

欧洲花楸糖基转移酶基因的全长克隆与表达分析

李佳兴^{1,2}, 莫歌³, 周良云¹, 刘亚辉², 蒋靖怡², 谭宇萍^{1,2}, 唐金富², 郭兰萍^{1,2*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 中国中医科学院 中药资源中心, 地道药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700; 3. 西藏藏医学院, 拉萨 850000)

[摘要] 目的: 研究欧洲花楸植保素糖基化修饰的相关基因, 从欧洲花楸悬浮细胞中克隆糖基转移酶 (glycosyltransferase, GT) 基因, 进行序列分析和原核表达。方法: 基于欧洲花楸转录组数据设计特异性引物, 克隆得到 2 条 *SaUGTs* 基因的 cDNA 序列, 构建 HIS-MBP-pET28a-SaUGTs 原核表达载体, 诱导表达 SaUGTs 重组蛋白。结果: 克隆得到 2 条糖基转移酶基因 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 序列, 完整开放阅读框为 1 458 bp 和 1 431 bp, 分别编码 485 和 476 个氨基酸, 相对分子质量为 54.27 kDa 和 53.49 kDa, 理论等电点为 5.50 和 5.63。生物信息学分析显示, 无信号肽, 含有糖基转移酶家族保守结构域 (PSPG)。系统进化结果显示 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 蛋白与拟南芥 UGT85 家族亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 检测显示, 欧洲花楸悬浮细胞经酵母提取物 (YE) 诱导后, *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 的相对表达量明显上调, 分别在 24 h 和 12 h 达到最大值。通过 IPTG 诱导, 在大肠埃希菌中成功表达 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 重组蛋白, 并得到了纯化的重组蛋白。结论: 该研究首次在欧洲花楸中克隆得到糖基转移酶基因, 并成功构建了原核表达载体, 为进一步研究该类基因的功能奠定了基础。

[关键词] 欧洲花楸; 糖基转移酶; 全长克隆; 表达分析

[中图分类号] R284.1; R289; R22; R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0167-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190514

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181120.1602.008.html>

[网络出版时间] 2018-11-21 15:14

Full-length Cloning and Protein Expression Analysis of Glycosyltransferases Gene *SaUGT1/SaUGT2* in *Sorbus aucuparia*

LI Jia-xing^{1,2}, MO Ge³, ZHOU Liang-yun¹, LIU Ya-hui², JIANG Jing-yi²,
TAN Yu-ping^{1,2}, TANG Jin-fu², GUO Lan-ping^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resources Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700;
3. Tibetan Traditional Medical College, Lhasa 850000, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the glycosyltransferase gene involved in modification reaction of phytoalexin from *Sorbus pohuashanensis* suspension cell, and conduct sequence analysis and prokaryotic expression analysis. **Method:** Based on the transcriptome data, specific primers were designed to obtain 2 cDNA sequences of *SaUGTs* genes, construct prokaryotic expression vector HIS-MBP-pET28a-SaUGTs and induce the expression of recombinant SaUGTs protein. **Result:** *SaUGT1* and *SaUGT2* sequences were cloned and obtained from glycosyltransferases, then bioinformatic analysis of the sequence and prokaryotic expression analysis were conducted. *SaUGT1* gene contained 1 458 bp open reading frame (ORF), encoding a polypeptide of 485 amino acids, with a relative molecular weight of 54.27 kDa and theoretical isoelectric point (pI) of 5.50. *SaUGT2* gene

[收稿日期] 20180719(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703655); 中央本级重大增减支项目(2060302); 中国中医科学院重点领域项目(ZZ10-27)

[第一作者] 李佳兴, 在读硕士, 从事中药资源开发与品质评价研究, E-mail: 15712372317@163.com

[通信作者] * 郭兰萍, 博士, 研究员, 从事中药生态学研究, Tel: 010-64087856, E-mail: glp01@163.com

contained 1 431 bp ORF, encoding a polypeptide of 476 amino acids, with a relative molecular weight of 53.49 kDa and theoretical pI of 5.63. Bioinformatics analysis indicated that SaUGT1 and SaUGT2 protein had no signal peptide, and the conserved domains of glycosyltransferase family were detected. Phylogenetic results showed that SaUGT1 and SaUGT2 proteins had the closest relationship with the UGT85 family of *A. thaliana*. Differential expression analysis revealed that the relative expression levels of *SaUGT1* and *SaUGT2* were increased significantly after being induced by yeast extract (YE), with the highest expression level found at 24 h and 12 h. The recombinant SaUGT1 and SaUGT2 proteins were successfully expressed in *Escherichia coli* DE3 cells and finally, the recombinant SaUGT1 and SaUGT2 proteins were purified through Ni²⁺ affinity chromatography. **Conclusion:** The glycosyltransferase gene was cloned from the *S. aucuparia* for the first time, and the prokaryotic expression vector was successfully constructed, laying foundation for further study of the function of this gene.

[**Key words**] *Sorbus aucuparia*; glycosyltransferases; full-length cDNA cloning; expression analysis

欧洲花楸 (*Sorbus aucuparia*) 为蔷薇科苹果亚科植物,原产于欧洲和亚洲等地^[1-2],含有黄酮、联苯、三萜和甾醇等多种化学成分,具有抗氧化、抑菌和止咳平喘等多种药理作用^[3-4]。研究表明,欧洲花楸及其同属植物花楸 (*S. pohuashanensis*) 等,在感染病原菌或受到酵母提取物 (YE) 刺激时,能引起生物量的改变,特别是能诱导欧洲花楸产生具有抗菌和真菌活性的联苯和二苯并呋喃类植保素^[5-8],有利于增强植物对环境的适应性。ZHOU 等^[9]用 YE 诱导花楸悬浮细胞,监测到联苯类植保素 2'-hydroxyaucuparin 和 noraucuparin 以及各自相应的糖苷的变化趋势,并进一步阐明了花楸悬浮细胞在 YE 诱导下先形成苷元,再在相应的糖基转移酶作用下生成糖苷的合成关系。目前,对欧洲花楸中有关联苯糖苷类合成相关的糖基转移酶的研究尚未见报道。

糖基转移酶 (glycosyltransferases, GT), 催化糖基从活化的供体分子转移到受体分子上,其与植物的防御反应、信号传导和激素调节等联系紧密^[10-12]。如拟南芥 *UGT79B2/79B3* 基因,可促进花青素糖基化,进而增强植株的耐逆性^[13], Augustin 等^[14]克隆到欧洲山芥的 4 条糖基转移酶基因,其中 *UGT73C10* 和 *UGT73C11* 可催化 hederagenin 3 位羟基糖基化,而阻止黄条纹跳蚤甲虫 (*Phyllotreta nemorum*) 的摄食, LI 等^[15]克隆到小麦的 1 条糖基转移酶基因 *HvUGT13248*,使禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 分泌的脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素 (DON) 糖基化,而使 DON 毒性降低,可见糖基转移酶广泛参与植物的生长发育。因此,挖掘和研究欧洲花楸中联苯类植保素糖苷合成相关糖基转移酶基因,为增强苹果亚科植物的抗病性奠定基础。

课题组前期利用 YE 刺激欧洲花楸悬浮细胞,

并进行了转录组测序,得到了相关糖基转移酶基因的全长序列。本研究通过聚合酶链式反应 (PCR) 技术从中克隆得到 2 条欧洲花楸的糖基转移酶基因,生物信息学分析显示其具有完整的糖基转移酶家族 PSPG 保守结构域^[16],通过诱导表达分析和原核表达对 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因进行研究,成功构建了原核表达载体,并得到了纯化的重组蛋白,为揭示 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因的功能提供了理论依据。

1 材料

欧洲花楸悬浮细胞系由中国科学院植物研究所叶和春研究员赠送。培养方法,MS 液体培养基中,于 25 ℃,120 r·min⁻¹ 黑暗条件下振荡培养。HIS-MBP-pET28a 表达载体来自于美国 Dr. Zhang 实验室 (Karmanos Cancer Institute)。

RNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司,批号 Q5609]; KOD-Plus-Neo 高保真酶 [东洋纺 (上海) 生物科技有限公司,批号 401]; 2 × TSINGKE Master Mix (北京擎科新业生物技术有限公司,批号 7SE004); Power SYBR Green PCR Master Mix (美国 ABI 公司,批号 1411477); BamHI 限制性内切酶 (New England Biolabs 公司,批号 0101507); T₄-DNA 连接酶 [普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司,批号 0000156368]; IPTG (北京江晨生物技术公司,批号 0847); pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit,质粒小提试剂盒,胶回收纯化试剂盒,大肠埃希菌 *Trans1-T1* 及大肠埃希菌 *Transetta* DE3 和 *Trans2K*® DNA Marker (北京全式金生物技术有限公司,批号分别为 K21204, J15Q037, C02P186, L160117, L100415, L20510); Color Prestained Protein Standard (美国 New England Biolabs,批号 0091608); 引物合成及测序服务由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。

2 方法

2.1 RNA 的提取与反转录 欧洲花楸悬浮细胞培养 5 d 后给予 YE 诱导,终质量浓度为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。诱导时间设定为 0,4,8,12,24 h。收取样品用液氮速冻后,置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。按照植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,将质量合格的 RNA 用反转录试剂盒获得 cDNA 置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 欧洲花楸糖基转移酶基因克隆 基于无缝克隆技术原理,按照 *pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit* 说明书,设计带 BamHI 酶切位点的 cDNA 无缝克隆引物,以 cDNA 为模板,见表 1。根据 KOD-Plus-Neo 说明书配制 PCR 体系, distilled water $32 \text{ } \mu\text{L}$, $10 \times$ PCR Buffer for KOD-Plus-Neo $5 \text{ } \mu\text{L}$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs $5 \text{ } \mu\text{L}$, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4 $3 \text{ } \mu\text{L}$, 正反向引物各 $2.5 \text{ } \mu\text{L}$, cDNA $1 \text{ } \mu\text{L}$, KOD-Plus-Neo $1 \text{ } \mu\text{L}$ 。反应程序: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 重复 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min。将 PCR 产物切胶回收后置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

表 1 *SaUGT1*, *SaUGT2* 基因无缝克隆引物

Table 1 Primers used in seamless cloning

引物名称	序列(5'-3')
SaUGT1-F	TCCAGGGGCCGAATTCGGAATGGGTGCCACAGCAGTAG
SaUGT1-R	GACGGAGCTCGAATTCGGCTAGATTTTTCTCAGTAGCAC
SaUGT2-F	TCCAGGGGCCGAATTCGGAATGTTTCTGTAGGAGAAG
SaUGT2-R	GACGGAGCTCGAATTCGGTTACAACGAAATTGATTCAC

2.3 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 表达载体构建 选择重组蛋白表达载体 HIS-MBP-pET28a, BamHI 作为载体构建的酶切位点。将切胶回收的 PCR 产物连接到 HIS-MBP-pET28a 表达载体上,并转化至大肠埃希菌 *Trans1-T1* 克隆感受态细胞中,涂布在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kana 的 LB 固体培养基上过夜培养,选取单克隆进行菌液 PCR 验证,并将阳性结果送公司测序验证,将测序结果正确的菌液扩大培养,保菌、提取质粒,将得到的重组质粒 HIS-MBP-pET28a-*SaUGT1* 和 HIS-MBP-pET28a-*SaUGT2*, 分别转化至大肠埃希菌 *Transetta* (DE3) 表达感受态细胞中,涂布在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kana 的 LB 固体培养基上过夜培养,选取单克隆进行菌液 PCR 验证,将条带正确的菌液扩大培养,保菌。

2.4 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因序列的生物信息学分析 将测序得到序列通过 InterPro 在线软件

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan>) 进行结构域分析, PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 进行二级结构预测, TargetP1.1server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 进行信号肽分析, ExPAS ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白相对分子质量和理论等电点, TRMHMM server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜域分析。根据 NCBI BLAST 结果下载同源序列,分别使用 DNAMAN 软件和 MEGA 6.0 软件进行多重序列比对和系统进化树的构建。

2.5 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因的表达分析 以 YE 诱导不同时间样品的 cDNA 为模板,选取 actin 作为看家基因,检测欧洲花楸悬浮细胞中糖基转移酶 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因表达量的变化,设计实时荧光定量引物,见表 2。反应体系: $2 \times$ SYBR Green Mix $5 \text{ } \mu\text{L}$, 正反向引各 $0.5 \text{ } \mu\text{L}$, cDNA $1 \text{ } \mu\text{L}$, ddH₂O 补足至 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。反应程序: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环。每个循环后采集荧光信号, $60 \sim 95 \text{ }^\circ\text{C}$ 做溶解曲线分析。反应结束后分析扩增曲线和溶解曲线。每个样品做技术重复 3 次,并通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[17] 分析 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因的相对表达量。

表 2 *SaUGT1*, *SaUGT2* RT-PCR 引物

Table 2 Primers used in RT-PCR

引物名称	序列(5'-3')
actin-F	AGCCTTCACCATTCAGTTC
actin-R	GTCTTCGTTCTCTTCGTCTT
SaUGT1-F	ACCTTCATTCGGACTTCAGATAC
SaUGT1-R	CATCTGGCTCTAAGGCATCAA
SaUGT2-F	GGACTTGCACCACTCAAAGA
SaUGT3-R	GGAGATCCCTCAAACGGATATG

2.6 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 的蛋白表达分析 将保存的菌液扩大培养于 200 mL 含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kana 的 LB 液体培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇到 A_{600} 约 0.6, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $16 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 诱导 12 h。将诱导完的菌液 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $8\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集菌体,用 ddH₂O 清洗 2 次,最后用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 10 mL 重悬菌体。将重悬菌液置于冰中,用超声波细胞破碎机超声破碎 (30% 振幅, 超声 5 s, 间隔 5 s, 持续 5 min), 破碎后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心

15 min, 上清即为蛋白粗提物。

按照 Ni-Agarose Resin 说明书, 将 Ni 琼脂糖凝胶填料混匀后加入色谱柱, 室温静置 10 min, 将保存液乙醇放出, 用 5 BV 的去离子水洗净乙醇, 再用 10 BV 磷酸盐缓冲液平衡镍柱后, 上样, 控制流速为 10 BV·h⁻¹, 依次用 10 BV 的 50, 100 mmol·L⁻¹ 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱杂蛋白, 分别用 200, 300 mmol·L⁻¹ 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱 SaUGT1 和 SaUGT2 蛋白, 最后依次用 5 BV 500 mmol·L⁻¹ 咪唑的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和 ddH₂O 洗涤镍柱, 最后用 20% 乙醇封存镍柱于 4 °C 冰箱。将含 SaUGT1 和 SaUGT2 蛋白的流分过 10 kDa 超滤管进行脱盐浓缩, 并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳检测。

3 结果

3.1 欧洲花楸全长 cDNA 的获得 分别设计 2 对带 BamHI 酶切位点的特异性引物, 以欧洲花楸悬浮细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 500 bp 附近有明亮条带, 与预期目的条带大小一致。测序结果表明, SaUGT1 的 ORF 大小为 1 458 bp, 编码 485 个氨基酸; SaUGT2 的 ORF 大小为 1 431 bp, 编码 476 个氨基酸。见图 1。

3.2 欧洲花楸糖基转移酶的生物信息学分析

3.2.1 理化性质与结构域分析 SaUGT1 和 SaUGT2 蛋白的相对分子质量分别为 54.27 kDa 和 53.49 kDa。信号肽分析显示无信号肽, 跨膜域分析结果表明其为非膜蛋白, 无分泌蛋白。结构域分析

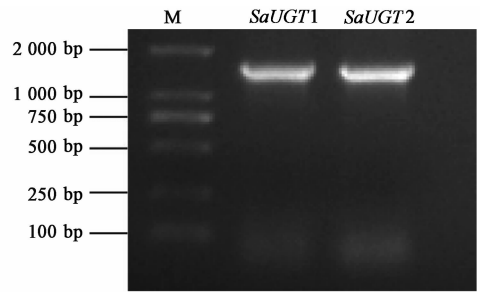
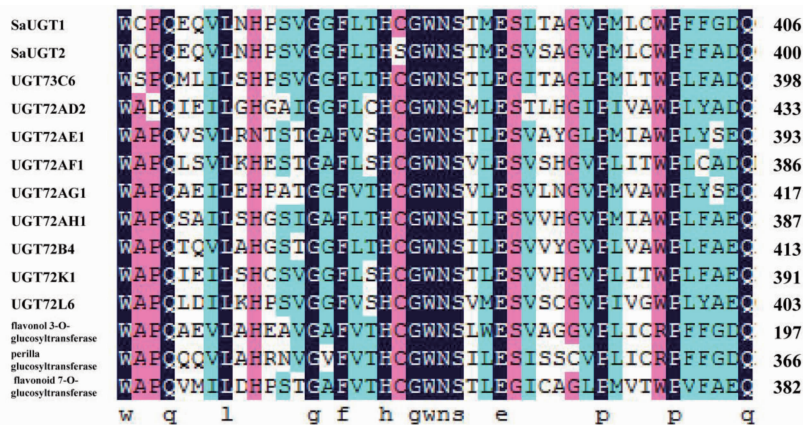


图 1 欧洲花楸糖基转移酶 SaUGT1 和 SaUGT2 基因全长克隆 PCR 产物电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of full-length cDNA of SaUGT1 and SaUGT2

表明, SaUGT1 在 363 ~ 406 aa 处含有糖基转移酶结构域, SaUGT2 在 357 ~ 400 aa 处含有糖基转移酶结构域。二级结构预测结果显示, SaUGT1, 无规则卷曲和 α-螺旋结构是其主要结构原件, 无规则卷曲占 47.63%, α-螺旋结构占 40.21%; SaUGT2, 无规则卷曲和 α-螺旋结构是其主要结构原件, 无规则卷曲占 47.27%, α-螺旋结构占 38.87%。

3.2.2 同源性比对及系统进化分析 利用 DNAMAN 软件将 SaUGT1 和 SaUGT2 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), 野大豆 (*Glycine soja*), 大豆 (*Glycine max*), 葡萄 (*Vitis vinifera*), 野葛 (*Pueraria montana* var. *lobata*), 蒺藜状苜蓿 (*Medicago truncatula*), 鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*), 菜豆 (*Phaseolus vulgaris*), 紫苏 (*Perilla frutescens*) 和黄芩 (*Scutellaria baicalensis*) 糖基转移酶的氨基酸进行多重序列比对, 比对结果见图 2。

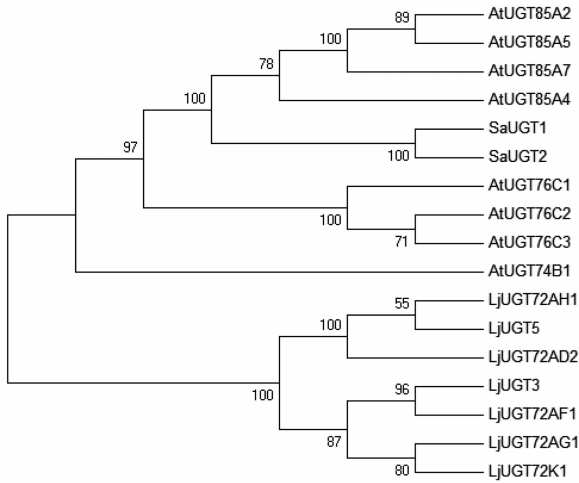


UGT73C6. 拟南芥糖基转移酶 (NP_181217); UGT72AD2. 野大豆糖基转移酶 (KT_895082); UGT72AE1. 大豆糖基转移酶 (KP_410265); UGT72AF1. 葡萄糖基转移酶 (KT_895083); UGT72AG1. 野葛糖基转移酶 (KT_895084); UGT72AH1. 蒺藜状苜蓿糖基转移酶 (KT_895085); UGT72B4. 鹰嘴豆糖基转移酶 (AK_336772); UGT72K1. 大豆糖基转移酶 (KP_410266); UGT72L6. 菜豆糖基转移酶 (KT_895087); flavonoid 3-O-glucosyltransferase. 葡萄糖基转移酶 (AF_000372); glucosyltransferase. 紫苏糖基转移酶 (AB_002818); flavonoid 7-O-glucosyltransferase. 黄芩糖基转移酶 (AB_031274)

图 2 UGT 序列与其他植物多重序列比对

Fig.2 Multiple alignment of amino acid sequences of UGT

SaUGT1 和 *SaUGT2* 基因含有糖基转移酶基因的高度保守 PSPG (plant secondary product glycosyltransferase) 结构域,且最后一个氨基酸为谷氨酰胺^[18],符合糖基转移酶序列特征。进化树分析表明,欧洲花楸糖基转移酶 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 与拟南芥中 85 家族糖基转移酶亲缘关系最近,见图 3。



AtUGT85A2. 拟南芥 UDP-glucosyltransferase 85A2 (NP_173653.1);
AtUGT85A5. 拟南芥 UDP-glucosyltransferase 85A5 (NP_973885.1);
AtUGT85A7. 拟南芥 UDP-glucosyltransferase 85A7 (NP_173652.1);
AtUGT85A4. 拟南芥 UDP-glucosyltransferase 85A4 (NP_177950.1);
AtUGT76C1. 拟南芥 UDP-glucosyltransferase 76C1 (NP_196206.1);
AtUGT76C2. 拟南芥 UDP-glucosyltransferase 76C2 (NP_196205.1);
AtUGT76C3. 拟南芥 UTP-glucosyltransferase 76C3 (BAB10795.1);
AtUGT74B1. 拟南芥 UDP-glucosyltransferase 74B1 (NP_173820.1);
LjUGT72AH1. 百脉根 flavonol glycosyltransferase UGT72AH1 (KT895085.1);
LjUGT5. 百脉根 isolate LjUGT5 flavonoid glycosyltransferase (KP410266.1);
LjUGT72AD2. 百脉根 flavonol glycosyltransferase UGT72AD2 (KT895082.1);
LjUGT3. 百脉根 isolate LjUGT3 flavonoid glycosyltransferase (KP410265.1);
LjUGT72AF1. 百脉根 flavonol glycosyltransferase UGT72AF1 (KT895083.1);
LjUGT72AG1. 百脉根 flavonol glycosyltransferase (KT895083.1);
LjUGT72K. 百脉根 flavonol glycosyltransferase UGT72K1 (KT895087.1)

图 3 UGTs 系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of UGTs with *Arabidopsis thaliana* UDP-glucosyl transferase

3.3 YE 诱导 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因表达分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 YE 诱导花楸悬浮细胞不同时间后 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因的相对表达量。分析结果显示, YE 能显著提高 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因的表达量,并在 24 h 和 12 h, *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因表达量达到最高水平,分别为 0 h 的 2 倍和 7 倍。见图 4。

3.4 IPTG 诱导 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 蛋白表达分析

将诱导表达的 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 蛋白纯化的 SDS-PAGE 扫描结果表明,在 IPTG 诱导大肠埃希菌

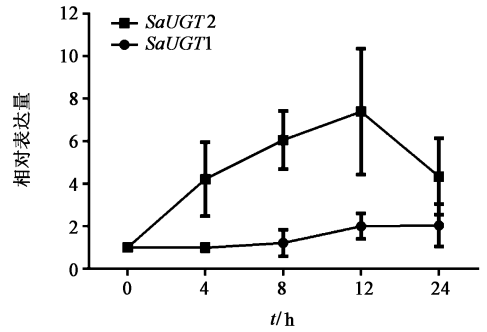
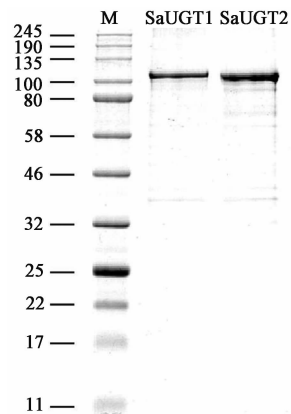


图 4 YE 诱导 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 不同时间相对表达量 (n = 3)

Fig. 4 Expression analysis of *SaUGT1* and *SaUGT2* at different treatment time by RT-PCR (n = 3)

Transetta (DE3) 表达后,重组质粒 HIS-MBP-pET28a-*SaUGT1* 和 HIS-MBP-pET28a-*SaUGT2* 条带均在 100 kDa 处有蛋白条带,说明欧洲花楸糖基转移酶基因 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 均成功在大肠埃希菌 *Transetta* (DE3) 中成功表达。见图 5。



M. Marker; SaUGT1. HIS-MBP-pET28a-*SaUGT1* 重组蛋白纯化条带;
SaUGT2. HIS-MBP-pET28a-*SaUGT2* 重组蛋白纯化条带

图 5 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 纯化蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein of HIS-MBP-pET28a-*SaUGT1* and HIS-MBP-pET28a-*SaUGT2* protein purification

4 讨论

糖基转移酶能够催化糖基从活化的供体分子转移到受体分子上,属于高度分化的多成员基因家族^[15],但也具有相似的 PSPG 保守结构域。本研究选择拟南芥和百脉根等多条糖基转移酶基因进行进化树分析和氨基酸序列比对,发现 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因与拟南芥 UGT85 家族亲缘关系较近,且具有典型的糖基转移酶保守结构域。由于苹果亚科糖基转移酶目前鲜有报道,且糖基转移酶家族种类繁多,该糖基转移酶的糖基化功能有待进一步验证。

本研究首次克隆得到 2 条欧洲花楸糖基转移酶

基因 cDNA 的全长。实时荧光定量结果显示, YE 能显著提高 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因的表达量, 且在 24 h 和 12 h 表达量达到最大值, 分别为对照组的 2 倍和 7 倍, 对比文献对花楸悬浮细胞生物量动态监测结果^[13], *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因表达量较高水平的的时间点在 2'-hydroxyaucuparin 和 noraucuparin 糖苷达到最大积累量之前, 因此, 在一定程度上, YE 通过诱导糖基转移酶基因表达水平的上调来提高联苯类糖苷的合成。同时, 本文也构建了原核表达载体, 成功地在大肠埃希菌中对 *SaUGT1* 和 *SaUGT2* 基因进行了异源表达, 为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

[致谢] 感谢 Karmanos Cancer Institute (美国) Xiaohong Zhang 博士提供 HIS-MBP-pET28a 质粒。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 36 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1974: 284.

[2] 贾宏丽, 周良云, 王升, 等. 茉莉酸通路参与 HpaI 诱导的欧洲花楸细胞植保素生物合成[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2928-2934.

[3] 魏杰, 石佳, 侯潇, 等. 欧洲花楸的化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2014, 41(4): 362-368.

[4] 陈永钧, 龙晓英, 潘素静, 等. 黄酮类化合物的药效机制及构效关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 337-344.

[5] 黄蕾, 肖文娟, 刘超, 等. 3 种重金属对欧洲花楸悬浮细胞生物量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 226-229.

[6] Hrazdina G, Borejsza-Wysocki W, Lester C. Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *Venturia inaequalis*[J]. Phytopathology, 1997, 87(8): 868-876.

[7] Chizzali C, Khalil M N, Beuerle T, et al. Formation of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins in the transition zones of fire blight-infected stems of *Malus domestica* cv. 'Holsteiner Cox' and *Pyrus communis* cv. 'Conference'[J]. Phytochemistry, 2012, 77: 179-185.

[8] Chizzali C, Beerhues L. Phytoalexins of the pyrinace:

biphenyls and dibenzofurans[J]. Beilstein J Org Chem, 2012, 8(1): 613-620.

[9] ZHOU L, YANG J, YANG G, et al. Biphenyl phytoalexin in *Sorbus pohuashanensis* suspension cell induced by Yeast extract[J]. Molecules, 2016, 21(9): 1180.

[10] Campbell J A, Davies G J, Bulone V, et al. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochem J, 1997, 326(3): 929.

[11] Vogt T, Jones P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family [J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(9): 380-386.

[12] Tiwari P, Sangwan R S, Sangwan N S. Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: an update on expanding knowledge and scopes [J]. Biotechnol Adv, 2016, 34(5): 714-739.

[13] 李攀. 拟南芥和玉米糖基转移酶基因参与非生物胁迫耐性的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.

[14] Augustin J M, Drok S, Shinoda T, et al. UDP-glycosyltransferases from the UGT73C subfamily in *Barbarea vulgaris* catalyze saponin 3-O-glucosylation in saponin-mediated insect resistance[J]. Plant Physiol, 2012, 160(4): 1881-1895.

[15] LI X, Shin S, Heinen S, et al. Transgenic wheat expressing a barley UDP-glycosyltransferase detoxifies deoxynivalenol and provides high levels of resistance to *Fusarium graminearum*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2015, 28(11): 1237-1246.

[16] 秦晶晶, 孙春玉, 张美萍, 等. 植物 UDP-糖基转移酶分类、功能以及进化[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(1): 440-450.

[17] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.

[18] Kubo A, Arai Y, Nagashima S, et al. Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation[J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 429(2): 198-203.

[责任编辑 顾雪竹]