



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106957848 B

(45) 授权公告日 2021.12.17

(21) 申请号 201610012622.5

C07K 14/415 (2006.01)

(22) 申请日 2016.01.08

C12N 15/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12Q 1/6895 (2018.01)

申请公布号 CN 106957848 A

C12Q 1/686 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.07.18

(56) 对比文件

(73) 专利权人 贵州中医药大学

CN 102772696 A, 2012.11.14

地址 550025 贵州省贵阳市花溪区大学城
栋青南路

谭宁华等. 二维核磁共振谱测定植物新环
肽——太子参环肽A和B中氨基酸序列.《波谱学
杂志》.1993,第10卷(第1期),第69-74页.

(72) 发明人 周涛 江维克 郑伟 李军 赵丹
丁铃 龙登凯

审查员 李肖菓

(74) 专利代理机构 贵阳贵知知识产权代理事务
所(普通合伙) 52115

代理人 曾香兰

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

一个太子参环肽HB前体蛋白基因及其应用

(57) 摘要

本发明公开一个太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的序列、克隆方法及其应用。该基因核苷酸序列长477bp,其中,编码区(CDS)为108bp(编码35个氨基酸),含有172bp的5'非编码区(5'UTR)及197bp的3'非编码区(3'UTR)。该基因具有典型的植物环肽前体蛋白基因的结构,蛋白序列中含有的太子参环肽HB线性肽prePhHB(IFGGLPPP)经人工合成后,通过环化反应可以生成太子参环肽HB。这一发明为基于太子参环肽HB前体蛋白基因表达水平的应用,以及采用生物技术或化学技术合成太子参环肽HB,提供科学依据。

1. 太子参环肽HB的合成方法,其特征在于,太子参环肽HB的线性肽prePhHB氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4所示,合成线性肽prePhHB后,通过粗酶环化反应获取太子参环肽HB。

一个太子参环肽HB前体蛋白基因及其应用

技术领域：

[0001] 本发明属于中药材功能基因技术领域。具体涉及一个太子参环肽HB前体蛋白基因及其编码的多肽的应用。

技术背景：

[0002] 中药太子参为石竹科植物孩儿参*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax的干燥块根,具有益气健脾、生津润肺的功效。太子参因药性温和,为药食两用中药材。随着太子参在保健食品、化妆品产业用量的逐年增多,市场需求量增大,刺激了太子参种植产业的迅速扩大。以贵州省为例,十余个县市行政区拟以发展太子参种植作为改善农业产业结构和推动地方经济发展的手段之一。

[0003] 目前已从太子参中分离得到约16种环肽类成分,其广泛的生理活性是医药领域研究的新热点。现代研究表明,太子参环肽类成分具有酪氨酸酶抑制活性,有抗皮肤黑色素生成的作用,与将太子参作为保健药品、化妆品进行研制开发的定位理念相得益彰,尤其太子参环肽HB (Heterophyllin B, HB) 曾被《中国药典》(2005年版、2010年版) 收录为太子参含量测定的成分。

[0004] 现代研究证明,植物环肽的生物合成路径主要由三部分组成:环肽前体蛋白基因转录并表达成环肽前体蛋白,经蛋白酶剪切生成线性肽,在环化酶的作用下生成环肽蛋白。其中,环肽前体蛋白基因的转录和表达是合成的第一步,也是关键步骤。本发明为基于太子参环肽HB前体蛋白基因的应用,如太子参中太子参环肽HB前体蛋白基因表达水平的检测,以及采用生物技术或化学技术合成太子参环肽HB等方面奠定了坚实的基础。

发明内容：

[0005] 本发明的目的在于提供太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的核苷酸序列、太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的CDS序列、太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB编码的氨基酸序列、太子参环肽HB线性肽prePhHB的氨基酸序列、太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB CDS序列全长的扩增引物,太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB表达水平的检测引物,以及在此序列基础上进行密码子优化或点突变所产生的与原始序列相似度90%以上的序列。

[0006] 本发明所述的太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB(如序列表中SEQ ID No.1所示),其特征在于,太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB序列的应用。该基因的核苷酸序列长477bp,含有172bp的5'非编码区(5'UTR)及197bp的3'非编码区(3'UTR),其中,CDS为108bp,编码35个氨基酸。该基因具有典型的植物环肽前体蛋白基因的结构。

[0007] 本发明所述的太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB克隆方法,其特征在于,以SEQ ID No.1序列设计引物,以太子参cDNA为模板扩增太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的全长CDS,连接转化后,挑选阳性克隆。

[0008] 本发明提供了太子参环肽HB线性肽prePhHB的应用,如:根据本发明提供的基因的氨基酸序列,合成太子参环肽HB线性肽prePhHB,进而采用生物技术或化学技术合成太子参

环肽HB。

[0009] 本发明提供太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的核苷酸序列在太子参相关研究中的应用,如:根据基因序列设计特异引物,通过PCR技术检测和分析太子参环肽HB前体蛋白基因在不同太子参材料中的表达水平。

[0010] 发明人进行了一系列实验,以探明本发明提供的太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB及其编码的多肽,通过实验验证prePhHB为太子参环肽HB的线性肽,以说明本发明的有效性。具体如下:

[0011] 一、构建太子参转录组数据库

[0012] 提取太子参的总RNA,利用第二代高通量测序技术,通过Illumina HiSeq 2500测序平台进行转录组测序,对测序数据进行富集、拼接、注释,构建太子参转录组数据库。

[0013] 二、分析太子参转录组数据库

[0014] 使用muscle 3.6、BioEdit、Genetyx_version 7等多款生物信息软件综合分析太子参的转录组数据库,得到一条基因序列(其序列如序列表中SEQ ID No.1所示),本发明将其命名为PhHB。所述PhHB基因具有典型的植物环肽前体蛋白基因结构,其编码的氨基酸序列中包含太子参环肽HB的线性肽(本发明命名为prePhHB,其氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4所示),因此,推测PhHB基因为太子参环肽HB的前体蛋白基因。

[0015] 三、验证

[0016] (1) 扩增PhHB的全长CDS根据PhHB的核苷酸序列(如序列表中SEQ ID No.1所示)信息,设计全长CDS扩增引物(其上、下游引物序列分别如序列表中SEQ ID No.5、SEQ ID No.6所示)。以太子参块根cDNA第一链为模板,通过PCR扩增及克隆测序,所得核苷酸序列与序列表中SEQ ID No.2完全一致,说明前述扩增引物可以扩增太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的全长CDS。

[0017] (2) 太子参环肽HB环化反应以化学方法合成的线性肽prePhHB(氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4所示)为底物,经缓冲液(pH=8.5)提取的太子参块根粗酶催化可生成环肽HB,说明prePhHB是形成太子参环肽HB的前体蛋白。

[0018] (3) 太子参PhHB基因表达分析太子参材料可分为太子参环肽HB含量较高、较低两类。根据太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB设计特异引物(其上、下游引物序列分别如序列表中SEQ ID No.7、SEQ ID No.8所示),以不同Heterophyllin B含量的太子参的块根cDNA第一链为模板,分别进行PCR反应。以2.0%的琼脂糖凝胶电泳后条带的明暗程度判定PhHB基因的表达水平。结果说明PhHB的表达量与太子参中环肽HB的含量呈正相关,结合前述(1)、(2)的验证结果,进一步说明PhHB是形成太子参环肽HB的前体蛋白基因。

附图说明:

[0019] 图1为太子参环肽HB的化学分子结构式。

[0020] 图2为太子参环肽HB前体基因PhHB全长CDS扩增电泳检测图谱;M:Marker (TaKaRa DL500);1~2:太子参环肽HB前体基因。

[0021] 图3为太子参环肽HB标准品的HPLC图谱。

[0022] 图4为环化反应的太子参环肽HB的HPLC图谱;CK-:环化反应中未加粗酶。

[0023] 图5为环化反应的太子参环肽HB的HPLC图谱;CK+环化反应中未加prePhHB。

[0024] 图6为环化反应的太子参环肽HB的HPLC图谱;环化反应中同时加prePhHB和粗酶。

[0025] 图7为环化反应的太子参环肽HB量比较柱形图;K-:环化反应中未加粗酶;CK+环化反应中未加prePhHB;prePhHB:同时加线性肽prePhHB和粗酶。100:环化反应中加入粗酶的量100 μ L;150:环化反应中加入粗酶的量150 μ L;200:环化反应中加入粗酶的量200 μ L。

[0026] 图8为不同太子参环肽HB含量的太子参材料中PhHB前体基因表达的电泳检测图谱;M:Marker (TaKaRa DL500);1~6:太子参环肽HB含量高的太子参;7~12:太子参环肽HB含量极低的太子参。

具体实施方式:

[0027] 以下结合实施例子来进一步解释本发明,以使本领域普通技术人员参阅本说明书后能够据以实施,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。

[0028] 实施例一:

[0029] 以贵州施秉太子参块根为材料,提取总RNA,以反转录cDNA的第一链作为模板,进行PCR扩增反应。25 μ L反应体系,包括:0.125 μ L TaKaRa Ex Taq ($5\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),2.5 μ L 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg^{2+} Plus),2 μ L dNTP Mixture (各2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),1 μ L SEQ ID No.5所示引物 ($10\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),1 μ L SEQ ID No.6所示引物 ($10\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),1 μ L cDNA模板,ddH₂O补至25 μ L;反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30s,51 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45s,35个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸7min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,切取目的条带,回收,所得产物直接与pMD19-T载体连接,转化大肠杆菌DH5 α ,挑取阳性克隆测序,去除pMD19-T载体序列后,所得核苷酸序列与序列表中SEQ ID NO.2一致,其编码的氨基酸序列与前述PhHB基因编码的氨基酸序列(序列表中SEQ ID NO.3所示)相同。

[0030] 实施例二:

[0031] 取贵州施秉县太子参块根适量,经过提取、纯化、浓缩,得粗酶。在30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下环化5h,其反应体系(1000 μ L)为:15 $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris (pH 8.5),100 $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,5 $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT,0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA,15 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ prePhHB(金斯瑞生物科技有限公司合成,纯度为99%)以及粗酶(设100 μ L,150 μ L,200 μ L三个梯度),ddH₂O补至1000 μ L。以不加入prePhHB或不加粗酶作为对照组,每组3个平行。反应完成后加入9倍体积甲醇终止反应,置蒸发皿中,水浴加热浓缩至干,残渣加色谱纯甲醇溶解,转移至2mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,经0.45 μm 滤膜,取续滤液,按2010年版《中国药典》太子参项下含量测定条件,检测环化反应生成的太子参环肽HB的量。结果显示:加入100 μ L、150 μ L和200 μ L三个梯度的粗酶均能与prePhHB反应,形成太子参环肽HB,其含量随着粗酶用量的增加而增加;未加prePhHB对照组中太子参环肽HB含量明显低于实验组,而未加粗酶的对照组中太子参环肽HB的含量低于检测限。

[0032] 实施例三:

[0033] 参照2010版《中国药典》太子参项下太子参环肽HB的含量测定方法,测定太子参块根中太子参环肽HB的含量。根据检测结果,把太子参材料分为太子参环肽HB含量较高(测定为 $0.0256 \pm 0.0049\%$)、太子参环肽HB含量极低(测定为 $0.0000 \pm 0.0002\%$)两类。分别提取块根总RNA,将等量总RNA反转录为cDNA。根据太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的核苷酸序列设计引物(上、下游引物序列如序列表中SEQ ID No.7、SEQ ID No.8所示),分别以前述

cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系(25 μ L)为:0.125 μ L TaKaRa Ex Taq (5U $\cdot$ μ L⁻¹), 2.5 μ L 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg²⁺Plus), 2 μ L dNTP Mixture (各2.5mM), 前述上、下游引物各1 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹), cDNA模板1 μ L, ddH₂O补至25 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性4min, 95 $^{\circ}$ C变性30s, 68 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸45s, 30个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸7min。PCR扩增产物经EB染色后的2.0%的琼脂糖凝胶电泳后, 于凝胶成像系统观察、拍照、保存。以2.0%的琼脂糖凝胶电泳后条带的明暗程度判定PhHB基因的表达水平。结果表明太子参环肽HB前体蛋白基因PhHB的表达量与太子参环肽HB含量呈正相关(附图8)。太子参环肽HB含量较高的条带清晰明亮, 说明PhHB基因有较高的表达量, 而太子参环肽HB含量极低的太子参类型没有明显的条带, 说明PhHB基因的表达量极低。

SEQUENCE LISTING

<110> 贵阳中医学院
 <120> 一个太子参环肽 HB 前体蛋白基因及其应用
 <130> ZT008
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 477
 <212> DNA
 <213> 太子参 (*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax)

<400> 1
 [0001] gttggcgcgt ggtaccaaaccaccataa tcttcccatg tgcctcgtat atttccaaaa 60
 aataaaatag taaattgttt ttgctataaa tagagacaag taagtgaggc ataatataga 120
 cttacacaac aacaatcata ataaaccatt taccatttga ttacatatac aaatgtctac 180
 tatttcagcc atccacatta tgaagccgag tatttttggg ggtcttccct ctcctagtca 240
 ggagctgata aatggagatg atatttccct catggtgtaa gtagcattg taatgcatgt 300
 ccgtcaccgt tgggccttta tgggtgtgtg taatatgtct taagtatatgt cctttttgtg 360
 aaagtggata gtaatgtttt tgcctgtgtg tgcctttat gttgaacatg tacctgttc 420
 ttttgatttt taataaaata taaaggccct aaattgtgtt ttcgtaaaaa aaaaaaa 477

<210> 2
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> 太子参 (*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax)

<400> 2
 atgtctacta ttacagccat ccacattatg aagccgagta tttttggggg tcttctcct 60

cctagtcagg agctgataaa tggagatgat atttcctca tgggtgaa

108

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> 太子参 (*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax)

<400> 3

Met Ser Thr Ile Ser Ala Ile His Ile Met Lys Pro Ser Ile Phe

1 5 10 15

Gly Gly Leu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Leu Ile Asn Gly Asp Asp

20 25 30

Ile Ser Leu Met Val

35

[0002]

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Ile Phe Gly Gly Leu Pro Pro Pro

1 5

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

	atgtctacta tttcagcc	18
	<210> 6	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 6	
	cttacacctg asggaaa	17
	<210> 7	
	<211> 25	
[0003]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 7	
	agccgagtat ttttgggggt ctcc	25
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 8	
	cataaaagcc caacggtagac ggac	24

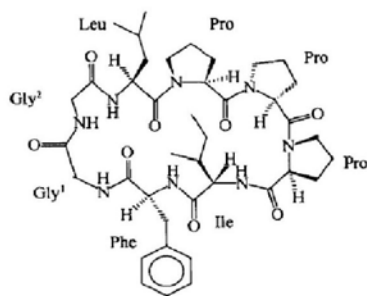


图1

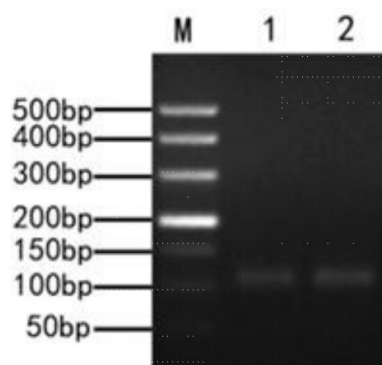


图2

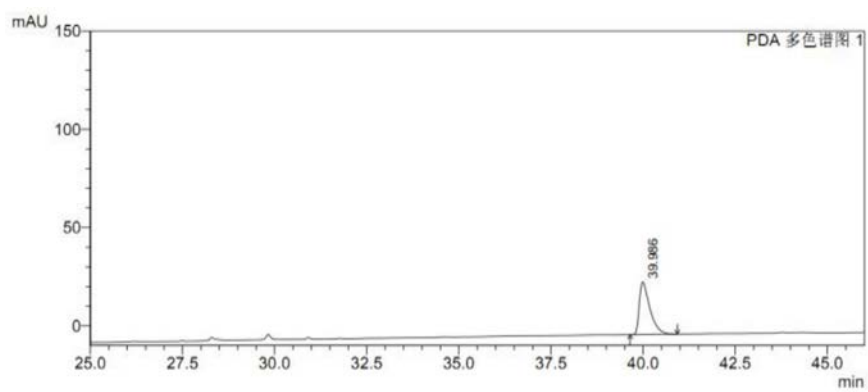


图3

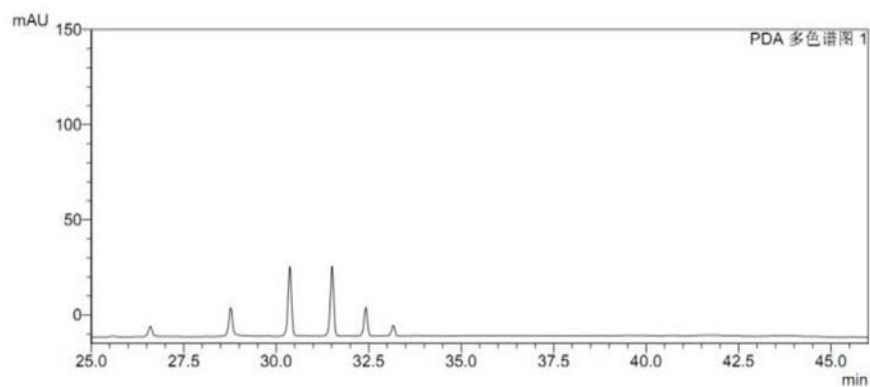


图4

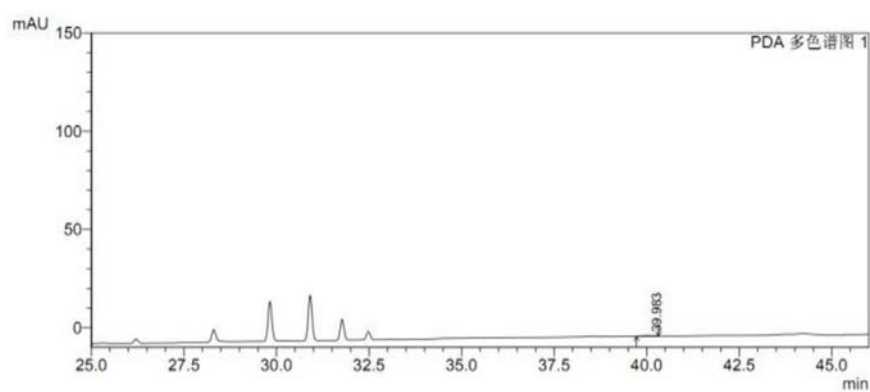


图5

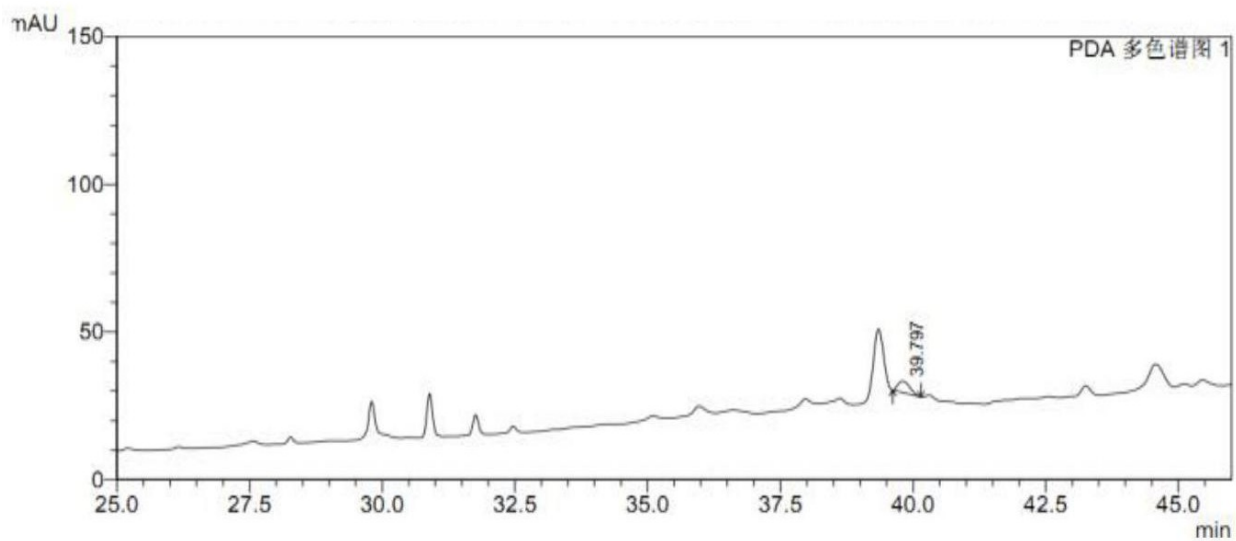


图6

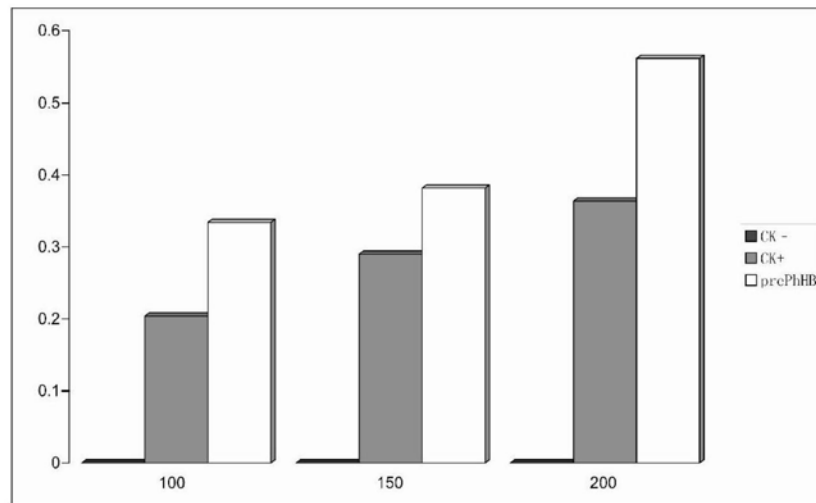


图7

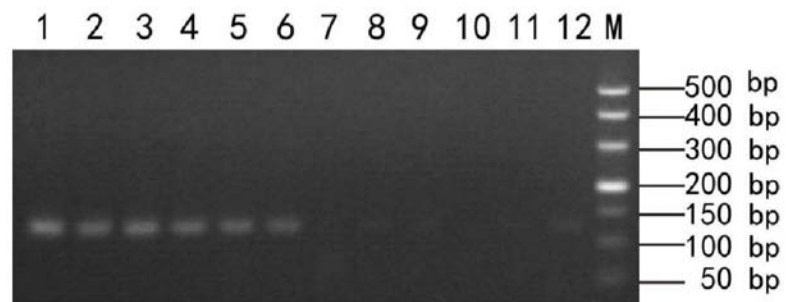


图8