

女贞糖基转移酶基因(LIUGT)的克隆、 生物信息学分析及原核表达

申甲一, 周洛兵, 吴文妹, 谭朝阳^①, 徐德宏^①

(湖南中医药大学药学院 生物工程实验室, 湖南 长沙 410208)

摘要: 根据前期女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.)转录组分析结果,利用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术从叶片中克隆到1个编码糖基转移酶的基因,命名为LIUGT。该基因 cDNA 全长 1 621 bp,由 47 bp 的 5'非翻译区、1 473 bp 的开放阅读框(ORF)和101 bp的 3'非翻译区组成,其 ORF 编码 1 个含 490 个氨基酸残基的蛋白(LIUGT),该蛋白的理论相对分子质量和理论等电点分别为 55 365.68 和 pI 6.26。生物信息学分析结果表明:LIUGT 的氨基酸序列中含有 1 段糖基转移酶高度保守的区域,即 PSPG 盒。LIUGT 的二级结构含有 α -螺旋(41.02%) β -折叠(10.41%)和无规卷曲(48.57%),三级结构中由肽链折叠形成 2 个正对的 $\alpha/\beta/\alpha$ 类 Rossmann 折叠区域,并且二者之间夹着 1 个底物结合口袋。氨基酸序列比对和系统发育分析结果显示:LIUGT 与拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] UGT74F2 的亲缘关系最近,氨基酸序列一致性为 47%,且二者具有相同功能的氨基酸残基,故推测 LIUGT 与 UGT74F2 功能相似。LIUGT 与水杨酸的分子对接实验结果显示:LIUGT 中的 His51 一方面与水杨酸羧基形成氢键,另一方面与 Asp143 形成氢键,这与 UGT74F2 的对接结果相同,故推测 LIUGT 与 UGT74F2 相同,也是专一催化水杨酸生成糖酯的酶。此外,通过基因工程技术成功在大肠杆菌体内获得 LIUGT 蛋白。综上所述,本研究首次从女贞叶片中克隆到 1 个编码糖基转移酶的基因,经理论预测其编码蛋白是 1 种催化水杨酸生成糖酯的酶。

关键词: 女贞; 糖基转移酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达

中图分类号: Q786; Q943.2; S567.23*9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)02-0047-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.02.06

Cloning, bioinformatics analysis and prokaryotic expression of glycosyltransferase gene from *Ligustrum lucidum* (LIUGT) SHEN Jiayi, ZHOU Luobing, WU Wenmei, TAN Chaoyang^①, XU Dehong^① (Biological Engineering Laboratory, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(2): 47-55

Abstract: Based on the results of previous transcriptome analysis for *Ligustrum lucidum* Ait., a gene encoding glycosyltransferase was cloned from leaves by using the technology of rapid amplification of cDNA ends (RACE) and named LIUGT. The full length of cDNA of this gene is 1 621 bp, it consists of 47 bp 5'-untranslated region, 1 473 bp open reading frame (ORF) and 101 bp 3'-untranslated region, and the ORF encodes a protein (LIUGT) containing 490 amino acid residues with the theoretical relative molecular mass and theoretical isoelectric point of 55 365.68 and pI 6.26, respectively. The bioinformatics analysis results show that the amino acid sequence of LIUGT contains a highly conserved domain of glycosyltransferase, which is PSPG box. The secondary structure of LIUGT contains α -helix (41.02%), β -sheet (10.41%) and random coil (48.57%), and in the tertiary structure, two face-to-face $\alpha/\beta/\alpha$ Rossmann folded regions are formed by folding peptide chains, with a substrate binding

收稿日期: 2022-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(82104324); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50444); 湖南中医药大学生物工程学科研究生科研创新基金(2022SGJJ02); 省级大学生创新创业训练计划项目(2022-85)

作者简介: 申甲一(1997—),女,湖南邵阳人,硕士研究生,主要研究方向为中药活性分子的生物合成与活性机制。

^①通信作者 E-mail: tomtzy@163.com; xudehong163@126.com

引用格式: 申甲一, 周洛兵, 吴文妹, 等. 女贞糖基转移酶基因(LIUGT)的克隆、生物信息学分析及原核表达[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(2): 47-55.

pocket sandwiched between them. Alignment of amino acid sequences and phylogenetic analysis results show that LIUGT has the closest genetic relationship with UGT74F2 from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., the identity of their amino acid sequence is 47%, and they have the amino acid residues with the same functions, so it is speculated that the function of LIUGT is similar to UGT74F2. The result of molecular docking experiment of LIUGT and salicylic acid shows that His51 of LIUGT forms hydrogen bonds with the carboxyl group of salicylic acid on one hand, and with Asp143 on the other hand, which consistent with the molecular docking result of UGT74F2, therefore, it is speculated that LIUGT is also an enzyme that specifically catalyzes the formation of sugar esters from salicylic acid, like UGT74F2. In addition, LIUGT is successfully obtained in *E. coli* by using genetic engineering technology. In conclusion, a gene encoding glycosyltransferase is cloned from leaves of *L. lucidum* for the first time in this study, and the encoded protein is theoretically predicted as an enzyme, which can catalyze salicylic acid to generate sugar esters.

Key words: *Ligustrum lucidum* Ait.; glycosyltransferase; gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) 为木犀科 (Oleaceae) 女贞属 (*Ligustrum* Linn.) 植物, 不仅果实 (女贞子) 可入药^[1-2], 而且叶片也有多种药用活性, 民间常用于治疗头目晕痛、风热赤眼、疮肿溃烂等^[3-4]。近年来, 一些研究者对女贞叶片化学成分进行了研究, 结果显示女贞叶片主要含有萜类、黄酮类、苯丙素类等成分^[5-7], 而且多以糖苷形式存在, 例如女贞苷、毛蕊花糖苷、熊果苷等^[3, 8-9]。因此, 在对女贞叶片的化学成分进行研究时, 所含的糖苷类成分及其糖基化过程是一个值得重点关注的研究方向。

糖基转移酶 (glycosyltransferase, GT) 是一类广泛存在于自然界中, 并能将特定的糖基和受体催化形成糖苷键的酶类。截至 2022 年 11 月, Carbohydrate-Active enZymes 数据库 (<http://www.cazy.org>) 将糖基转移酶划分为 116 个家族^[10], 其中 GT1 家族包含的糖基转移酶数量最多, 该家族的糖基转移酶常以尿苷二磷酸-单糖作为糖基供体, 故被称为尿苷二磷酸糖基转移酶 (uridine diphosphate glycosyltransferase, UGT)^[11-12]。研究发现, 植物细胞内多种次级代谢产物的糖基化过程由 UGT 介导, 并很大程度影响次级代谢产物的稳定性、可溶性乃至生物活性^[13]。目前, 研究人员已从多种植物中发现 UGT 及其编码基因, 并对 UGT 活性进行了研究^[14-18], 但具有药用价值的女贞在 UGT 的基因挖掘、结构与功能研究等方面存在诸多缺陷, 如尚未发现来自女贞的 UGT, 更无相关催化底物和分子机制的研究报道, 因而, 有必要开展相关工作进行探究。

本研究根据前期女贞转录组分析结果^[19], 设计特异性引物并利用 cDNA 末端快速扩增 (rapid

amplification of cDNA ends, RACE) 技术从女贞叶片中克隆到 1 个编码 UGT 的基因, 并对其进行生物信息学分析和原核表达, 以期为进一步开展基因体外功能检测和开发应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试女贞生长于湖南中医药大学东塘校区, 经本校刘塔斯教授鉴定。在秋季果实成熟时, 从 3 株女贞树上各采摘 4 或 5 枚无病虫害的成熟叶, 置于 -80 °C 冰箱中保存、备用。

Clontech SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit、200 bp DNA ladder (Dye Plus)、克隆载体 pMD19-T 购自宝日生物技术有限公司; 200 bp DNA marker、植物总 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、蛋白质 marker (MP206)、质粒提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; *Nhe* I 和 *Xho* I 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; SDS-PAGE 试剂盒、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 氨苄青霉素、卡那霉素购自合肥博美生物科技有限责任公司; LB 肉汤、LB 琼脂购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 表达载体 pET-28a、DH5 α 感受态细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞由湖南中医药大学生物工程实验室自行保存。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 提取和 cDNA 合成 取女贞叶片 100 mg, 于液氮中研磨, 按照植物总 RNA 提取试剂盒

说明书中的方法进行的操作,得到的产物先用质量体积分数 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳判断完整性,再利用 BioPhotometer 核酸蛋白测定仪(德国艾本德股份公司)进行浓度和纯度测定。按照 Clontech SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 使用说明,将提取的叶片总 RNA 逆转录为 cDNA。

1.2.2 LIUGT 基因的克隆 本课题组前期通过转录组测序发现 1 个长度为 1 358 bp 且编码糖基转移酶的 unigene, 但该 unigene 的核苷酸序列不完整, 故根据其核苷酸序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3' RACE 基因克隆外引物(5'-CTTTCAGAGAGTGAGTTTTTGATTCCG-3')、3' RACE 基因克隆内引物(5'-GGCAGACTGGCTACTTTTCAACACCTTC-3')、5' RACE 基因克隆外引物(5'-CTTCCATTTGCTCTTTTCCTAACTC-3')和 5' RACE 基因克隆内引物(5'-CATCCAATCAATCACCTCTTCCTCCA-3'), 并按以下步骤进行巢式 PCR 反应。第 1 轮反应体系总体积 50.0 μL , 包括 PCR-Grade H_2O 15.5 μL 、2 \times SeqAmp Buffer 25.0 μL 、SeqAmp DNA Polymerase(来自 Clontech SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit) 1.0 μL 、cDNA 2.5 μL 、10 \times UPM 5.0 μL 、3'或 5' RACE 基因克隆外引物 1.0 μL 。反应程序:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s、68 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s、72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min, 共循环 20 次;72 $^\circ\text{C}$ 终延伸 5 min,4 $^\circ\text{C}$ 保存。第 2 轮反应体系总体积 50.0 μL , 包括 PCR-Grade H_2O 15.5 μL 、2 \times SeqAmp Buffer 25.0 μL 、SeqAmp DNA Polymerase 1.0 μL 、3'-或 5'-RACE PCR 第 1 轮反应扩增产物 2.5 μL 、10 \times UPM short 5.0 μL 、3'或 5' RACE 基因克隆内引物 1.0 μL 。反应程序:94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s、68 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s、72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min, 共循环 30 次。扩增产物均用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化, 然后连接到 pMD19-T 载体中, 转化至 DH5 α 感受态细胞中, 在含有 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的抗性平板中筛选阳性克隆, 用质粒提取试剂盒提取质粒后交金开瑞生物工程有限公司(武汉)进行测序。测序结果显示 3' RACE 片段 5'端和 5' RACE 片段 3'端有重叠区, 将二者拼接构成完整的基因序列, 命名为 LIUGT。

1.2.3 生物信息学分析 在 NCBI 的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 上输入克隆得到的核苷酸序列, 找到开放阅读框(open reading frame, ORF)、5'非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)和 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-

UTR)。利用 DNAMAN v9.0.1 软件根据 ORF 序列推导出氨基酸序列, 并使用在线软件 ExPASy 中的 ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam>)分析 LIUGT 的理论相对分子质量、理论等电点和亲水性平均系数。运用在线软件 Signal P4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1/>)、TMHMM2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.%20php?TMHMM-2.0>)和 PSORT Prediction(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)分别对 LIUGT 的信号肽、跨膜结构域和亚细胞定位进行分析。使用 PSIPRED 软件(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)和 SWISS-MODEL 软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)预测 LIUGT 的二级结构和三级结构。利用 NCBI 蛋白质数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 将搜索物种选为拟南芥进行 BLASTp 搜索, 获得与 LIUGT 氨基酸序列一致性最高的序列。选取拟南芥 GT1 家族 14 个功能组中典型的 UGT 与 LIUGT 进行氨基酸序列比对, 并在 MEGA v5.1 软件的辅助下采用 Neighbor Joining 方法构建 LIUGT 与拟南芥 UGT 的系统发育树。根据 BLASTp 搜索和系统发育树结果推测催化底物, 运用 Autodock 4.2.6 软件进行分子对接模拟实验, 预测 LIUGT 和底物间相互作用的关键残基。

1.2.4 原核表达载体的构建 根据得到的 LIUGT 基因序列, 设计含有酶切位点的 LIUGT-表达引物-F(5'-CTAGCTAGCGCAGAGTACATGGGAGAAC-3', 下划线为 *Nhe* I 酶切位点)和 LIUGT-表达引物-R(5'-CCGCTCGAGACTACTCAATTTTTTAATCAG-3', 下划线为 *Xho* I 酶切位点), 利用这对引物进行 PCR 扩增后获得 LIUGT 基因的 ORF。PCR 产物经 *Nhe* I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶处理后, 由 T₄ DNA 连接酶连接到 pET-28a 表达载体上, 将重组载体转入 BL21(DE3)感受态细胞中, 在含有 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 平板中筛选出抗性菌株, 测序无误后, 命名为 LIUGT-pET-28a 菌株。

1.2.5 LIUGT 原核表达 将 LIUGT-pET-28a 菌株接种到含 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下 225 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养, 次日取 1 mL 菌液加入到 50 mL 新配制的 LB 液体培养基中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下 225 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8。然后, 向菌液中加入 IPTG, 使其浓度为 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并于 15 $^\circ\text{C}$ 条件下进行诱导培养(诱导组), 以未插入目的片段的 pET-28a(空载体组)为

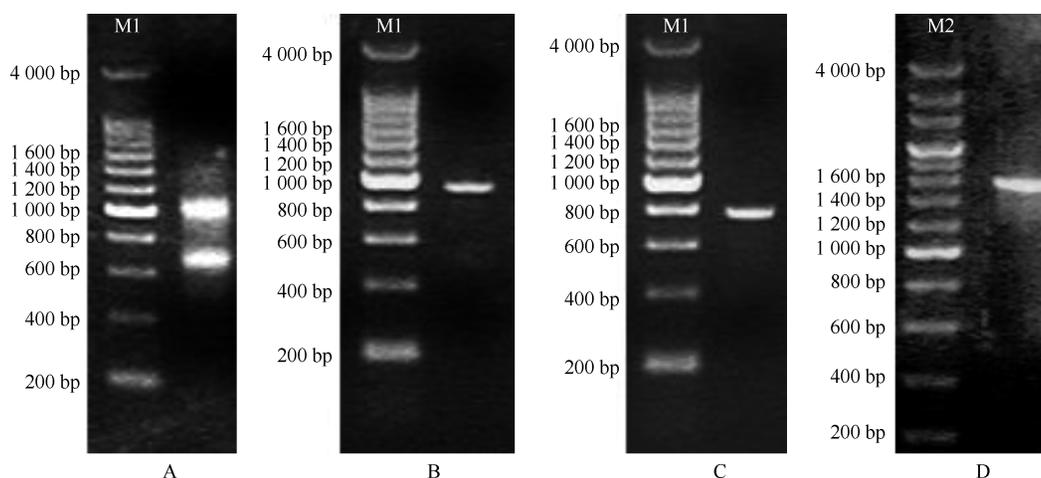
阴性对照。分别在诱导 0 和 5 h 收集空载体组和诱导组菌体,室温 $5\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,沉淀用蛋白质上样缓冲液重悬,沸水浴中煮 10 min,冷却后进行 SDS-PAGE 电泳,分析重组蛋白表达情况。

2 结果和分析

2.1 *LIUGT* 基因的克隆

LIUGT 基因的克隆结果(图 1)显示:经质量体积

分数 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,提取的女贞叶片总 RNA 完整性好、纯度高(图 1-A),质量浓度为 $21.3\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以逆转录获得的 cDNA 为模板,利用特异性引物进行 PCR 扩增,得到长度分别为 885 和 797 bp 的 3'RACE 和 5'RACE 扩增产物(图 1-B,C)。将 2 个片段测序后进行拼接,得到全长为 1 621 bp 的完整 cDNA 序列。对其进行全长验证,在 1 600 bp 左右位置检测到 1 条明亮的条带(图 1-D),将条带回收、克隆及测序,测序结果与拼接序列一致。



M1: 200 bp DNA marker; M2: 200 bp DNA ladder (Dye Plus). A: 叶片总 RNA 电泳结果 Electrophoresis of total RNA of leaves; B: 3'RACE 扩增产物电泳结果 Electrophoresis of 3'RACE amplified product; C: 5'RACE 扩增产物电泳结果 Electrophoresis of 5'RACE amplified product; D: *LIUGT* 全长序列电泳结果 Electrophoresis of *LIUGT* full-length sequence.

图 1 女贞叶片总 RNA 和 *LIUGT* 基因的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA and *LIUGT* gene from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait.

2.2 *LIUGT* 的生物信息学分析

2.2.1 *LIUGT* 基因和编码氨基酸序列分析 将得到的 *LIUGT* 基因序列上传至 NCBI 数据库,获得登录号为 ON931617。利用 ORF finder 对基因全长序列进行分析,*LIUGT* 的基因全长 cDNA 序列和编码氨基酸序列见图 2。结果显示:*LIUGT* 基因全长 cDNA 序列由 47 bp 的 5'-UTR、101 bp 的 3'-UTR 和 1 473 bp 的 ORF 构成,其中 3'-UTR 含有真核生物特有结构——poly(A)尾,ORF 编码 1 个含 490 个氨基酸残基的蛋白(*LIUGT*)。从推导出的氨基酸序列可以看出,其中存在 1 段糖基转移酶高度保守的区域,被称为植物次级产物糖基转移酶盒(plant secondary product glycosyltransferase box, PSPG box),该区域含 44 个氨基酸。

2.2.2 *LIUGT* 的理化性质分析 通过在线软件预测,

LIUGT 的理论相对分子质量为 55 365.68,理论等电点为 pI 6.26,亲水性平均系数为 -0.237,为亲水性蛋白。亚细胞定位分析推测该蛋白存在于叶绿体中。经蛋白跨膜结构预测,该蛋白位于膜外,不具备跨膜区域。信号肽预测分析结果显示该蛋白无信号肽序列,因此推测该蛋白为非分泌蛋白。

2.2.3 *LIUGT* 的空间结构分析 *LIUGT* 的二级结构见图 2。结果显示: α -螺旋占比为 41.02%, β -折叠占比为 10.41%,无规卷曲占比为 48.57%。通过同源建模方法预测 *LIUGT* 的三级结构,结果显示:*LIUGT* 与模板分子(SMTL id = 5u6n.2.A,即 UGT74F2)的氨基酸序列相似性为 52.14%,说明模板分子可用于 *LIUGT* 三级结构的构建。预测的 *LIUGT* 三级结构(图 3)显示:*LIUGT* 由 N 端结构域、底物结合口袋和 C 端结构域组成,其中 N 端结构域和 C 端结构域由



黑色方框代表 5'-UTR 和 3'-UTR The black boxes represent 5'-UTR and 3'-UTR; 下划线代表 poly(A) The underscore represents poly(A); 黑色阴影区域代表 PSPG 盒 The black shadow area represents PSPG box; 绿色圆柱代表 α -螺旋 The green columns represent α -helices; 黄色箭头代表 β -折叠 The yellow arrows represent β -sheets; 灰色细线代表无规卷曲 The gray lines represent random coils.

图 2 LIUGT 的全长 cDNA 序列、推导的氨基酸序列和二级结构

Fig. 2 Full-length cDNA sequence, deduced amino acid sequence, and secondary structure of LIUGT

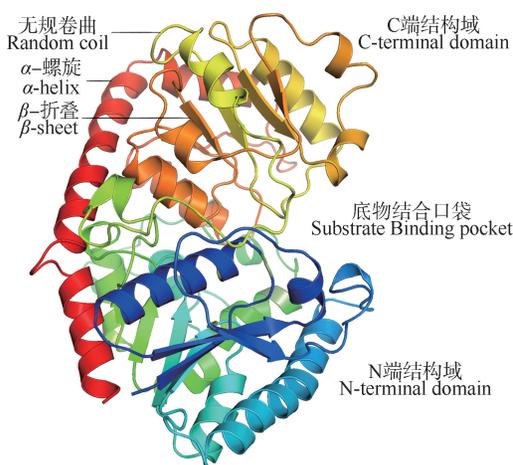


图 3 LIUGT 的三级结构预测

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of LIUGT

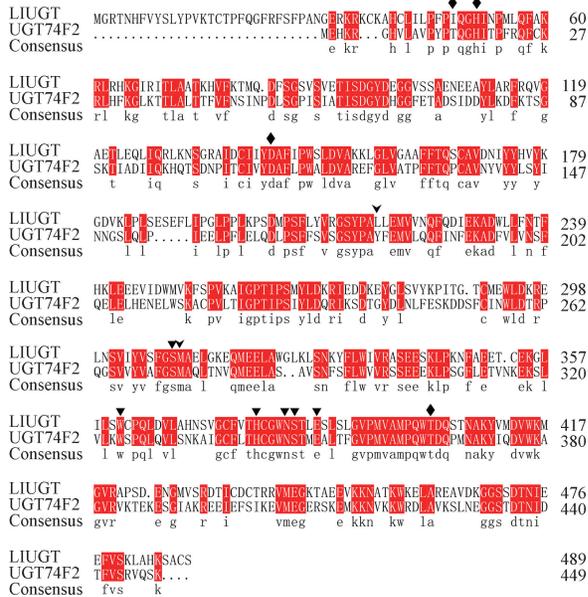
$\alpha/\beta/\alpha$ 类 Rossmann 折叠组成,二者以正对的方式位于底物结合口袋的两侧。

2.2.4 LIUGT 的氨基酸序列比对和系统发育分析将在拟南芥 GT1 家族 14 个功能组中选取的典型 UGT 与 LIUGT 进行氨基酸序列比对,一致性为 20%~47%,其中 LIUGT 和 UGT74F2 的氨基酸序列一致性最高。由图 4 可见:二者具有相同功能的氨基酸残基,如与 UDP 相互作用的氨基酸残基、与水杨酸结合并参与空间定向的氨基酸残基、催化水杨酸糖基化的氨基酸残基。

系统发育分析结果(图 5)显示 LIUGT 与拟南芥 UGT74F2 在系统发育树上关系最近。经文献查询,拟南芥 UGT74F2 可催化水杨酸形成水杨酸葡萄糖

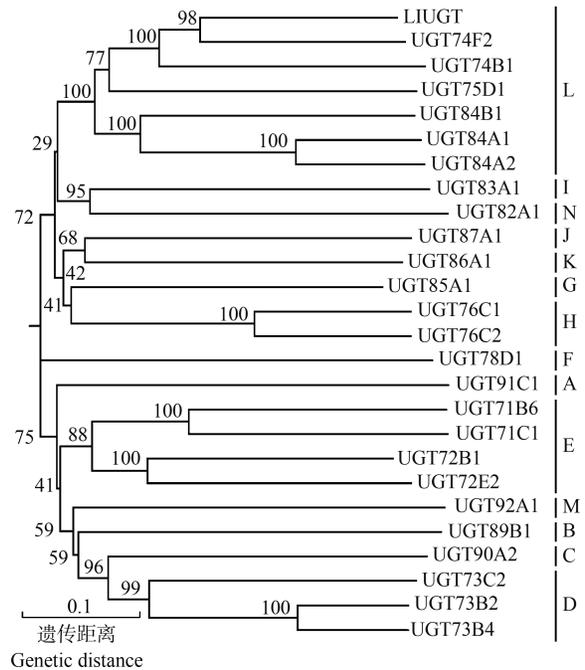
酯,结合氨基酸序列比对结果推测 LIUGT 也有类似的催化功能。

2.2.5 LIUGT 与水杨酸的分子对接分析 分子对接模拟实验结果(图 6)显示:LIUGT 中 His51 的 R 基团



▼: 与 UDP 相互作用的氨基酸残基 Amino acid residues interacting with UDP; ▼: 与水杨酸结合并参与空间定向的氨基酸残基 Amino acid residues binding to salicylic acid and participating in spatial orientation; ◆: 催化水杨酸糖基化的氨基酸残基 Amino acid residues catalyzing glycosylation of salicylic acid.

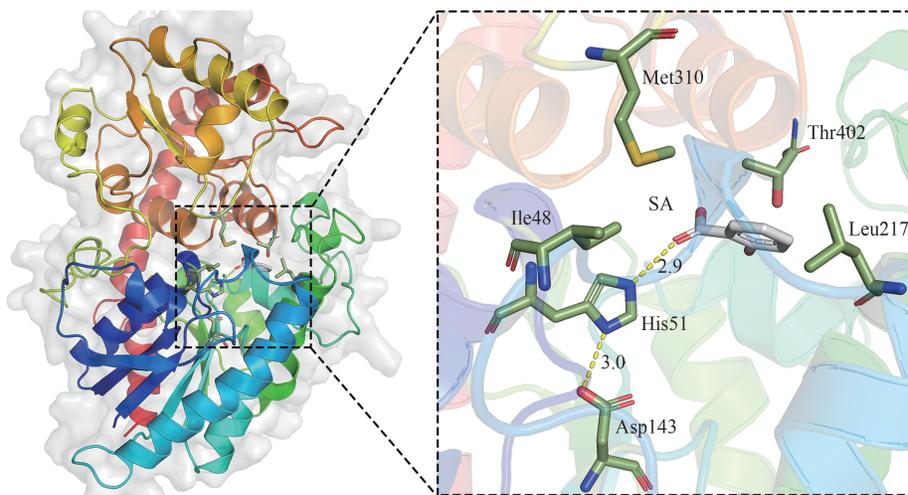
图 4 LIUGT 和拟南芥 UGT74F2 的氨基酸序列比对 Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of LIUGT and UGT74F2



A-N: 拟南芥 GT1 家族的 14 个功能组 Fourteen functional groups of GT1 family from Arabidopsis thaliana (Linn.) Heynh.

图 5 LIUGT 和拟南芥 UGT 家族成员的系统发育树 Fig. 5 Phylogenetic tree of LIUGT and UGT family members from Arabidopsis thaliana (Linn.) Heynh.

通过 1 个氢键与水杨酸的羧基氧发生作用,同时 Asp143 的 R 基团也与 LIUGT 中 His51 的 R 基团通过氢键相互作用,因此推测 His51 可能是 LIUGT 催化水杨酸发生糖基化的关键残基。



黄色虚线代表氢键 The yellow dotted lines represent hydrogen bonds; Asp143 和 SA 连接氢键部分是羧基基团 The groups of Asp143 and SA connected by hydrogen bonds are carboxyl groups; His51 连接氢键部分是咪唑基团 The group of His51 connected by hydrogen bond is imidazole group.

图 6 LIUGT 与水杨酸的分子对接 Fig. 6 Molecular docking of LIUGT and salicylic acid

2.3 LIUGT 重组载体的构建和原核表达

利用 *LIUGT* 基因的扩增引物, 以重组载体为模板进行 PCR 扩增, 同时对重组载体进行双酶切。PCR 产物和双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果(图 7)显示: 2 个实验均获得 1 条长度约 1 500 bp 的条带, 与 *LIUGT* 基因的 ORF 长度一致, 表明 *LIUGT* 基因被成功连接到载体中。将重组载体转化到 BL21(DE3) 感受态细胞中, 诱导表达结果(图 8)显示: *LIUGT* 基因能在 BL21(DE3) 感受态细胞中成功表达, 其表达得到的蛋白相对分子质量约为 55 000。

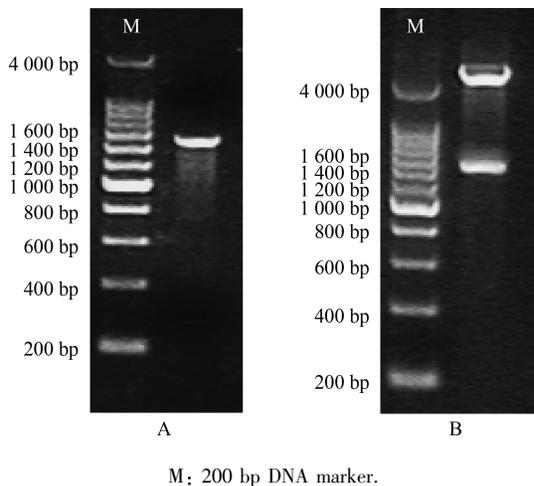


图 7 *LIUGT* 重组载体的 PCR(A) 和双酶切(B) 结果
Fig. 7 Results of PCR (A) and double enzyme digestion (B) of *LIUGT* recombinant vector

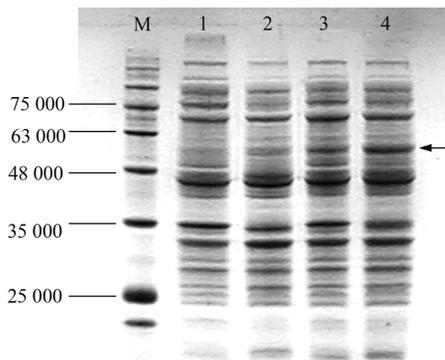


图 8 *LIUGT* 原核表达结果
Fig. 8 Prokaryotic expression result of *LIUGT*

3 讨论和结论

本研究从女贞叶片中克隆到 1 个编码糖基转移酶的基因 *LIUGT*, 其编码的氨基酸序列具有糖基转移酶的典型特征, 即 C 端含有 1 段由 44 个氨基酸组成的 PSPG 盒。在空间结构方面, 本研究获得的 *LIUGT* 属于植物糖基转移酶中的 GT-B 型^[20-21], 该类型含有 2 个正对的结构域, 其中一个为 N 端结构域, 另一个为 C 端结构域, 每个结构域都由 $\alpha/\beta/\alpha$ 类 Rossmann 折叠区域构成, 而且在 2 个结构域之间有 1 个底物结合口袋, 主要用于结合并催化底物分子。

糖基转移酶作用的底物一般有 2 种, 一种是糖基供体, 另一种是糖基受体。糖基供体的常见类型有 ADP-糖基和 UDP-糖基, *LIUGT* 因含 PSPG 盒, 故属于 GT1 家族, 该家族成员常以 UDP-糖基作为供体。当糖基转移酶以 UDP-糖基作为供体时, 其与 UDP 相互作用的氨基酸残基高度保守, 例如: 对 UGT74F2 与 UDP 结合物进行晶体结构分析时发现, 该酶的 Ser273、Trp324、His342、Asn346、Ser347 和 Glu350 是糖基转移酶与 UDP 相互作用的关键残基^[22], 在此基础上对 *LIUGT* 与 UGT74F2 的氨基酸序列进行比对, 结果显示 *LIUGT* 与 UGT74F2 在相应位置含有的氨基酸残基基本一致, 因而进一步确定 *LIUGT* 以 UDP-糖基作为供体。在植物体内, 葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸等单糖都可与 UDP 结合形成糖基供体, 但不同的糖基转移酶使用的单糖类型, 主要取决于 PSPG 盒中第 22、23 和 44 位氨基酸残基的种类^[23-25]。PSPG 盒中第 22 位是 Trp 的糖基转移酶, 常以 UDP-葡萄糖为供体, 但如果是 Arg 则很可能以 UDP-葡萄糖醛酸为供体, 而且此时第 23 位的氨基酸以 Ser 最为常见。另外, 以半乳糖或葡萄糖作为供体的糖基转移酶, 其 PSPG 盒中第 44 位的氨基酸残基一般为 His 或 Gln。根据以上分析, 并结合 *LIUGT* 所含 PSPG 盒的氨基酸残基种类(第 22、23 和 44 位分别为 Trp、Asn、Gln), 推测 *LIUGT* 的糖基供体应该为 UDP-葡萄糖, 而且这一推测还可被 UGT74F2 进一步验证, 因为该酶的底物之一正是 UDP-葡萄糖, 其 PSPG 盒相应位置的氨基酸残基与 *LIUGT* 一致。

研究表明: GT1 家族的糖基转移酶包含 2 个结构域, C 端结构域一般高度保守, 负责识别和结合 UDP-糖基, 而 N 端结构域则高度可变, 导致其识别

和结合的糖基受体各不相同^[26-27]。系统发育分析发现,LIUGT在进化上归属于拟南芥GT1家族的L组,该组涉及的糖基转移酶在功能上主要负责黄酮类、萜类和苯丙素类成分的糖基化^[28-30]。从系统发育树中还可以看出,LIUGT与UGT74F2在亲缘关系上最近,因而推测LIUGT的N端结构域主要识别和结合黄酮类、萜类和苯丙素类成分,而且催化的具体成分应与UGT74F2高度相似。相关实验已证实,UGT74F2能专一性催化水杨酸的羧基发生糖基化生成相应的糖酯^[31],且晶体结构分析揭示,UGT74F2催化该反应的关键残基包括Thr15、His18、Asp111、Tyr180、Met274和Thr365^[22],其中Tyr180和Met274仅涉及水杨酸与UGT74F2的结合和定向,不直接催化糖酯形成,而Thr15、His18、Asp111和Thr365组成UGT74F2的催化中心,负责参与催化过程并决定底物的专一性。氨基酸序列比对发现,LIUGT与UGT74F2在相应位置的氨基酸残基基本一致,例如LIUGT的His51、Asp143、Met310和Thr402与UGT74F2的His18、Asp111、Met274和Thr365完全对应,但也有2个氨基酸残基不同,即LIUGT的Ile48和Leu217分别对应UGT74F2的Thr15和Tyr180。Thompson等^[22]研究发现UGT74F2的His18是酶活性最主要的决定因子,一旦将其突变成Ala,酶活性几乎完全丧失,由此推测LIUGT是一个有催化活性的酶蛋白。同时,Thompson等^[22]还发现UGT74F2的Thr15是决定酶专一性的关键残基,如果将其突变成侧链基团比Thr小的Ala或Ser,UGT74F2的专一性减弱,可将水杨酸苯环羟基糖基化形成相应的糖苷,但如果将其突变成侧链基团与Thr相当的Val,UGT74F2的专一性不变,由此推断侧链基团越小,糖苷酶活性越高。本研究中LIUGT的相应位置是Ile,其侧链基团比Val和Thr的侧链基团大,而且分子对接实验结果显示:His51一方面与水杨酸羧基形成氢键,另一方面与Asp143形成氢键,与UGT74F2的对接结果相同,故推测LIUGT也是专一催化水杨酸形成糖酯的酶。

本研究还对LIUGT进行了大肠杆菌体外表达实验,结果显示,LIUGT得到有效表达,但表达量不高,因此后续应从表达菌株、密码子种类、启动子类型等方面优化LIUGT的表达^[32],为进一步开展LIUGT的结构与功能、酶学性质、生物合成等研究奠定基础。

本研究首次从女贞叶片中克隆到1个编码糖基转移酶的LIUGT基因,其编码的蛋白与已知功能的拟

南芥UGT74F2高度相似,因而推测LIUGT是1种催化水杨酸生成糖酯的酶。在此基础上,成功实现LIUGT在大肠杆菌体内异源表达。

参考文献:

- [1] 林文群,陈忠,李萍,等.女贞果实及种子的化学成分[J].植物资源与环境学报,2002,11(1):55-56.
- [2] 刘美红,邹嵘嵘.女贞子化学成分、药理作用及药动学研究进展[J].热带亚热带植物学报,2022,30(3):446-460.
- [3] 童东锡.女贞叶的研究进展[J].中国医药指南,2013,11(20):76-78.
- [4] 王丽,闫春生,贾安,等.HPLC法测定不同产地女贞叶中熊果酸的含量[J].安徽农业科学,2014,42(28):9738-9739.
- [5] 刘美红,李帅岚,张莲,等.女贞属植物的化学成分和药理活性研究进展[J].中草药,2020,51(12):3337-3348.
- [6] 南美娟,邓翀,冯改利,等.Box-Behnken响应面法优化女贞叶有效成分提取工艺的研究[J].陕西中医药大学学报,2017,40(2):91-94.
- [7] 曹瑞,邓翀,何洋.女贞叶总黄酮对大孔树脂的筛选[J].现代中医药,2019,39(4):121-124,129.
- [8] 张兴磊,余维芳,方小伟,等.女贞叶的直接电离质谱研究[J].东华理工大学学报(自然科学版),2018,41(1):78-82.
- [9] 张恩户,于妮娜,刘敏,等.女贞叶提取物及其成分熊果苷祛痰、镇咳作用的实验研究[J].江苏中医药,2005,26(11):69-70.
- [10] DRULA E, GARRON M L, DOGAN S, et al. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D571-D577.
- [11] ZHANG P, ZHANG Z, ZHANG L J, et al. Glycosyltransferase GT1 family: phylogenetic distribution, substrates coverage, and representative structural features[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 1383-1390.
- [12] 文超,欧阳文虹,黄伟,等.植物UGTs的功能、应用与分子改造研究进展[J].生物资源,2022,44(2):122-129.
- [13] TIWARI P, SANGWAN R S, SANGWAN N S. Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: an update on expanding knowledge and scopes[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(5): 714-739.
- [14] LOUVEAU T, OSBOURN A. The sweet side of plant-specialized metabolism[J]. Cold Spring Harbor Perspective Biology, 2019, 11(12): a034744.
- [15] JIN S H, MA X M, HAN P, et al. UGT74D1 is a novel auxin glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e61705.
- [16] KUDO T, MAKITA N, KOJIMA M, et al. Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis-Zeatin-O-glycosyltransferase in rice [J]. Plant Physiology, 2012, 160(1): 319-331.
- [17] 瞿彩丽,刘雨馨,李永华,等.霍山石斛类黄酮-3-O-糖基转

- 移酶(DhUF3GT)基因克隆与原核表达分析[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2022, 24(4): 1400-1410.
- [18] 姚薇, 李静, 黄梓璐, 等. 鸢尾糖基转移酶 ItUGT797 基因的克隆与表达分析[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2022, 24(5): 1791-1801.
- [19] 徐德宏, 罗月芳, 江灵敏, 等. 基于高通量测序的女贞果实转录组研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20(5): 522-528.
- [20] 姬向楠, 何非, 段长青, 等. 植物 UDP-糖基转移酶生化特性和功能研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 316-323.
- [21] OSMANI S A, BAK S, MØLLER B L. Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling[J]. Phytochemistry, 2009, 70(3): 325-347.
- [22] THOMPSON A M G, IANCU C V, NEET K E, et al. Differences in salicylic acid glucose conjugations by UGT74F1 and UGT74F2 from *Arabidopsis thaliana*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46629.
- [23] 吕鹤书, 薛飞燕, 柳春梅, 等. 植物尿苷二磷酸糖基转移酶超家族晶体结构[J]. 生物工程学报, 2014, 30(6): 838-847.
- [24] 王应丽, 黄文俊, 王瑛. 箭叶淫羊藿 *EsUF3GT* 基因的克隆及表达分析[J]. 植物科学学报, 2014, 32(6): 602-611.
- [25] 解林峰, 任传宏, 张波, 等. 植物类黄酮生物合成相关 UDP-糖基转移酶研究进展[J]. 园艺学报, 2019, 46(9): 1655-1669.
- [26] 姚宇, 顾佳珺, 孙超, 等. 植物类黄酮 UDP-糖基转移酶研究进展[J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 32-42.
- [27] HOFER B. Recent developments in the enzymatic *O*-glycosylation of flavonoids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100: 4269-4281.
- [28] ROSS J, LI Y, LIM E K, et al. Higher plant glycosyltransferases[J]. Genome Biology, 2001, 2(2): 3004.1-3004.6.
- [29] LI Y, BALDAUF S, LIM E K, et al. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(6): 4338-4343.
- [30] CAPUTI L, MALNOY M, GOREMYKIN V, et al. A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land[J]. The Plant Journal, 2012, 69(6): 1030-1042.
- [31] DEAN J V, DELANEY S P. Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 132(4): 417-425.
- [32] 卢晟晔, 王丽颖. 大肠杆菌中外源蛋白高效表达的影响因素及策略研究的新进展[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(9): 1100-1103.

(责任编辑: 吴芯夷)

公益宣传: 世界知识产权日

世界知识产权日(The World Intellectual Property Day)为每年的4月26日,由世界知识产权组织于2001年4月26日设立,目的是在世界范围内树立尊重知识、崇尚科学和保护知识产权的意识,营造鼓励知识创新的法律环境。世界知识产权日的确立有助于突出知识产权在所有国家的经济、文化和社会发展中的作用和贡献,并提高人们对知识产权的认识和理解。

2023年世界知识产权日的主题为“女性和知识产权:加速创新创造”,旨在让女性融入知识产权制度,加速女性的创新创造,共同推动建设更加包容和多元化的生态系统,造福全人类。