

滇重楼糖基转移酶基因的克隆和原核表达

郭思远¹, 尹艳^{1,2}, 石颖慧¹, 李佳¹, 高伟^{1,3*}, 张夏楠^{1*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488;
3. 首都医科大学 药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的:克隆滇重楼皂苷类成分生物合成途径中关键酶糖基转移酶基因(*PpUGT1*, *PpUGT7*),并对其进行生物信息学分析、相对表达量分析和原核表达。方法:试剂盒法提取滇重楼RNA并反转录,根据滇重楼转录组数据设计特异性引物,克隆基因全长,使用软件对其进行生物信息学分析,利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测基因相对表达量,构建原核表达载体并在大肠埃希菌中诱导表达目的蛋白。结果:*PpUGT1*和*PpUGT7*分别长1 827 bp和1 380 bp,分别编码608和459个氨基酸,相对分子质量分别为67.6 kDa和51.3 kDa,其中*PpUGT1*预测为甾体类糖基转移酶,*PpUGT7*预测为三萜类糖基转移酶。两蛋白均为亲水性蛋白,无跨膜结构,无信号肽,均与同类蛋白具有较高的保守性。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)结果显示,*PpUGT1*的表达量由高到低依次为根>叶>花>茎,*PpUGT7*的表达量由高到低依次为茎>叶>花>根。此外,成功在大肠埃希菌中以可溶形式表达目的蛋白。结论:克隆得到*PpUGT1*和*PpUGT7*基因,证明其在不同植物器官中存在差异表达,并在大肠埃希菌中成功表达其重组蛋白,为进一步鉴定*PpUGTs*功能、解析滇重楼中皂苷类成分生物合成途径奠定基础。

[关键词] 滇重楼;糖基转移酶;基因克隆;生物信息学分析;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR);原核表达

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)08-0126-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210411

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210125.1246.004.html>

[网络出版日期] 2021-1-25 15:22

Cloning and Prokaryotic Expression of Glycosyltransferase Genes from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

GUO Si-yuan¹, YIN Yan^{1,2}, SHI Ying-hui¹, LI Jia¹, GAO Wei^{1,3*}, ZHANG Xia-nan^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
3. School of Pharmaceutical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To clone the full-length glycosyltransferase genes (*PpUGT1*, *PpUGT7*) related to saponins biosynthesis in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, and perform bioinformatics analysis, relative expression analysis and prokaryotic expression analysis. **Method:** Total RNA was isolated from *P. polyphylla* var. *yunnanensis* with use of the Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit and converted to cDNA. Specific primers were designed according to the transcriptome data to clone the full-length gene. Relevant software was then used for bioinformatic analysis of the protein sequences. The relative gene expression levels were detected

[收稿日期] 20201117(028)

[基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302-1806-03);国家自然科学基金面上项目(81974515);北京市自然科学基金面上项目(7182018)

[第一作者] 郭思远, 硕士, 从事中药资源与分子生药学研究, Tel: 010-83950333, E-mail: 854013547@qq.com

[通信作者] * 高伟, 博士, 教授, 从事中药资源与分子生药学研究, Tel: 010-83916572, E-mail: weigao@ccmu.edu.cn;

* 张夏楠, 博士, 副教授, 从事中药资源与分子生药学研究, Tel: 010-83911633, E-mail: xnzhang@ccmu.edu.cn

by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and the prokaryotic expression vectors were built to heterologously express recombinant protein in *Escherichia coli*. **Result:** The open reading frame (ORF) of *PpUGT1* was 1 827 bp, encoding 608 amino acids, and was predicted as a steroid glycosyltransferase; the ORF of *PpUGT7* was 1 380 bp, encoding 459 amino acids, and was predicted as a triterpenoid glycosyltransferase. The calculated relative molecular mass of two proteins were 67.6 kDa and 51.3 kDa respectively, and both of them were hydrophilic proteins, no transmembrane domain, no signal peptides, both showing high similarity and conservativeness with homologous sequences. The results of Real-time PCR showed that the expression level of *PpUGT1* was root>leaf>flower>stem; the expression level of *PpUGT7* was stem>leaf>flower>root. In addition, PpUGTs proteins were expressed in *E. coli*. in a soluble form. **Conclusion:** The genes of *PpUGT1* and *PpUGT7* were cloned successfully. Real-time PCR showed the genes were expressed differently in different plant organs, and their recombinant proteins were successfully expressed in *Escherichia coli*. This study lays a foundation for functional characterization of PpUGTs and analysis of the biosynthesis pathway of saponins in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*.

[Key words] *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; glycosyltransferase; gene cloning; bioinformatics analysis; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR); prokaryotic expression

滇重楼系百合科重楼属植物,以干燥的根茎入药,临床常用于疮痍脓肿、咽喉肿痛、虫蛇咬伤等,是云南白药、热毒清、宫血宁等中成药的重要组成药物。甾体皂苷是滇重楼中主要的活性成分,具有显著地抗肿瘤^[1]、抗菌^[2]、抗炎^[3]和驱虫^[4]活性,并对血液系统具有溶血、清除自由基、抗缺氧缺血等药理作用^[5]。滇重楼中皂苷类化合物的种类丰富,其中苷元以异螺甾烷醇类甾体皂苷元为主^[6],如薯蓣皂苷元和偏诺皂苷元,此外还含有呋甾烷醇类甾体皂苷元^[7]、齐墩果烷型三萜皂苷元^[8-9]等。苷元多在3位与糖基连接成苷,主要包括葡萄糖、鼠李糖和阿拉伯糖等,少量苷元在其他位连糖^[6]。

糖基化是苷类化合物合成的最后一步,是化合物结构修饰的重要方式^[10],其可以增加苷元的亲水性^[11]和稳定性^[12],改善苷元的生物活性^[13]。糖基转移酶即催化糖基化发生的酶,该类酶可以通过合成糖苷键将糖基连接到特定受体^[14],是苷类化合物生物合成途径中的关键酶。糖基转移酶可根据多种方式进行分类,如空间结构、反应机制、糖基化位点和 Carbohydrate-active ENZYMES database (CAZy) 等,其中根据催化特异性和序列相似度,CAZy将糖基转移酶划分为99个家族,以 Family I 与植物的次生代谢最为相关^[15]。Family I 为尿苷二磷酸-糖基转移酶(UGT),其通常以尿苷二磷酸-糖(UDP-糖)作为糖基供体,如 UDP-葡萄糖,UDP-鼠李糖,UDP-木糖等。UGT的C端保守性高,这可能与结合UDP-糖有关;N端的变异则较为显著,可能用来结合不同类型的糖基受体,如黄酮类、甾体类、萜类、

生物碱类和糖类等。在不同的植物中,许多重要的糖基转移酶基因已被克隆并鉴定功能^[16-17],如从马利筋中克隆的甾体糖基转移酶UGT74AN1,其可以催化53种不同底物形成O,N,S苷^[18];从燕麦中克隆的三萜糖基转移酶AsAAT1,可以在三萜骨架C-3位特异性添加阿拉伯糖^[19];从穿心莲中克隆的二萜糖基转移酶ApUGT,能以100%的转化率催化新穿心莲内酯苷元生成穿心莲内酯^[20]。这些酶的表征既丰富了可用的基因资源,又为生物合成苷类化合物提供了高效的分子工具。

目前,滇重楼中薯蓣皂苷元的生物合成途径已被解析^[21],而负责后续糖基化的酶却鲜有报道。本研究通过分析滇重楼转录组数据,筛选克隆到2条糖基转移酶基因全长,并对其进行生物信息学分析、基因相对表达量分析及蛋白体外表达等研究,为进一步鉴定 *PpUGTs* 基因功能、解析滇重楼中皂苷类成分生物合成途径奠定基础。

1 材料

滇重楼采自云南省,经首都医科大学张夏楠副教授鉴定为百合科植物滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*。取其根、茎、叶、花洗净后至于-80 °C 冰箱保存备用。

Eastep® Super Total RNA Extraction Kit 试剂盒,GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒(Promega 生物公司,批号分别为0000307741,0000209334);Phusion High-Fidelity 聚合酶链式反应(PCR) Master Mix Buffer,EcoR I -HF,Not I -HF,Cutsmart Buffer(New England Biolabs 公司,批

号分别为10047033, 0091408, 0151801, 2881712); pEASY-Blunt Zero 克隆载体, Transetta(DE3)感受态细胞, Blue Plus Protein Marker(北京全式金生物技术有限公司, 批号分别为#N61211, #N221011, #M20110); DH5 α 感受态细胞(康为世纪生物科技有限公司, 批号03688); EasyGeno 快速重组克隆试剂盒, FastKing RT kit 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司, 批号分别为#R6419, #Q6211]; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)(Inalco 公司, 批号P13/342/129); KAPA SYBR $^{\text{®}}$ FAST Universal 试剂盒(美国Sigma-Aldrich 公司, 批号0000086119); 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶快速配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 批号091619191101); pET-32a $^+$ 表达载体, HIS-MBP-pET28a 表达载体为本实验室保存; 其他化学试剂均

为国产分析纯。

2 方法

2.1 RNA 提取及反转录 参照 Eastep $^{\text{®}}$ Super Total RNA Extraction Kit 试剂盒说明书, 提取滇重楼根的总 RNA, 使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。参照 GoScript $^{\text{™}}$ Reverse Transcription System 试剂盒说明书, 将 RNA 反转录合成 cDNA。

2.2 滇重楼 *PpUGTs* 基因克隆 分析滇重楼转录组数据, 筛选得到潜在糖基转移酶基因 2 条, 分别命名为 *PpUGT1* 和 *PpUGT7*。使用 ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)在线软件对序列进行开放阅读框(ORF)分析, 运用 Primer Premier 5.0 软件在 ORF 两端设计引物, PCR 引物序列信息见表 1。引物序列委托北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR Primers sequence

引物	序列(5'-3')	用途	长度/bp
PpUGT1	上游 ATGATCACAGTGAATGGAATGGCGA	基因克隆	25
	下游 CTACAAAAAAAAACCCCAAGGGAAAACAAC		29
PpUGT7	上游 ATGTGCTCTCCACCGCCCC		19
	下游 TCATTTCATGGCATCCGCAAAG		22
EcoR I -U1	上游 CTGATATCGGATCCGAATTCATGATCACAGTGAATGGAATG	原核表达载体构建	41
Not I -U1	下游 CTCGAGTGC GGCCGCTACAAAAAAAAACCCCAAG		34
EcoR I -U7	上游 TGATATCGGATCCGAATTCATGTGCTCTCCACCGCCCCA		39
Not I -U7	下游 GGTGCTCGAGTGC GGCCGCTCATTTCATGGCATCCG		36
U1-RT	上游 CCAACCACTATTGTCCCCT	时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)	20
	下游 TTTGCCAATACCATCGCTCG		20
U7-RT	上游 ATCCGATCCACCAACGAGTT		20
	下游 ATCCGTCAGCAGCATCGATA		20

候选基因以滇重楼 cDNA 为模板, 使用克隆引物及 Phusion High-Fidelity PCR Master Mix Buffer 进行 PCR 扩增, PCR 产物经切胶回收后连接至 pEASY- Blunt Zero 克隆载体并转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 转化子在含有氨苄的 LB 固体培养基中培养约 12 h, 挑取阳性单菌落于液体培养基中培养约 6 h, 菌液 PCR 无误后送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

2.3 滇重楼 *PpUGTs* 基因生物信息学分析 使用 Editseq 软件将糖基转移酶基因核苷酸序列翻译成氨基酸序列; 使用 ExPASy 中 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam>)预测蛋白相对分子质量与理论等电点; 使用 TMHMM server v2.0([\[www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/\]\(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/\)\)进行跨膜结构分析; TargetP 3.0 server\(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>\)进行信号肽分析。使用国际生物基因数据库\(NCBI\)\(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>\)中蛋白-蛋白 BLAST 工具进行氨基酸序列比对, 根据 BLAST 结果下载同源序列, 使用 DNAMAN 软件进行多重比对, 使用 MEGA 6.0 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树。使用 PRABI-GERLAND\(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>\)进行蛋白二级结构预测; SWISS-MODEL\(<http://swissmodel.expasy.org/>\)进行蛋白三维模型预测。](http://</p></div>
<div data-bbox=)

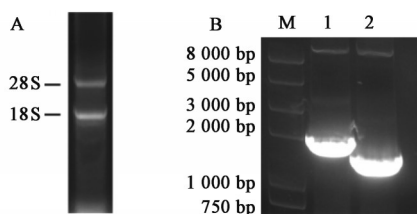
2.4 滇重楼 *PpUGTs* 基因 Real-time PCR 分析 取存于 -80 $^{\circ}$ C 的滇重楼的不同器官提取 RNA, 参照

FastKing RT kit试剂盒说明书进行反转录。以获得的cDNA为Real-time PCR模板,选取*GAPDH*基因为内参,使用引物进行*PpUGTs*基因的表达分析。每组基因进行3个生物学重复,3个技术重复,检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析^[22]。

2.5 滇重楼 *PpUGTs* 基因原核表达 参照EasyGeno快速重组克隆试剂盒说明书,将*PpUGT1*,*PpUGT7*基因插入原核表达载体HIS-MBP-pET28a的EcoR I和Not I位点之间并转化至大肠埃希菌Transetta(DE3)中。转化子在含有氨苄的LB固体培养基中培养约12 h,挑取阳性单菌落于液体培养基中培养约6 h,菌液PCR无误后送公司测序。取空载体转化子及阳性重组转化子在含有氨苄的LB液体培养基中培养至吸光度 $A_{600\text{nm}}$ 在0.6~1.0,加入IPTG至终浓度 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $16\text{ }^\circ\text{C}$ 诱导表达24 h。 $4\text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000\times g$ 离心3 min收集菌体,以 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 7.4)10 mL重悬,在冰浴下以5 s/5 s超声破碎10 min,低温离心后取上清进行SDS-PAGE。

3 结果与分析

3.1 总RNA提取结果 以1.0%琼脂糖凝胶电泳检测滇重楼根的总RNA,28S和18S条带清晰完整,见图1。经检测,总RNA质量浓度在 $300\sim 500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $A_{260/280}$ 介于2.0~2.2, $A_{260/230}>1.8$,符合实验要求。



A. 滇重楼根的总RNA琼脂糖凝胶电泳;B. 糖基转移酶基因的ORF扩增;M.Marker;1.*PpUGT1*;2.*PpUGT7*

图1 滇重楼糖基转移酶基因(*PpUGTs*)凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of glycosyltransferase gene from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

3.2 滇重楼 *PpUGTs* 基因克隆结果 以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,目的条带介于1 000~2 000 bp,与预期长度一致,见图1B。阳性克隆测序结果与转录组原序列比对,相似度99%,表明克隆成功。*PpUGT1*基因(GenBank:MT160184)ORF区长1 827 bp,编码608个氨基酸;*PpUGT7*基因(GenBank:MT160185)ORF区长1 380 bp,编码459个氨基酸。

3.3 *PpUGTs* 蛋白理化性质预测 *PpUGT1*相对分

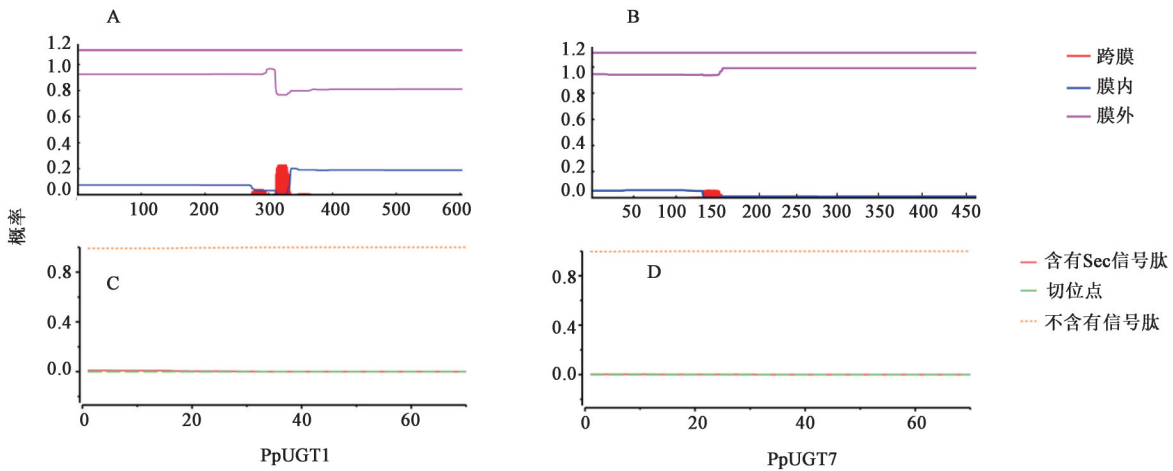
子质量为67 570.60 Da,理论等电点为5.94,带负电残基(Asp+Glu)69个,正电残基(Arg+Lys)57个;不稳定系数为41.68,属于不稳定蛋白;脂肪系数为86.45,总疏水指数为-0.077,预测为亲水性蛋白;蛋白中含量最高的为亮氨酸(9.2%),含量最低的为半胱氨酸和色氨酸(2.0%)。*PpUGT7*相对分子质量为51 340.76 Da,理论等电点为5.75,带负电残基(Asp+Glu)57个,正电残基(Arg+Lys)47个;该蛋白的不稳定系数为39.98,属于稳定蛋白;脂肪系数为80.96,总疏水指数为-0.128,预测为亲水性蛋白;蛋白中含量最高的为亮氨酸(8.3%),含量最低的为酪氨酸(1.5%)。

3.4 *PpUGTs* 蛋白跨膜结构域与信号肽分析 跨膜结构域分析显示,*PpUGTs*均不存在跨膜结构,为膜外蛋白,见图2。信号肽分析显示,*PpUGT1*和*PpUGT7*含有Sec信号肽(Sec/SPI)的可能性分别为0.002 2和0.008 5,不含有信号肽(Other)的可能性分别为0.997 8和0.991 5,预测两者均不含信号肽,为非分泌蛋白,见图2。推测*PpUGTs*可能在细胞质中发挥其功能。

3.5 *PpUGTs* 蛋白二级结构分析 *PpUGTs*的二级结构由 α -螺旋、延伸链和无规则卷曲构成,见图3,其中无规则卷曲是主要组成元件,在*PpUGT1*和*PpUGT7*中分别占比59.21%和59.26%;其次为 α -螺旋,分别占比32.07%和33.12%;延伸链分别占比8.72%和7.63%,分散于肽链的不同部位。

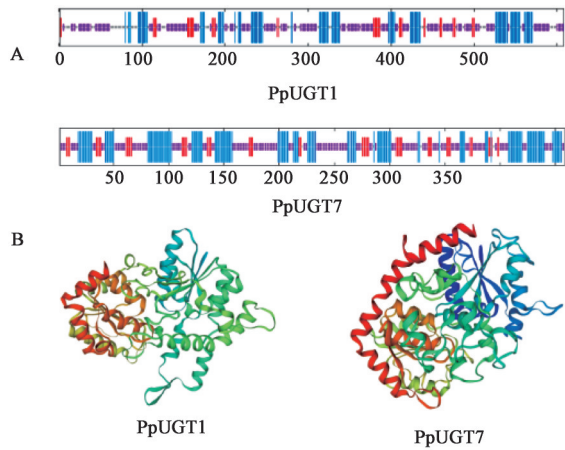
3.6 *PpUGTs* 蛋白三级结构预测分析 三级结构预测分析显示,*PpUGT1*蛋白与酿酒酵母甾醇3- β -葡萄糖基转移酶(UGT51)具有36.65%的序列相似性,以该蛋白(SMTL ID:5g15.1)B链为模板,通过同源建模构建*PpUGT1*蛋白的三级结构,建模范围为157~554位氨基酸,见图3。*PpUGT7*蛋白与拟南芥中葡萄糖基转移酶(UGT74F2)具有39.51%的序列相似性,以该蛋白(SMTL ID:5u6s.2)A链为模板,通过同源建模构建*PpUGT7*蛋白的三级结构,建模范围为7~459位氨基酸。*PpUGT1*内部具有1个由多个氨基酸残基组成的结合基序,可使尿苷-5'-二磷酸葡萄糖配体通过氢键, π 堆叠,盐桥等相互作用与其结合;*PpUGT7*内部含有4个结合基序,可分别使 β -D-葡萄糖,3-O- β -D-吡喃葡萄糖基- β -D-吡喃葡萄糖,尿苷-5'-二磷酸,2-溴苯甲酸通过不同的相互作用与其结合。

3.7 *PpUGTs* 系统进化分析及多序列比对 选取不同物种中已表征功能的糖基转移酶构建系统进化



A, B. PpUGTs 跨膜结构域预测; C, D. PpUGTs 信号肽分析
图2 滇重楼 PpUGTs 蛋白跨膜结构域与信号肽分析

Fig. 2 PpUGTs protein analysis of transmembrane domain and signal peptide analysis from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*



A. PpUGTs 二级结构分析; B. PpUGTs 三级结构预测

图3 滇重楼 PpUGTs 二级结构分析及三级结构预测

Fig. 3 PpUGTs analysis of secondary structure and prediction of tertiary structure from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

树,结果显示这些酶主要聚为3类,即三萜类糖基转移酶、黄酮类糖基转移酶和甾体类糖基转移酶,见图4。其中,PpUGT1与甾体类糖基转移酶聚为一支,PpUGT7与三萜类糖基转移酶聚为一支,由此推测两个酶的受体可能分别为甾体和三萜类化合物。

根据系统进化分析结果,分别选取亲缘关系最近的蛋白序列进行多序列比对。在PpUGT1与甾体类糖基转移酶的序列比对中,氨基酸序列一致性为60.26%,蛋白中部及C端的氨基酸序列保守性较高,且PpUGT1中部存在1个甾体结合结构域,即PSBD^[23](putative steroid-binding domain),蛋白N端氨基酸序列则存在较大差异,见图5;在PpUGT7与三萜类糖基转移酶的序列比对中,氨基酸序列一致

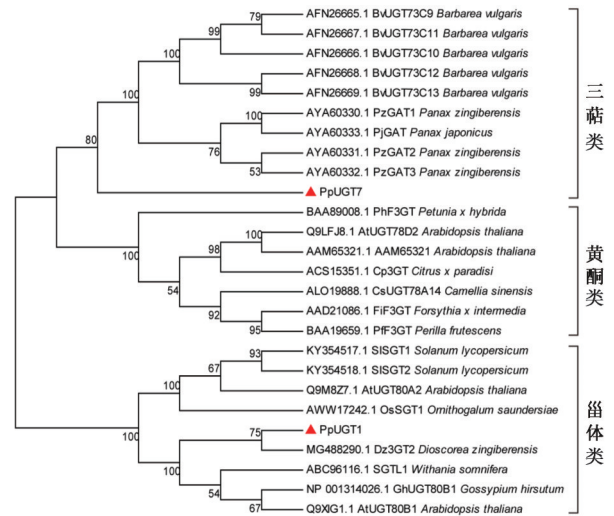


图4 糖基转移酶氨基酸序列系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of glycosyltransferases

性为66.85%,蛋白N,C端的氨基酸序列保守性较高,PpUGT7蛋白的C端存在1个由44个氨基酸构成的UDP-糖结合结构域PSPG box(plant secondary product glycosyltransferase box)^[14],见图6。

3.8 PpUGTs 基因的相对表达量 对滇重楼根、茎、叶、花中PpUGTs基因进行相对表达量分析见表2,结果显示PpUGTs在不同植物器官中存在差异表达,其中PpUGT1的转录水平为根>叶>花>茎,PpUGT7的转录水平为茎>叶>花>根,由此推测PpUGT1和PpUGT7可能分别在滇重楼的根和茎中参与皂苷类成分的生物合成。

3.9 PpUGTs 蛋白的原核表达 在进行原核表达时,目的蛋白通常会以融合蛋白的形式表达,融合



红色框.PSBD结构域;蓝色框.保守结构域

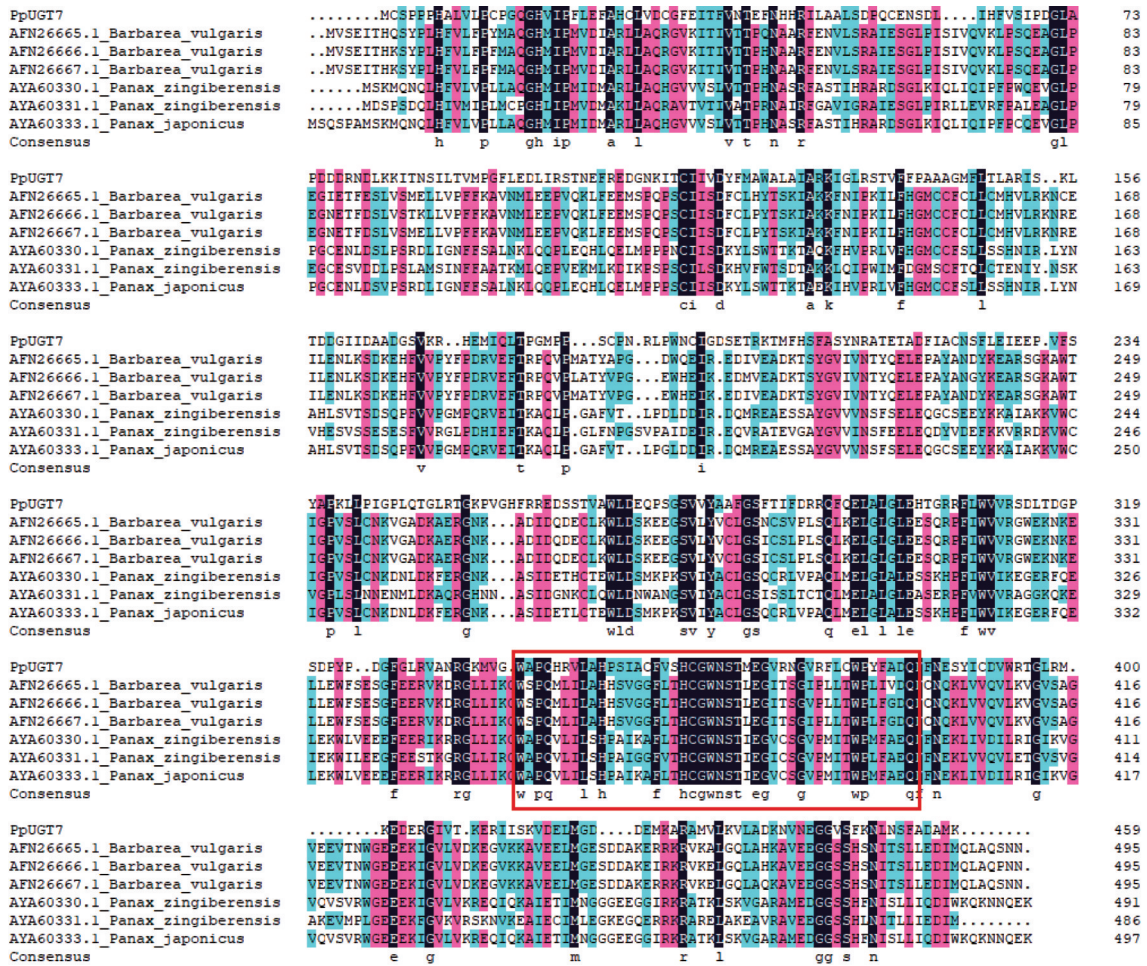
图5 PpUGT1与其他甾体糖基转移酶的多序列比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment of PpUGT1 and other plant steroid glycosyltransferases

蛋白的相对分子质量为目的蛋白与载体所含标签的相对分子质量之和。SDS-PAGE检测PpUGTs的原核表达见图7,含有目的基因的菌体破碎上清液在预期位置出现特异蛋白条带(PpUGT1融合蛋白约110 kDa, PpUGT7融合蛋白约94 kDa),这表明PpUGTs融合蛋白成功以可溶形式在大肠埃希菌中表达。

4 讨论

糖基转移酶是生物合成途径上最接近活性皂苷的结构修饰酶,其对受体的糖基作用有显著影响。研究表明^[24],由于糖基化修饰的不同,多种类型的人参皂苷能够发挥不同甚至相反的药理作用。相比于化学合成方法,糖基转移酶能在苷元特定位点以特定构型添加糖基,因此对于该类酶的研究一



红色框: PSPG box

图6 PpUGT7与其他三萜糖基转移酶的多序列比对

Fig. 6 Multiple sequence alignment of PpUGT7 and other plant triterpene glycosyltransferases

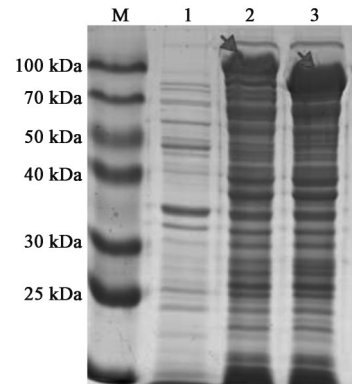
表2 滇重楼不同器官中PpUGTs基因的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Expression of PpUGTs in different organs of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

器官	PpUGT1	PpUGT7
根	1.97±0.48	0.13±0.14
茎	0.10±0.06	3.14±0.31
叶	1.00±0.19	1.00±0.18
花	0.16±0.06	0.24±0.50

直是人们关注的热点。

本研究克隆获得糖基转移酶基因两条,根据系统进化分析结果推测两者可能具有不同的底物范围。糖基转移酶通常对受体和糖基供体具有宽泛性^[25],这提示笔者在之后的实验中可以选取一系列甾体及三萜类化合物作为底物,以UDP-葡萄糖和UDP-鼠李糖等作为糖基供体来进行酶促实验,以验证PpUGTs的功能。在实验初期,将PpUGTs基因构建于pET-32a⁺表达载体并诱导表达,检测发现蛋白



M.Marker; 1.HIS-MBP-pET28a空载上清; 2.诱导后PpUGT1上清; 3.诱导后PpUGT7上清

图7 PpUGTs的原核表达

Fig. 7 Prokaryotic expression of PpUGTs

以包涵体形式存在于菌体破碎的沉淀中。虽然理化性质及跨膜结构域分析预测PpUGTs基因编码的是亲水性非跨膜蛋白,但是原核表达蛋白的溶解性不仅与基因序列有关,还与表达载体、表达菌株和

诱导条件有关^[26]。因此,改选用 HIS-MBP-pET28a 作为表达载体,MBP 标签可以增加融合蛋白的溶解性,HIS 标签可以用于蛋白的纯化,在更换载体后成功获得可溶性目的蛋白。*PpUGTs* 基因的相对表达量分析显示,*PpUGT1* 在根中的表达量最高,这与滇重楼中甾体类成分生物合成上游途径关键酶基因 *PpHMGR*^[27] 和 *PpMVD*^[28] 具有相似的表达模式,推测他们可能均主要在根中发挥作用;*PpUGT7* 在植物茎中的表达量最高,推测其可能主要在茎中参与三萜类成分的糖基化过程。

滇重楼中甾体皂苷类成分占活性成分总数的约 80%^[29],组成皂苷的苷元和糖基种类丰富,糖链部分结构复杂,这为解析重楼皂苷的生物合成途径带来很大困难。本研究通过转录组数据分析获得糖基转移酶全长基因 2 条,并通过原核表达获得可溶性目的蛋白,为后续鉴定 *PpUGTs* 功能奠定基础,为阐明滇重楼中皂苷类成分生物合成途径做出铺垫。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHEN M H, YE K, ZHANG B Y, et al. Paris saponin II inhibits colorectal carcinogenesis by regulating mitochondrial fission and NF- κ B pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 139: 273-285.
- [2] QIN X J, SUN D J, NI W, et al. Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Steroids*, 2012, 77(12): 1242-1248.
- [3] 王跃虎, 牛红梅, 张兆云, 等. 重楼属植物的药用价值及其化学物质基础 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5): 833-839.
- [4] WANG G X, HAN J, ZHAO L W, et al. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla* [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(14): 1102-1105.
- [5] 刘星, 余江丽, 刘敏, 等. 近 10 年甾体皂苷的生物活性研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(13): 2518-2523.
- [6] 赵志莲, 刘立敏, 李海峰. 重楼属 9 种植物根茎中甾体皂苷有效成分的差异 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(8): 176-181.
- [7] 杨远贵, 张霁, 张金渝, 等. 重楼属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(18): 3301-3323.
- [8] WU X, WANG L, WANG G C, et al. Triterpenoid saponins from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Carbohydr Res*, 2013, 368: 1-7.
- [9] 张玉波, 吴霞, 李药兰, 等. 云南重楼的化学成分 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2014, 35(1): 66-72.
- [10] WANG X, FAN R, LI J, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel (Iso) flavone 4', 7-O-diglucoside glucosyltransferase from *Pueraria lobata* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 387.
- [11] HOFER B. Recent developments in the enzymatic O-glycosylation of flavonoids [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(10): 4269-4281.
- [12] DAI Y Q, ZHANG S S, LIU D C, et al. Enzymatic biosynthesis of novel bavachin glucosides via *Bacillus* UDP-glycosyltransferase [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 23: 9-14.
- [13] CHEN K, HE J, HU Z, et al. Enzymatic glycosylation of oleanane-type triterpenoids [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(7): 615-623.
- [14] 郭淑, 罗红梅, 宋经元, 等. 糖基转移酶在植物次生代谢途径中的研究进展 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2012, 14(6): 2126-2130.
- [15] 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.
- [16] MA B W, LIU X H, LU Y, et al. A specific UDP-glucosyltransferase catalyzes the formation of triptophenolide glucoside from *Tripterygium wilfordii* Hook. f [J]. *Phytochemistry*, 2019, 166: 112062.
- [17] LU Y, MA B W, GAO J, et al. Isolation and characterization of a glycosyltransferase with specific catalytic activity towards flavonoids from *Tripterygium wilfordii* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2020, 22(6): 537-546.
- [18] WEN C, HUANG W, ZHU X L, et al. UGT74AN1, a permissive glycosyltransferase from *Asclepias curassavica* for the regiospecific steroid 3-O-glycosylation [J]. *Org Lett*, 2018, 20(3): 534-537.
- [19] LOUVEAU T, ORME A, PFALZGRAF H, et al. Analysis of two new arabinosyltransferases belonging to the carbohydrate-active enzyme (CAZY) glycosyl transferase family1 provides insights into disease resistance and sugar donor specificity [J]. *Plant Cell*, 2018, 30(12): 3038-3057.
- [20] LI Y, LIN H X, WANG J, et al. Glucosyltransferase capable of catalyzing the last step in neoandrographolide biosynthesis [J]. *Org Lett*, 2018, 20(19): 5999-6002.
- [21] CHRIST B, XU C, XU M, et al. Repeated evolution of

- cytochrome P450-mediated spiroketal steroid biosynthesis in plants[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 63-77.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4) : 402-408.
- [23] LIU M, KONG J Q. The enzymatic biosynthesis of acylated steroidal glycosides and their cytotoxic activity[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(6) :981-994.
- [24] 梁会超,王庆华,巩婷,等. 人参皂苷生物合成相关糖基转移酶研究基本策略及进展[J]. *药学学报*, 2015, 50(2):148-153.
- [25] GANTT R W, PELTIER-PAIN P, THORSON J S. Enzymatic methods for glyco (diversification/ randomization) of drugs and small molecules [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(11) :1811-1853.
- [26] 王宝婕,朱灵英,周青青,等. 野三七鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(22):147-153.
- [27] 徐永艳,孙永玉,徐荣,等. 滇重楼3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶 *PpHMGR* 基因的克隆及分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(14):4610-4616.
- [28] 张雪,王希付,赵荣华,等. 药用植物甾体皂苷生物合成途径研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26 (14):225-234.
- [29] NEGI J S, BISHT V K, BHANDARI A K, et al. *Paris polyphylla*: chemical and biological prospectives [J]. *Anti Canc Agents Med Chem*, 2014, 14(6) :833-839.
- [责任编辑 顾雪竹]