抗炎和免疫抑制活性也未见文献报道。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2、编码基因及其产物和应用,利用所述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因构建的基因工程细胞安全稳定,生产周期短,其大环二倍半萜产物具有抗炎和免疫抑制活性,能够在制备抗炎药物和免疫抑制药物中应用。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供了以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2,所述合酶LcTPS2为:

[0007] (1) SEQ ID NO.1所示氨基酸序列构成的蛋白;

[0008] (2) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列经取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基且功能相同的衍生蛋白。

[0009] 优选的,所述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2的编码基因为:

[0010] (a) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;

[0011] (b) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列经取代和/或缺失和/或添加一个或几个核苷酸且表达相同功能蛋白的核苷酸序列。

[0012] 本发明提供了含有上述的双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的重组载体、表达盒、转基因细胞株、重组菌。

[0013] 本发明还提供了一种含有14-/18-元大环萜类化合物发酵液的制备方法,包括如下步骤:

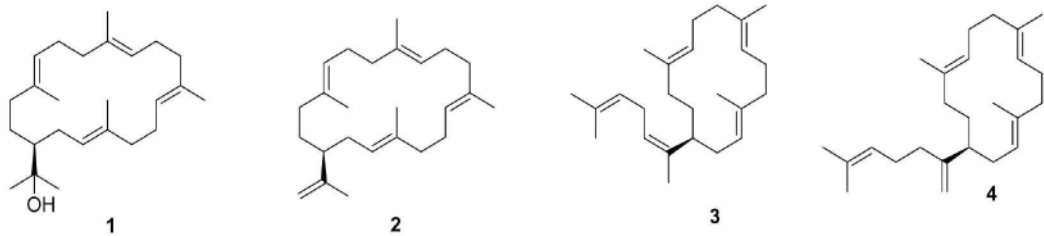
[0014] 构建含上述编码基因的重组载体,将所述重组载体转化至大肠杆菌或酿酒酵母

中,发酵培养后即得所述发酵液。

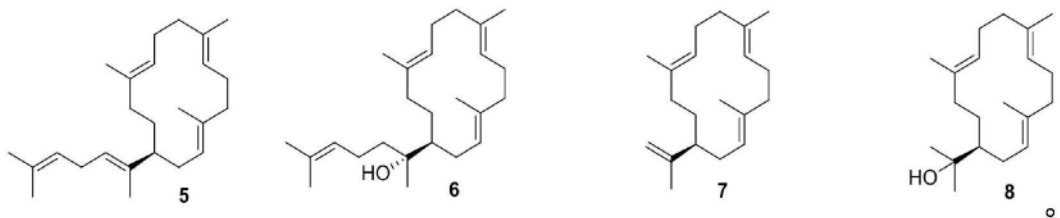
[0015] 本发明还提供了一种转基因植株的制备方法,包括如下步骤:

[0016] 构建上述编码基因的重组载体,将所述重组载体转化至植株中,所得阳性植株即为所述转基因植株。

[0017] 本发明还提供了上述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2或上述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因在制备具有下述1-8结构式的14-/18-元大环萜类化合物中的应用



[0018]



[0019] 本发明还提供了上述14-/18-元大环萜类化合物在制备抗炎药物或免疫抑制药物中的应用。

[0020] 优选的,所述抗炎药物或免疫抑制药物包括细胞因子抑制剂。

[0021] 本发明还提供了一种药物组合物,包括药剂学上可接受的药物辅料和所述14-/18-元大环萜类化合物中的一种或几种。

[0022] 优选的,所述药物组合物包括片剂、胶囊剂、冲剂、口服液体制剂、静脉注射剂或肌肉注射剂。

[0023] 本发明从唇形科植物米团花 (*Leucoscepttrum canum*) 出发,克隆并功能鉴定了一个合成14-/18-元环萜类化合物的萜类合酶LcTPS2编码基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。将该核苷酸序列与不同表达载体连接,构建成为能够在大肠杆菌、酿酒酵母、烟草中表达的重组质粒,再将重组质粒转化至大肠杆菌、酿酒酵母或本氏烟草中构建成为工程细胞,实现了大肠杆菌、酿酒酵母和本氏烟草异源合成14-/18-元环萜类化合物。本发明构建的该基因工程细胞安全稳定,生产周期短,显示出其在应用开发中的重大价值。本发明提供的双功能二倍半萜/二萜合酶的大环二倍半萜产物具有抗炎和免疫抑制活性,能够在制备抗炎药物和免疫抑制药物中应用。经实验表明,本发明提供的二倍半萜类化合物对植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 联合12-十四酸佛波酯-13-乙酸盐 (Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 诱导Jurkat细胞系分泌IL-2,以及CD3、CD28单抗刺激小鼠T细胞生成细胞因子IFN- γ 有明显抑制作用,但对Jurkat和脾细胞无明显细胞毒性。

附图说明

[0024] 图1为实施例1中双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的PCR琼脂糖凝胶电

泳图,其中M泳道为DL2000DNAMarker,泳道1为目的条带;

[0025] 图2为实施例2中表达双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的大肠杆菌表达质粒结构示意图;

[0026] 图3为实施例4中酶促反应产物的气相色谱-质谱(GC-MS)分析的总离子流图及酶促反应产物的质谱图;其中,a为LcTPS2以二萜前体(香叶基香叶基焦磷酸酯,geranylgeranyl diphosphate,GGPP)为底物时的总离子流图;b为LcTPS2以倍半萜前体(法尼基焦磷酸酯,farnesyl diphosphate,FPP)为底物时的总离子流图;c为LcTPS2以单萜前体(香叶基焦磷酸酯,geranyl diphosphate,GPP)为底物时的总离子流图;d为对照组的总离子流图;e为LcTPS2催化二萜前体合成的特异化合物的质谱图;

[0027] 图4为实施例5中表达双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的工程大肠杆菌提取物的GC-MS分析总离子流图;

[0028] 图5为实施例6中表达双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的烟草表达质粒结构示意图;

[0029] 图6为实施例6中瞬时表达双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的转基因烟草提取物的GC-MS分析总离子流图。

具体实施方式

[0030] 本发明提供了一种双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2,所述合酶LcTPS2为:(1)SEQ ID NO.1所示氨基酸序列构成的蛋白;或(2)SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列经取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基且功能相同的衍生蛋白。本发明中,所述蛋白能够催化香叶基香叶基焦磷酸酯和香叶基法尼基焦磷酸酯合成14-/18-元大环萜类。

[0031] 本发明提供了一种双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2的编码基因,所述编码基因为:(a)SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;或(b)SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列经取代和/或缺失和/或添加一个或几个核苷酸且表达相同功能蛋白的核苷酸序列。本发明中,所述SEQ ID NO.2所示编码基因的开放阅读框为1659bp,编码552个氨基酸,分子量大小为64.2kD,将其放在NCBI中进行BLASTN分析比对,结果显示与唇形科植物广藿香(*Pogostemon cablin*)的germacrene A synthase(PatTpsCF2)/AY508728.1的同源性为78.12%。

[0032] 本发明中,所述编码基因是从米团花中克隆获得的萜类合酶基因,其能够特异性催化二萜/二倍半萜的直接前体GGDP或香叶基法尼基焦磷酸酯(geranyl farnesyl diphosphate,GFPP)合成14-元二萜或14-/18-元二倍半萜,该基因是首次从植物中克隆得到,该酶的发现丰富了萜类合酶的多样性。本发明中,对所述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因cDNA序列的获取方法并没有特殊限定,采用本领域常规的cDNA获取方式即可。

[0033] 本发明提供了含有上述的双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的重组载体、表达盒、转基因细胞株、重组菌。

[0034] 本发明还提供了一种含有14-/18-元大环萜类化合物发酵液的制备方法,包括如下步骤:

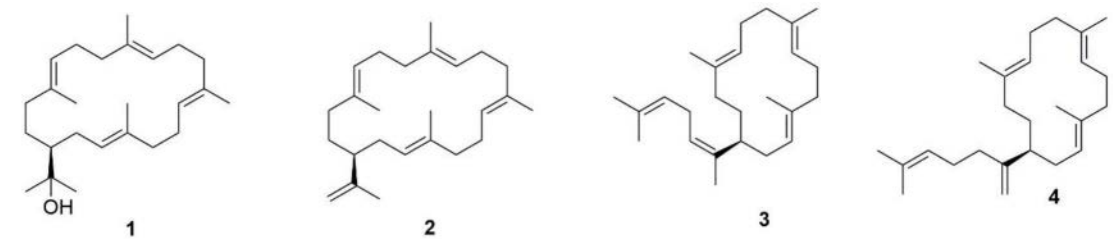
[0035] 构建含上述编码基因的重组载体,将所述重组载体转化至大肠杆菌或酿酒酵母中,发酵培养后即得所述发酵液。本发明中,对所述重组载体的基础载体并没有特殊限定,

本发明实施例中所述基础载体优选为pCold TF。本发明中,对所述大肠杆菌或酿酒酵母的种类并没有特殊限定,本发明的实施例中大肠杆菌优选为菌株Rosetta (DE3) 或大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株。本发明对所述构建重组载体以及转化的方法并没有特殊限定,采用本领域常规的方法即可。

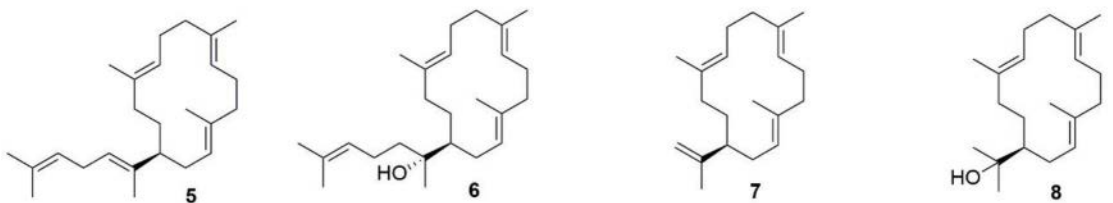
[0036] 本发明还提供了一种转基因植株的制备方法,包括如下步骤:

[0037] 构建上所述编码基因的重组载体,将所述重组载体转化至植株中,所得阳性植株即为所述转基因植株。本发明中,对所述重组载体的基础载体并没有特殊限定,本发明实施例中所述基础载体优选为双元载体pEAQ-HT。本发明对所述构建重组载体的方法并没有特殊限定,采用本领域常规的方法即可。本发明中,所述转化的方法并没有特殊限定,本发明实施例中所述转化优选为农杆菌转染。

[0038] 本发明还提供了上述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2或上述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因在制备具有下述1-8结构式的14-/18-元大环萜类化合物中的应用。



[0039]



[0040] 本发明中,所述14-/18-元大环萜类化合物优选为14-元二萜或14-/18-元二倍半萜。本发明中,所述双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2及其编码基因是通过特异性催化二萜/二倍半萜的直接前体GGDP或GFPP合成14-元二萜或14-/18-元二倍半萜。

[0041] 本发明还提供了上述14-/18-元大环萜类化合物在制备抗炎药物或免疫抑制药物中的应用。本发明中,所述14-/18-元大环萜类化合物优选为具有上述结构式1、结构式3、结构式5和结构式6的化合物。本发明中,所述抗炎药物或免疫抑制药物优选的包括细胞因子抑制剂。

[0042] 本发明还提供了一种药物组合物,包括药剂学上可接受的药物辅料和所述14-/18-元大环萜类化合物中的一种或几种。本发明中,所述药物组合物的剂型优选的包括片剂、胶囊剂、冲剂、口服液体制剂、静脉注射剂或肌肉注射剂。本发明对所述药物辅料并没有特殊限定,根据剂型采用本领域常规的药物辅料即可。

[0043] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,下面结合实施例对本发明进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0044] 下述实施例中,如无特殊说明,均为常规方法。

[0045] 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。

[0046] 实施例1

[0047] 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因cDNA序列的获取及生物信息学分析：

[0048] 根据分子克隆手册从米团花中获取RNA,利用SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit试剂盒中引物5'-CDS primer和SMART IITM A oligonucleotide,以及3'-CDS primer分别进行反转录合成cDNA,并以特异性引物对LcTPS2-3race-out、LcTPS2-3race-in和LcTPS2-5race-out、LcTPS2-5race-in为引物进行PCR扩增,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳得到附图1,对扩增产物进行回收纯化得到LcTPS2基因全长cDNA序列。

[0049]

引物	序列	编号
LcTPS2-3race-out	TCCGCAATGAAGGAAGACTTTGAATGGCTAA	SEQ ID NO.3
LcTPS2-3race-in	GTTATGAGGTTGAGAAGGAGAGGG	SEQ ID NO.4
LcTPS2-5race-out	CCCCTCTCCTTCTCAACCTCATAACTACC	SEQ ID NO.5
LcTPS2-5race-in	CCTTGCCAATTCCTTAAGTGCTTT	SEQ ID NO.6

[0050] 经分析,双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因的开放阅读框为1659bp(SEQ ID NO.2),编码552个氨基酸(SEQ ID NO.1),分子量大小为64.2kDa,该双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2基因编码的氨基酸序列包含典型的DDXXD和NSE/DTE保守基序。将双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因放在NCBI中运用BLASTN进行同源性搜索,该基因在核苷酸水平上进行分析比对,结果显示与唇形科植物广藿香(Pogostemon cablin)的germacrene A synthase(PatTpsCF2)/AY508728.1的同源性为78.12%。此外,通过Target P软件预测该候选的双功能二倍半萜/二萜合酶是一个含6个氨基酸转运肽的叶绿体靶向蛋白。

[0051] 实施例2

[0052] 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因表达载体构建：

[0053] 以实施例1合成的LcTPS2基因cDNA为模板,LcTPS2F:5'-GGTACCATGGCTGCTCCAATCTCTGCAAACC-3'(SEQ ID NO.7)和LcTPS2R:5'-CTGCAGCTAAATCTTAATTTGATCGATGAAC-3'(SEQ ID NO.8)为正反引物,利用高保真酶PrimeSTAR HS DNA Polymerase进行PCR扩增,PCR体系为50 μ L。

[0054] PCR扩增反应体系为：

[0055]

5 \times PrimeSTAR HS Buffer	10 μ L
dNTP Mixture(2.5mM each)	4 μ L
Primer F	1 μ L
Primer R	1 μ L
Template cDNA	0.5 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
去离子水	33 μ L

[0056] PCR扩增的反应程序为:98 $^{\circ}$ C 10sec,60 $^{\circ}$ C 15sec,72 $^{\circ}$ C 2min,35个循环。程序结束后进行产物回收纯化。

[0057] 纯化的产物和pCold TF载体均经限制性核酸内切酶KpnI和PstI双酶切,37 $^{\circ}$ C反应3h,1%琼脂糖凝胶电泳检测条带大小,并进行产物回收纯化。酶切后的PCR产物与载体pCold TF连接,即将双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因cDNA克隆到N末端含有HIS标签的pCold TF表达载体上的重组载体pCold TF/LcTPS2,其结构式意图如附图2所示。将

重组载体pCold TF/LcTPS2转化大肠杆菌DH5 α ,涂布在添加氨苄青霉素(100 μ g/mL)的LB固体平板进行筛选,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱过夜培养至长出单菌落,挑取单克隆进行PCR及酶切验证,选出阳性克隆进行DNA测序验证。

[0058] 实施例3

[0059] 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2的蛋白诱导表达及可溶性分析:

[0060] 挑取测序正确的重组pCold TF/LcTPS2菌株提取质粒,将质粒转化至大肠杆菌表达菌株Rosetta (DE3),利用添加氨苄青霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)的LB固体平板进行筛选,随机挑取单克隆进行菌落PCR验证,经验证正确的单克隆接种于6mL含氨苄青霉素和氯霉素抗性的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养过夜。活化后的菌按照1:100比例接种至100mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养至OD₆₀₀值约为0.5。取5mL菌液作为对照,剩余加入95 μ L 0.3mM IPTG,16 $^{\circ}$ C诱导过夜。配制相关蛋白纯化buffer,低温诱导的菌液经4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min,弃上清,沉淀加入7mL buffer1(20mM Tris-HCl pH8.0,500mM NaCl,10mM咪唑)重悬菌体;冰上超声破碎菌体10min;留取100 μ L作为对照,其余样品经4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min,转移上清,并加入500 μ L Ni-NTA Agarose(购自Qiagen公司),4 $^{\circ}$ C孵育1h;将含有Ni-NTA Agarose的蛋白液加入Polypropylene柱(购自Qiagen公司),分别以6mL buffer 1、6mL buffer 2(20mM Tris-HCl pH8.0,500mM NaCl,20mM咪唑)及3mL buffer 3(320mM Tris-HCl pH8.0,500mM NaCl,250mM咪唑)进行顺序洗脱,并同时收集洗脱液,buffer3洗脱液即为纯化后的蛋白,加入等体积甘油,混匀,-20 $^{\circ}$ C保存,以10%SDS-PAGE按照相关操作步骤进行蛋白可溶性分析,结果表明LcTPS2为可溶性蛋白,蛋白大小在95KDa~140KDa之间。

[0061] 实施例4

[0062] 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2的体外酶活测试及产物分析:

[0063] 配置反应液10 \times Reaction buffer:1mM Tris-HCl pH 7.4,50mM MgCl₂,1M KCl,20mM DTT,-20 $^{\circ}$ C保存。取纯化后的蛋白40 μ L,10 \times Reaction buffer 20 μ L,GPP或FPP或GGPP 10 μ L,去离子水补足至200 μ L,将各组分混匀,30 $^{\circ}$ C静置反应3h,加入等体积正己烷萃取3次,12000rpm离心10min,取有机相氮气浓缩至50 μ L,GC-MS检测得附图3。

[0064] GC-MS色谱条件:HP-5MS石英毛细管(30m \times 250 μ m \times 0.25 μ m);柱温程序设置:起始温度80 $^{\circ}$ C,保持0min;15 $^{\circ}$ C/min升温至220 $^{\circ}$ C,保持0min;再4 $^{\circ}$ C/min升温至270 $^{\circ}$ C,保持2min;以不分流模式进样,进样量为6 μ L,载气为氦气,氦气流量为3mL/min,柱前压为40KPa。

[0065] GC-MS质谱条件:离子源EI源,离子源温度250 $^{\circ}$ C,电子能量70eV,质量范围为35-550amu。

[0066] 由附图3可以看出,与对照组(d)相比,LcTPS2以二萜前体(香叶基香叶基焦磷酸酯)为底物时,合成1个特异成分(如a所示),对该特异成分进行质谱分析得到如e所示的质谱图,离子峰m/z 272表明该产物是二萜类化合物,进一步证明本发明所述LcTPS2是二萜合酶。而当LcTPS2以GPP和倍半萜前体FPP为前体时,未合成特异产物(分别如c和b所示),表明所述LcTPS2不具有合成单萜或倍半萜的功能。

[0067] 实施例5

[0068] 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2在大肠杆菌中的异源表达:

[0069] 将重组pCold TF/LcTPS2质粒与pET-MmGFDPS(产甲烷古菌GFPP合酶)、pBbA5c-

MevT-MBIS质粒(整合了甲戊二羟酸途径中负责将乙酰辅酶A逐步合成异戊烯基焦磷酸酯和二甲基烯丙基焦磷酸酯的7个基因以及FPP合酶基因)共同转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株,pColdTF质粒与pET-MmGFDPS、pBbA5c-MevT-MBIS质粒共同转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株为对照菌株,利用含氨苄青霉素(100 μ g/mL)、卡那霉素(50 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)的LB固体平板筛选转化菌落,挑取单克隆进行验证,将验证正确的单克隆接种到6mL含相同抗生素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm过夜培养,按照1:100再次接种到含相同抗生素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养至OD₆₀₀值约为0.5,加入0.3mM异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-Thiogalactoside, IPTG),18 $^{\circ}$ C诱导24h,温度调节至25 $^{\circ}$ C,继续培养3天,石油醚萃取,取有机层,减压蒸发浓缩,得到大肠杆菌体内酶活反应样品,利用GC-MS对样品进行分析检测得附图4,检测条件参见实施例4。

[0070] 其中,石油醚萃取物经硅胶柱层析,以石油醚乙酸乙酯(100:0,80:1,60:1,0:1)梯度洗脱,从60:1部分得到化合物8;100:0部分经硅胶柱层析,石油醚为流动相,依次得到化合物7,3,2,4和5;60:1部分进一步经硅胶柱层析(石油醚-乙酸乙酯60:1,v/v)、RP18柱色谱(甲醇-水75%,v/v)和薄层色谱(石油醚-乙酸乙酯5:1,v/v),得到化合物6;60:1部分经硅胶柱层析(石油醚-乙酸乙酯30:1,v/v)、RP18柱色谱(甲醇-水80%,v/v)和薄层色谱(石油醚-乙酸乙酯5:1,v/v),得到化合物1。

[0071] 由附图4可以看出,与对照组相比,重组pCold TF/LcTPS2质粒与pET-MmGFDPS、pBbA5c-MevT-MBIS质粒共同转化的大肠杆菌BL21(DE3)菌株的体内酶活反应样品中有8个特异成分。

[0072] 实施例6

[0073] 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2在本氏烟草中的异源表达:

[0074] 利用同源重组技术将双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2编码基因克隆至双元载体pEAQ-HT中,形成表达载体pEAQ-HT/LcTPS2,其结构示意图如附图5。利用Primer5设计合适的引物,设计构建pEAQ-HT/LcTPS2表达载体的引物对LcTPS2-Age1-F:5'-TTCTGCCCAAATTCGCGACCGGTATGGCTGCTCCAATCTCTGCAAACC-3'(SEQ ID NO.9)和LcTPS2-Xho1-R:5'-TGAAACCAGAGTTAAAGGCCTCGAGCTAAATCTTAATTTGATCGATGAAC-3'(SEQ ID NO.10)。利用高保真酶PrimeSTAR HS DNA Polymerase进行扩增,PCR体系为50 μ L。

[0075] PCR扩增的体系为:

[0076]

5 \times PrimeSTAR HS Buffer	10 μ L
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 μ L
Primer F	1 μ L
Primer R	1 μ L
Template cDNA	0.5 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
去离子水	33 μ L

[0077] PCR扩增的反应程序为:98 $^{\circ}$ C 10sec,64 $^{\circ}$ C 15sec,72 $^{\circ}$ C 2min,35个循环。程序结束后进行产物回收纯化。

[0078] 运用相同的方法将拟南芥香叶基法尼基焦磷酸酯合酶At-GFDPS2构建到pEAQ-HT载体上得pEAQ-HT/At-GFDPS2。将DNA测序验证成功的载体pEAQ-HT/LcTPS2和pEAQ-HT/At-

GFDPS2分别转化农杆菌LBA 4404,挑取单克隆进行PCR验证,验证成功后加入到合适体积LB液体培养基中(利福平:25 μ g/mL,链霉素:50 μ g/mL,卡那霉素:50 μ g/mL)培养,培养至OD₆₀₀值为2,4000rpm离心10min,弃上清,收集菌体,以MMA buffer(10mM MES pH5.6,10mM MgCl₂,100 μ M乙酰丁香酮)重悬菌体至OD₆₀₀值约为0.8,两种菌等体积混合均匀,室温静置1-3h。以无菌注射器吸取菌液注射本氏烟草幼叶,注射前一天本氏烟草浇足水,注射过后的烟草继续放在温室(16h/light;8h/dark,22 $^{\circ}$ C)培养,培养第六天时收取叶片,丙酮提取,石油醚萃取,减压蒸发浓缩后利用GC-MS对样品进行分析检测得附图6,检测条件参见实施例4。

[0079] 由附图6可以看出,与只注射了含pEAQ-HT/At-GFDPS2的农杆菌的烟草相比(ii),注射了含pEAQ-HT/LcTPS2的农杆菌的烟草(i)合成了7个特异成分,其保留时间与实施例5的化合物一致。

[0080] 实施例7

[0081] 对实施例5的化合物1~8进行体外免疫抑制活性测试:

[0082] C57BL/6小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, Jurkat细胞(人T淋巴细胞白血病细胞)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,PHA、PMA、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、环孢菌素(Cyclosporine A, CsA)购买于sigma公司,MTS购自promega公司,CD3/CD28单抗、鼠源性IFN- γ 及人源性IL-2检测试剂盒均购买于BD Bioscience公司,RPMI-1640培养基、胎牛血清购买于Biological Industries公司。

[0083] 配制待测样品:将实施例5的8个化合物分别溶解于DMSO配制成20mM的储存液。

[0084] 具体方法:

[0085] 接种Jurkat细胞(2×10^5 /well)于96孔板,分别加入化合物1~8,并将化合物1~8分别设置40 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M、2.5 μ M五个浓度,同时加入1 μ g/mL PHA和10ng/mL PMA作为刺激组,其他分组为未刺激组,置培养箱中孵育24h,收集上清,酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA)检测上清中IL-2含量。此外,未刺激组细胞中每孔加入20 μ L MTS试剂,37 $^{\circ}$ C孵育1h后测定OD₄₉₀,以评价化合物对Jurkat细胞的毒性。同时设置CsA阳性对照组、DMSO阴性对照组及空白对照组。计算化合物对PHA、PMA诱导Jurkat细胞产生IL-2的抑制活性及对Jurkat细胞的毒性,并应用GraphPad Prism软件分析半数抑制浓度IC₅₀,结果如表1所示。

[0086] 抑制率(%) = (A450(阴性对照) - A450(实验组)) / (A450(阴性对照) - A450(空白对照)) \times 100%;

[0087] 细胞毒(%) = (A490(阴性对照) - A490(实验组)) / (A490(阴性对照) - A490(空白对照)) \times 100%。

[0088] 表1化合物1~8对PHA和PMA联合诱导Jurkat细胞生成细胞因子IL-2的抑制活性及对Jurkat细胞的毒性

化合物	IL-2 抑制活性		Jurkat 细胞毒 (%)
	IC ₅₀ (μM)	抑制率(%)	
1	12.10	91.95±1.67 ^b	<5 ^d
2	-	<5 ^b	<5 ^d
3	21.91	79.50±2.25 ^b	<5 ^d
4	-	11.46±6.50 ^b	9.61±1.37 ^d
[0089] 5	37.61	53.64±8.08 ^b	<5 ^d
6	20.70	88.68±0.82 ^b	<5 ^d
7	-	20.82±1.72 ^b	<5 ^d
8	-	29.83±8.99 ^b	<5 ^d
CsA ^a	(1.90±0.26)×10 ⁻²	98.87±0.11 ^c	<5 ^e

[0090] ^a阳性对照;

[0091] ^b测抑制率的化合物浓度为40μM;

[0092] ^c测抑制率的化合物浓度为1μM;

[0093] ^d测细胞毒的化合物浓度为40μM;

[0094] ^e测细胞毒的化合物浓度为1μM。

[0095] 由表1可以看出,实施例5的化合物1、3、5和6对PHA和PMA联合诱导Jurkat细胞生成细胞因子IL-2有明显抑制作用,但对Jurkat细胞无明显细胞毒活性,说明这四个化合物具有抗炎及免疫抑制作用。

[0096] 从6-8周雌性C57BL/6小鼠无菌分离脾细胞,用尼龙毛柱法分离获得T细胞,然后接种T细胞(4×10⁵/well)于96孔板(包被有5μg/ml CD3单抗),同时分别加入化合物1~8及2μg/ml CD28单抗,置于37℃/5%CO₂培养箱中培养,其中,化合物1~8分别设置20μM、10μM、5μM、2.5μM、1.25μM五个浓度。48h后收集细胞上清,ELISA法检测上清中IFN-γ分泌情况。实验同时设置CsA阳性对照组、DMSO阴性对照组、未刺激组及空白对照组。计算化合物对T细胞分泌IFN-γ的抑制活性,并应用GraphPadPrism软件分析半数抑制浓度IC₅₀,结果如表2所示。

[0097] 抑制率(%) = (A450(阴性对照) - A450(实验组)) / (A450(阴性对照) - A450(空白对照)) × 100%。

[0098] 从6-8周雌性C57BL/6小鼠无菌分离脾细胞,接种脾细胞(5×10⁵/well)于96孔板,然后加入20μM化合物,置于37℃/5%CO₂培养箱中培养。48h后每孔加入10μL CCK-8试剂,37℃孵育4h后测定OD₄₅₀,以评价化合物对脾细胞的毒性。同时设置CsA阳性对照组、DMSO阴性对照组及空白对照组。计算化合物的脾细胞毒性,结果如表2所示。

[0099] 细胞毒(%) = (A450(阴性对照) - A450(实验组)) / (A450(阴性对照) - A450(空白对

照)) × 100%。

[0100] 表2化合物1~8对CD3/CD28单抗刺激小鼠T细胞生成细胞因子IFN- γ 的抑制活性及对脾细胞的毒性

	化合物	IFN- γ 抑制活性		脾细胞毒性 (%)
		IC ₅₀ (μ M)	抑制率 (%)	
[0101]	1	19.68	52.05±0.37 ^a	<5 ^c
	2	-	<5 ^a	<5 ^c
	3	11.89	73.79±1.42 ^a	14.52±6.53 ^c
	4	-	33.32±5.95 ^a	16.42±0.70 ^c
	5	-	37.34±1.36 ^a	<5 ^c
	6	-	34.81±3.04 ^a	18.31±7.47 ^c
	7	-	<5 ^a	<5 ^c
[0102]	8	-	33.78±4.08 ^a	<5 ^c
	CsA	1.078×10 ⁻³	98.90±0.02 ^b	50.32±4.95 ^d

[0103] ^a测抑制率的化合物浓度为20 μ M;

[0104] ^b测抑制率的化合物浓度为1 μ M;

[0105] ^c测细胞毒的化合物浓度为20 μ M;

[0106] ^d测细胞毒的化合物浓度为10 μ M

[0107] 由表2可以看出,实施例5的化合物1和3对CD3/CD28单抗刺激小鼠T细胞生成细胞因子IFN- γ 有明显抑制作用,但对脾细胞无明显细胞毒活性,说明这两个化合物具有抗炎及免疫抑制作用。

[0108] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 中国科学院昆明植物研究所

[0003] <120> 双功能二倍半萜/二萜合酶LcTPS2、编码基因及其产物和应用

[0004] <160> 10

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 552

[0008] <212> PRT

[0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0010] <400> 1

[0011] Met Ala Ala Pro Ile Ser Ala Asn Gln Gln Thr Ser His Arg Pro Leu

[0012] 1 5 10 15

[0013] Ala Asn Phe Ser Pro Thr Pro Ser Leu Trp Gly Asp His Phe Ile Lys

[0014] 20 25 30

[0015] His Asn Ser Asp Leu Gln Val Lys Glu Lys Tyr Trp Glu Glu Ile Glu

[0016] 35 40 45

[0017] Val Leu Lys Asn Glu Val Arg Ser Met Leu Thr Ala Pro Gly Gly Lys

[0018] 50 55 60

[0019] Met Val Asp Thr Met Asn Leu Ile Asp Thr Leu Glu Arg Leu Gly Val

[0020] 65 70 75 80

[0021] Ser Tyr His Phe Glu Asn Glu Ile Glu Glu Lys Ile Gln Gln Phe Phe

[0022] 85 90 95

[0023] Asn Leu Asn Thr Asp Tyr Glu Asp Glu Ala Tyr Asp Leu Tyr Thr Val

[0024] 100 105 110

[0025] Ala Leu His Phe Arg Leu Phe Arg Gln His Gly Tyr Arg Ile Ser Cys

[0026] 115 120 125

[0027] Asp Ile Phe Gly Lys Trp Met Asp Gln Asn Gly Lys Phe Gln Glu Ser

[0028] 130 135 140

[0029] Ile Lys Ser Asp Ala Lys Gly Leu Leu Ser Leu Tyr Glu Ala Ser Tyr

[0030] 145 150 155 160

[0031] Leu Arg Thr His Gly Asp Thr Ile Leu Asp Tyr Ala Leu Tyr Phe Ala

[0032] 165 170 175

[0033] Thr Ala Ser Leu Lys Ser Leu Met Pro Asp Leu Gly Ser Ser Ile Arg

[0034] 180 185 190

[0035] Lys Gln Val Glu His Ala Leu Val Gln Ser Leu His Phe Gly Ile Pro

[0036] 195 200 205

[0037] Arg Ile Glu Ala His His Phe Ile Ser Ile Tyr Glu Glu Glu Glu His

[0038] 210 215 220

[0039] Lys Asn Glu Thr Leu Leu Arg Phe Ala Lys Leu Asp Phe Asn Leu Leu

[0040] 225 230 235 240

[0041] Gln Met Leu His Lys Glu Glu Leu His Glu Val Ser Arg Trp Trp Lys

[0042]		245		250		255
[0043]	Glu Leu Asp Leu Ile Ser Glu Leu Pro Tyr Ala Arg Asp Arg Val Val					
[0044]		260		265		270
[0045]	Glu Cys Phe Phe Tyr Ala Val Gly Val Tyr His Glu Pro Gln Tyr Ser					
[0046]		275		280		285
[0047]	Arg Ala Arg Ile Met Leu Ala Lys Thr Leu Ala Met Ala Thr Ile Leu					
[0048]		290		295		300
[0049]	Asp Asp Thr Phe Asp Ser Tyr Gly Thr Ile Glu Glu Leu Glu Phe Leu					
[0050]		305		310		315
[0051]	Thr Glu Ala Ile Glu Arg Trp Gly Ile Glu Glu Ile Asp Thr Leu Pro					
[0052]		325		330		335
[0053]	Glu Tyr Met Lys Thr Tyr Tyr Lys Ala Gln Leu Lys Leu Tyr Gln Glu					
[0054]		340		345		350
[0055]	Phe Glu Glu Glu Leu Ala Glu Lys Gly Arg Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr					
[0056]		355		360		365
[0057]	Ala Ile Lys Ala Leu Lys Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Leu Val Glu Ala					
[0058]		370		375		380
[0059]	Lys Trp Phe Ile Gln Gly Tyr Met Pro Pro Phe Glu Glu Tyr Leu Asp					
[0060]		385		390		395
[0061]	Asn Ala Leu Ile Thr Ser Gly Ser Lys Ser Leu Thr Thr Ala Ile Leu					
[0062]		405		410		415
[0063]	Met Gly Met Glu Ser Ala Met Lys Glu Asp Phe Glu Trp Leu Ser Met					
[0064]		420		425		430
[0065]	Thr Pro Lys Leu Leu Val Ala Thr Gln Ile Ile Ala Arg Leu Thr Asp					
[0066]		435		440		445
[0067]	Asp Ile Gly Ser Tyr Glu Val Glu Lys Glu Arg Gly Gln Thr Ala Thr					
[0068]		450		455		460
[0069]	Gly Ile Glu Cys Tyr Met Lys Glu Asn Gly Val Thr Lys Glu Glu Ala					
[0070]		465		470		475
[0071]	Met Ser Lys Phe Ser Glu Met Ala Thr Asn Ala Trp Lys Asp Ile Thr					
[0072]		485		490		495
[0073]	Glu Glu Cys Leu Thr Pro Ser Ser Asn Ser Arg Asp Val Cys Phe Arg					
[0074]		500		505		510
[0075]	Leu Leu Asn Phe Asn Arg Leu Val Asp Val Thr Tyr Lys Asn Asn Asn					
[0076]		515		520		525
[0077]	Asp Gly Tyr Thr Arg Pro Glu Lys Gly Leu Lys Pro His Ile Ile Ser					
[0078]		530		535		540
[0079]	Leu Phe Ile Asp Gln Ile Lys Ile					
[0080]		545		550		
[0081]	<210> 2					
[0082]	<211> 1659					
[0083]	<212> DNA					

- [0084] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0085] <400> 2
- [0086] atggetgctc caatctctgc aaaccaacaa acgtctcadc gccctctcgc caattttctca 60
- [0087] cccactccca gcttgtgggg tgatcacttc atcaaacaca actctgatct tcagggttaa 120
- [0088] gaaaaatatt gggaggaaat tgaagtattg aagaatgaag tgaggagtat gctaacagct 180
- [0089] ccgggaggca aatggtgga caccatgaac ctcatcgaca cacttgagcg tttaggcggt 240
- [0090] tcgtatcatt ttgagaacga gatcgaagag aaaatacaac agtttttcaa tctcaatata 300
- [0091] gattatgaag atgaagccta tgatttgtac acggttgctc ttcattttcg actgttcagg 360
- [0092] cagcatgggt accgtatata ttgtgacata tttggtaaag ggatggatca gaatggaaaa 420
- [0093] ttccaggaga gcattaagag tgatgcaaaa ggtttgctga gtttgatga ggcttcttat 480
- [0094] ttgagaacgc atggagacac catactcgat tacgcccttt attttgctac agctagtctc 540
- [0095] aatccttga tgccagatct cggatcatcc attaggaaac aggttgagca tgccctcgtt 600
- [0096] caaagcttgc attttggcat tccaagaatc gaagcacacc atttcatctc catctatgaa 660
- [0097] gaggaagaac acaaaaacga aaccctgctt aggttcgcca aattggactt taatctattg 720
- [0098] caaatgctac acaagaaga gtcctatgaa gtctcaaggt ggtggaaaga attggaccta 780
- [0099] atttcggaac ttccatatgc aagagataga gtggtggagt gtttctttta tgcagtggga 840
- [0100] gtgtaccatg aaccgcagta ctctcgtgcc cgtatcatgc ttgctaaaac ctttgctatg 900
- [0101] gcgactatat tggatgatac gtttgattca tatggtacaa ttgaagaact tgaatttctt 960
- [0102] acagaggcaa tagagagtg gggatcgaag gagattgata cactccccga gtacatgaag 1020
- [0103] acatactata aagcacaatt gaaactctac caggaatttg aggaagaatt agctgagaaa 1080
- [0104] ggaagatctt atgcaacata ctatgcaata aaagcactta aggaattggc aaggagctac 1140
- [0105] cttgtggagg ccaagtgggt catacaaggc tacatgccac cttttgagga atacctagat 1200
- [0106] aatgctctca tcaactagtg tagcaaatcg ctcaaacag cgatattgat gggaatggag 1260
- [0107] tccgcaatga aggaagactt tgaatggcta agcatgaccc ctaaactgct tgtagccaca 1320
- [0108] cagataatag ctgactcac tgatgacata ggtagtattg aggttgagaa ggagaggggt 1380
- [0109] cagactgcga ctggtattga gtgttatatg aaggaaaatg gactgacaaa agaagaggca 1440
- [0110] atgagcaagt tctctgaaat ggctacaaat gcatggaagg atattacaga agagtgttta 1500
- [0111] acgccatctt ccaactcgag ggatgtttgt ttccgactcc taaattttaa tcgcttagta 1560
- [0112] gatgtcactt acaagaacaa taacgatgga tacactcgac ctgaaaaggg tttgaagccc 1620
- [0113] catatcattt ctttgttcat cgatcaaatt aagatttag 1659
- [0114] <210> 3
- [0115] <211> 31
- [0116] <212> DNA
- [0117] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0118] <400> 3
- [0119] tccgcaatga aggaagactt tgaatggcta a 31
- [0120] <210> 4
- [0121] <211> 24
- [0122] <212> DNA
- [0123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0124] <400> 4
- [0125] gttatgaggt tgagaaggag aggg 24

- [0126] <210> 5
[0127] <211> 29
[0128] <212> DNA
[0129] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0130] <400> 5
[0131] cccctctcct tctcaacctc ataactacc 29
[0132] <210> 6
[0133] <211> 24
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0136] <400> 6
[0137] ccttgccaat tccttaagtg cttt 24
[0138] <210> 7
[0139] <211> 31
[0140] <212> DNA
[0141] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0142] <400> 7
[0143] ggtaccatgg ctgctccaat ctctgcaaac c 31
[0144] <210> 8
[0145] <211> 31
[0146] <212> DNA
[0147] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0148] <400> 8
[0149] ctgcagctaa atcttaatth gatcgatgaa c 31
[0150] <210> 9
[0151] <211> 48
[0152] <212> DNA
[0153] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0154] <400> 9
[0155] ttctgccc aa attcgcgacc ggtatggctg ctccaatctc tgcaaacc 48
[0156] <210> 10
[0157] <211> 50
[0158] <212> DNA
[0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0160] <400> 10
[0161] tgaaccaga gttaaaggcc tcgagctaaa tcttaatttg atcgatgaac 50

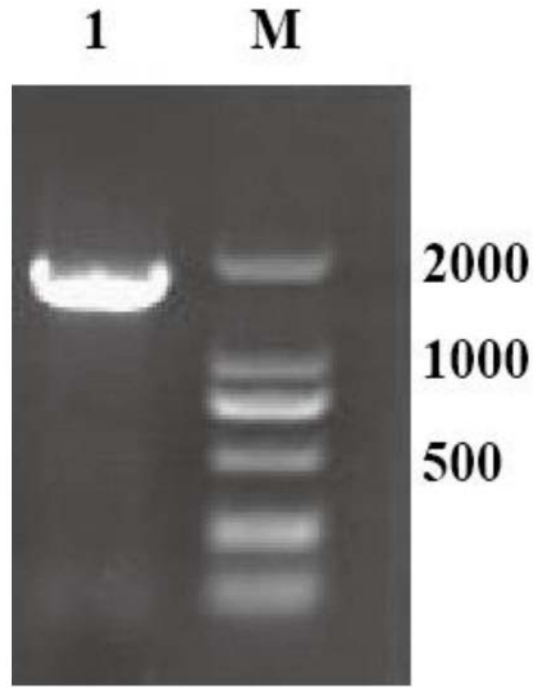


图1

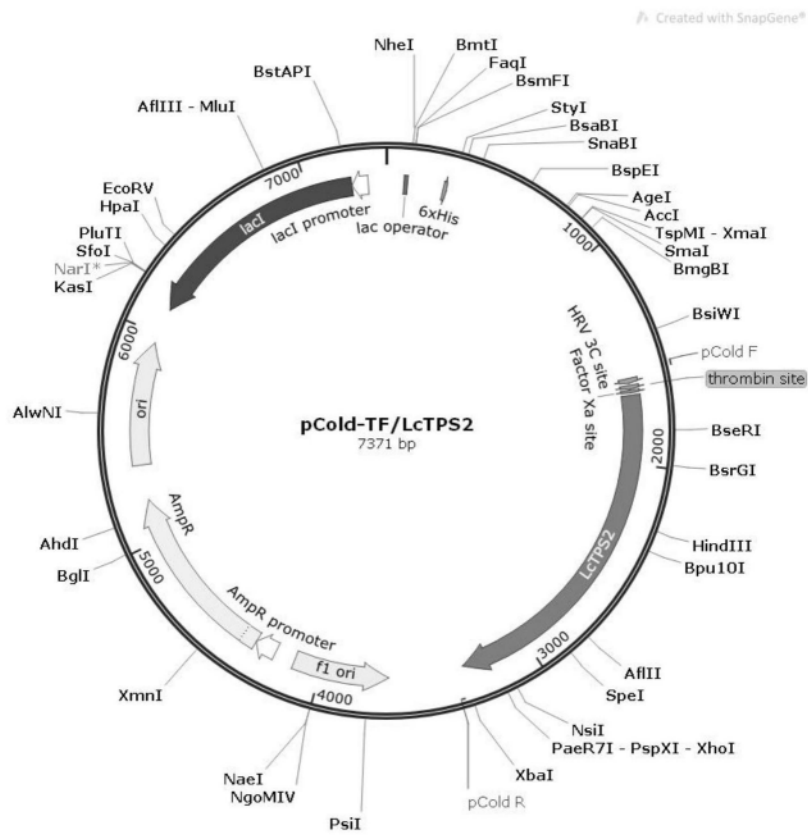


图2

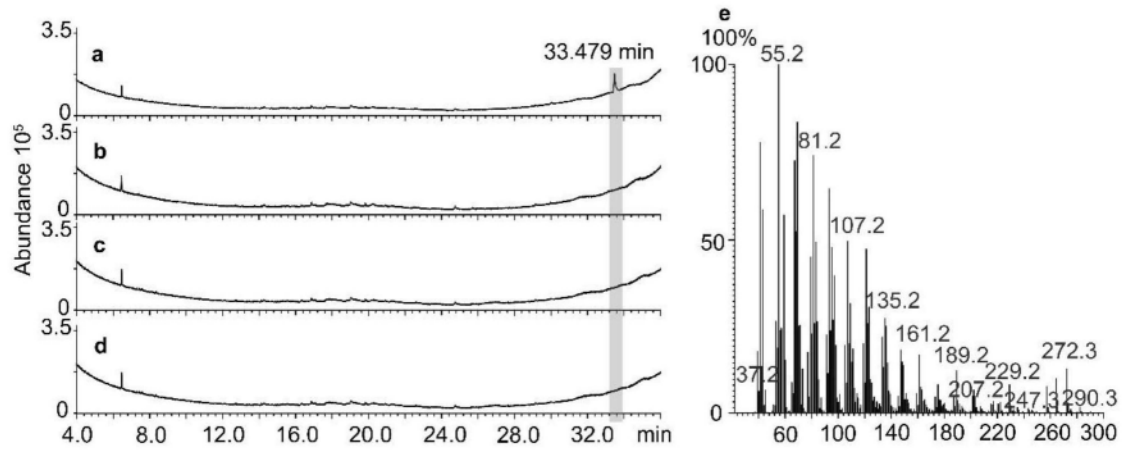


图3

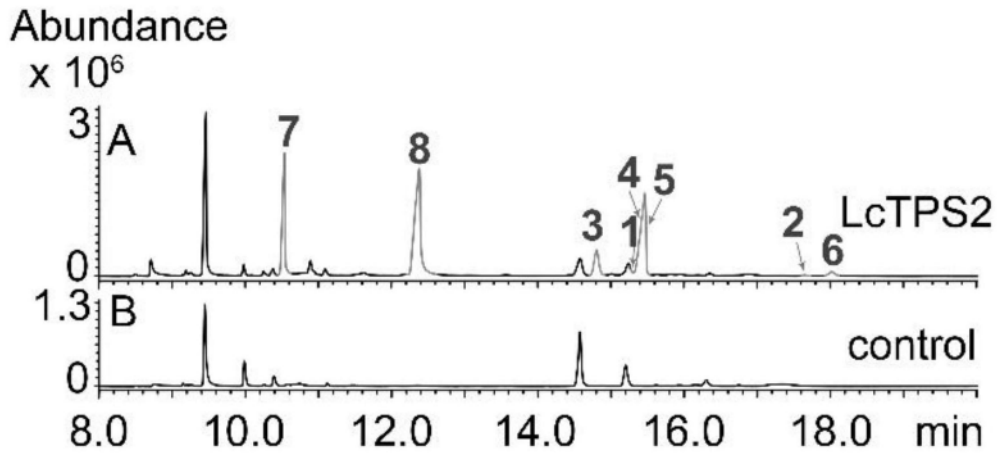


图4

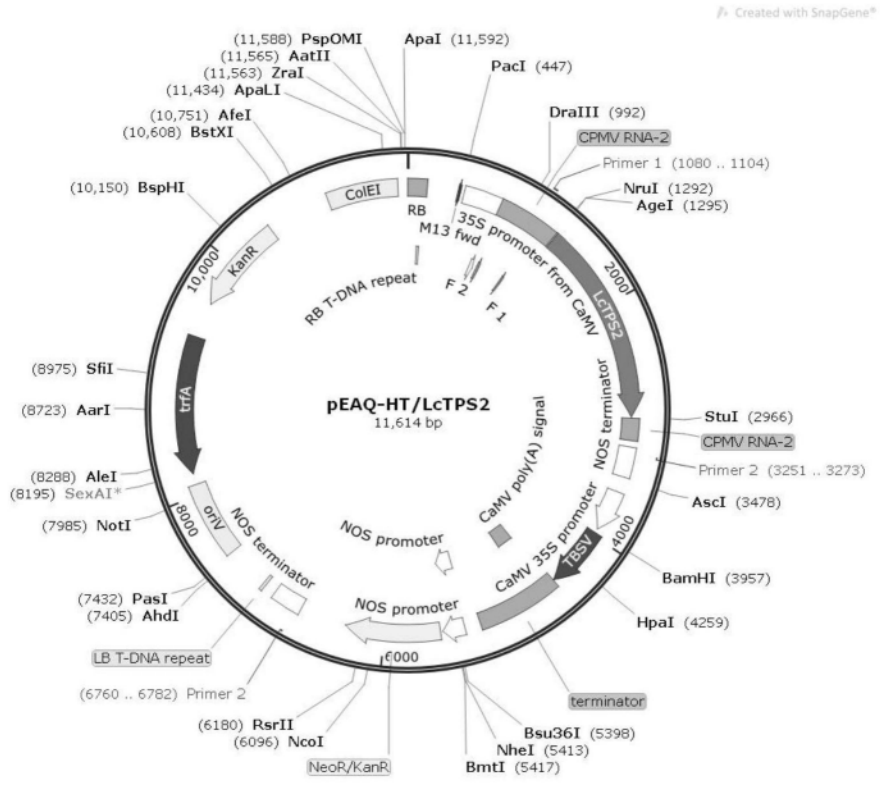


图5

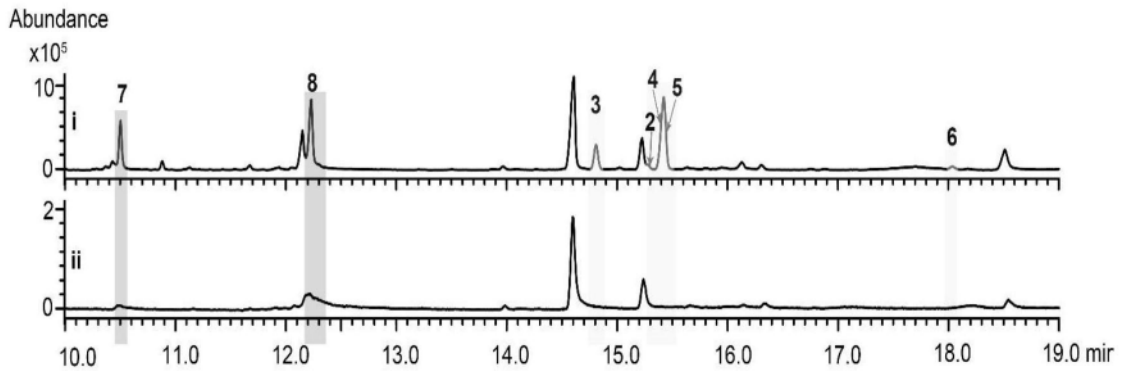


图6