

## 权 利 要 求 书

1、一种 *ZmEDS* 基因的定点突变基因 *ZmEDS-F303A*、*ZmEDS-G411C*、*ZmEDS-V306A* 和 *ZmEDS-I279G* 的编码蛋白，其特征在于，其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:3-6 所示。

5        2、一种 *ZmEDS* 基因的编码蛋白及权利要求 1 所述的 *ZmEDS* 基因的定点突变基因 *ZmEDS-F303A*、*ZmEDS-G411C*、*ZmEDS-V306A* 和 *ZmEDS-I279G* 的编码蛋白在倍半萜生物合成上的应用。

3、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，包括以下步骤：

10        1) 将 SEQ ID NO:1 所示的基因克隆到原核表达载体 pET-28a (+) 中，插入限制性内切酶 NdeI 和 EcoRI 位点间，得到重组质粒 pET28a/*ZmEDS*；

15        2) 对 pET28a/*ZmEDS* 的第 303 位、411 位、306 位和 279 位四个氨基酸位点进行定点突变，分别制备得到含 *ZmEDS-F303A*、*ZmEDS-G411C*、*ZmEDS-V306A*、*ZmEDS-I279G* 四个定点突变基因的原核表达质粒；分别是在 *ZmEDS* 蛋白序列上的第 303 位苯丙氨酸突变为丙氨酸、第 411 位甘氨酸突变为半胱氨酸、第 306 位缬氨酸突变为丙氨酸和第 279 位异亮氨酸突变为甘氨酸，并且其余核苷酸序列与 *ZmEDS* 的核苷酸序列无异，其蛋白序列分别如 SEQ ID NO:3-6 所示；

20        3) 将 pMEVT/MBIS 分别与 pET28a/*ZmEDS*、*ZmEDS-F303A*、*ZmEDS-G411C*、*ZmEDS-V306A*、*ZmEDS-I279G* 同时加入 25  $\mu$ L 大肠杆菌 BL21 感受态细胞中，其中，重组质粒各 100-150ng，冰浴 20 min，42℃热激 1 min20 s，冰上冷却 2 min 后加入液体 LB 培养基 200  $\mu$ L，37℃ 200 rpm 下复苏 1.5 h，再涂布于含有氯霉素 50 mg/L 和硫酸卡那霉素 50 mg/L 的固体 LB 培养基平板上；37℃倒置过夜培养，第二天划线取平均菌落，置于同时含有氯霉素 50 mg/L 和硫酸卡那霉素 50 mg/L 的 5 mL 液体 LB 培养基中，37℃ 200 rpm 过夜培养；制备得到上述五种菌种，菌种为大肠杆菌 BL21 背景株系，且每个菌种分别含有两种质粒：

- 30        ①pMEVT/MBIS，pET28a/*ZmEDS*；  
          ②pMEVT/MBIS，*ZmEDS-F303A*；  
          ③pMEVT/MBIS，*ZmEDS-G411C*；  
          ④pMEVT/MBIS，*ZmEDS-V306A*；  
          ⑤pMEVT/MBIS，*ZmEDS-I279G*；

次日取 2 mL 上述菌种置于 50 mL NZY 液体培养基，培养基中加入相应的抗生素，37℃ 200 rpm 培养，菌液培养至  $A_{600}$  达到 0.8-1.0，向其中加入 1

M 的 IPTG 终浓度至 1 mM, 然后将菌液转至 16 °C, 200 rpm 诱导培养 24 h; 之后用等体积的正己烷萃取萜类产物, 16 °C 200 rpm 萃取 30 min; 振荡充分后, 取出静置, 取上层有机相使用旋转蒸发仪浓缩至 1 mL, 转移至 GC 样品瓶中, 用于 GC-MS 检测, 制备得到倍半萜类化合物。

5 4、根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 步骤 2 中对 pET28a/ZmEDS 的第 303 位、411 位、306 位和 279 位四个氨基酸位点进行定点突变, 制备得到含 *ZmEDS-F303A*、*ZmEDS-G411C*、*ZmEDS-V306A*、*ZmEDS-I279G* 四个定点突变基因的原核表达质粒具体为: 4 只 PCR 管中分别加入 20 μg pET28a/ZmEDS 质粒作为模板, 然后依次分别加入 0.5 μL 前引物 F、0.5 μL 后引物 R, 0.4 μL 高保真酶 PrimerSTAR、0.4 μL 浓度为 10mM 的 dNTP、用 10 无菌水补足至 20 μL, 其中, *ZmEDS-F303A* 对应引物 F303A-F/F303A-R、*ZmEDS-G411C* 对应 G411C-F/G411C-R、*ZmEDS-V306A* 对应 V306A-F/V306A-R、*ZmEDS-I279G* 对应 I279G-F/I279G-R, 引物序列分别如 SEQ ID NO:11~18 所示; 将上述 PCR 管进行瞬时离心后, 置于 PCR 仪进行 15 反应, 相应的 PCR 反应程序为: 95°C 5 min; 98°C 10 s, 60°C 15 s, 72°C 7 min 10 s, 循环 15 次; 72°C 7 min; PCR 反应完成后, 取 5 μL 反应液用于 1 % 的琼脂糖电泳检测, 经 100V 30 min 电泳后, 若检测到有大小为 7 kb 的核酸条带, 则在相应剩余的 15 μL 反应液中加入 1.5 μL 限制性内切酶 DpnI, 瞬时混匀后, 37°C 进行过夜消化模板质粒; 取 10 μL 消化后的反应液加入 25 μL 20 大肠杆菌 TOP10 感受态中, 冰浴 20 min, 42°C 热激 1 min, 冰上冷却 2 min 后加入液体 LB 培养基 200 μL, 37°C 200 rpm 下复苏 1 h, 涂布于含有硫酸卡那霉素 50 mg/L 的固体 LB 培养基平板上; 37°C 倒置过夜培养, 第二天挑选单菌落, 置于含硫酸卡那霉素 50 mg/L 的 5 mL 液体 LB 培养基中, 37°C 200 rpm 过夜培养后, 使用试剂盒提取质粒, 并送样测序验证已在相应位点进行了 25 定点突变, 并且其他位点未发生突变; 制备得到 4 种重组质粒分别为 *ZmEDS-F303A*、*ZmEDS-G411C*、*ZmEDS-V306A* 和 *ZmEDS-I279G*。

30 5、根据权利要求 3 或 4 所述的应用, 其特征在于, 所述液体 LB 培养基具体为: 酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 去离子水 1 L, 用 1 M 的 NaOH 调 pH 值至 7.0; 121 °C 高压灭菌 20 min 后, 4 °C 保存; 固体 LB 培养基在灭菌前加上 15 g/L 的琼脂。

6、根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述 NZY 液体培养基具体为: NaCl 5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g, 酵母提取物 5 g, 水解酪蛋白 10 g, 去离子水 1 L, 用 1 M 的 NaOH 调 pH 值至 7.0; 121 °C 高压灭菌 20 min 后, 4 °C 保存。

35 7、根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述倍半萜类化合物包

括 eudesmane-2 $\alpha$ ,11-diol、3-*epi*-cryptomeridiol、2,3-*epi*-cryptomeridiol 三种倍半萜二元醇和 2-*epi*- $\alpha$ -eudesmol、(+)-hedycaryol、eremophil-6-en-11-ol 和 valerianol 四种倍半萜一元醇。