

## 桉柑柠檬苦素-UDP-葡萄糖基转移酶基因的克隆、分析及表达

罗 静, 裴 瑾\*, 康亚兰, 刘 薇, 刘 维, 陈翠平, 吴清华

成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 610075

**摘要:** 目的 克隆中药橘核主要来源品种桉柑 *Citrus reticulata* 的柠檬苦素-UDP-葡萄糖基转移酶 (limonoid-UDP-glucosyl transferase gene, *LGT*) 基因, 并进行生物信息学及表达分析为橘核有效成分合成及调控机制研究提供基础。方法 克隆获得 *LGT* 序列, 通过生物信息学对该基因蛋白的特征进行分析, 构建 *LGT* 与相关物种 *LGT* 的系统进化树, 利用 RT-PCR 分析橘皮、橘肉以及橘核中 *LGT* 基因表达量, 并进行分析和比较。结果 测序所得桉柑 *LGT* 序列全长为 1 530 bp, 具有 1 509 bp 的完整开放阅读框, 编码 502 个氨基酸。并对其蛋白二级、三级结构进行了分析和预测。基因表达分析结果发现桉柑 *LGT* 基因在橘核中表达量最低, 其次为橘皮, 表达量最高为橘肉。结论 成功克隆、分析并表达了桉柑 *LGT* 基因, 为橘核中柠檬苦素类物质合成及调控机制研究提供基础。

**关键词:** 桉柑; 橘核; 柠檬苦素-UDP-葡萄糖基转移酶基因; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2691-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.022

## Cloning, analysis, and expression of limonoid UDP-glucosyl transferase gene in *Citri Reticulatae Semen*

LUO Jing, PEI Jin, KANG Ya-lan, LIU Wei, LIU Wei, CHEN Cui-ping, WU Qing-hua

Ministry of Education Key Laboratory of standardization of Chinese herbal medicines of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

**Abstract: Objective** To cloning limonoid-UDP-glucosyl transferase (*LGT*) gene in *Citrus reticulata*, analyze the bioinformations of *LGT*, and compare the expression to provide the foundation for the composite and regulation mechanism of the active ingredient in *Citri Reticulatae Semen*. **Methods** *LGT* gene was cloned the protein characteristics were analyzed using bioinformatics and constructing phylogenetic tree. The expression of *LGT* in the different parts was analyzed using real time-PCR. **Results** A 1 530 bp *LGT* sequence in *C. reticulata*, was obtained, which had a 1509 bp ORF and could encode 502 amino acids. And protein analysis and forecast of its secondary and tertiary structures were carried out. Gene expression analysis revealed the expression of citrus *LGT* was the lowest in semen, and was followed by skin, and the highest expression of fresh. **Conclusion** *LGT* gene of *C. reticulata*, and is successfully cloned, analyzed, and expressed a basis for the study of matter in the synthesis and regulation of limonoids is provided.

**Key words:** *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan; *Citri Reticulatae Semen*; limonoid-UDP-glucosyl transferase gene; gene cloning; bioinformations analysis

橘核 *Citri Reticulatae Semen* 为芸香科植物桉柑 *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan 及其栽培变种的干燥成熟种子; 具有理气、散结、止痛的功效。临床用于疝气疼痛、睾丸肿痛、乳痈乳癖<sup>[1]</sup>。橘核的主要化学成分为柠檬苦素类似物如柠檬苦素 (limonin)、诺米林 (nomilin) 等<sup>[2]</sup>, 柠檬苦素类似物是以柠檬苦素的化学结构为基本单位的一系列化合物, 是一类高度氧化的四环三萜类植物次生代谢产物, 具有抗肿瘤、昆虫拒食、抗病毒、镇痛、抗

炎、催眠等多种生物活性。可用于功能性食品添加剂、抗癌食品、杀虫剂、饲料添加剂等<sup>[3]</sup>。主要分布于芸香科和楝科植物体内, 特别在柑橘属中含量丰富<sup>[4]</sup>, 在柑橘属果实的不同部位中, 又以种子中的量最高, 其次是果皮, 果肉中的量最低<sup>[5-6]</sup>。研究表明在柑橘生长和成熟的过程中, 柠檬苦素 A-环内酯在柠檬苦素-UDP-葡萄糖基转移酶 (limonoid-UDP-glucosyl transferase gene, *LGT*) 基因的催化下转变成了无苦味的柠檬苦素类似物<sup>[7]</sup>。*LGT* 基因是

收稿日期: 2014-03-25

作者简介: 罗 静 (1989—), 女, 陕西咸阳市人, 硕士研究生, 研究方向为中药资源开发与利用。Tel: 18224426244 E-mail: xiaojing.er123@163.com

\*通信作者 裴 瑾 (1970—), 女, 教授, 中药品质与资源开发。Tel: 13880369322 E-mail: peixjin@163.com

柠檬苦素类似物合成过程中重要的基因。

本研究设计特异性引物, 从椪柑中成功克隆获得 *LGT* 基因、分析并表达了椪柑 *LGT* 基因。结果发现椪柑 *LGT* 基因在橘核中表达量最低, 其次为橘皮, 表达量最高为橘肉。旨在探索 *LGT* 基因表达量差异, 为柠檬苦素类物质合成及调控机制研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

椪柑于 2013 年 12 月采于四川省蒲江县, 由成都中医药大学裴瑾教授鉴定为芸香科植物椪柑 *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan, 果实洗净, 经乙醇擦拭及 DEPC 水处理, 将果皮、果肉、橘核分离后立即放入液氮中保存, 带回实验室, 于 -80 °C 冰箱保存。用于 RNA 提取。

Trizol 总 RNA 提取试剂 (TIANGEN), 2×Taq PCR MasterMix (TIANGEN), ddH<sub>2</sub>O (TIANGEN), cDNA 反转录试剂盒 (TOYOBO), THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO), 多功能 DNA 纯化回收试剂盒 (BioTeke)。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 Trizol 总 RNA 提取试剂分别提取橘皮、橘肉以及橘核中总 RNA。凝胶电泳检测为 3 条带的总 RNA 进行反转录, 反转录反应按 cDNA 合成试剂盒说明书进行。

### 1.3 *LGT* 基因克隆与测序

根据文献报道<sup>[8]</sup>*LGT* 基因, 使用软件 Primer Primer 5.0、在线软件 <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer> 设计引物, 见表 1。以 cDNA 为模板, 使用 2×Taq PCR MasterMix 分别进行 PCR 扩增, 扩增体系 20 μL: 2×Taq PCR MasterMix, 10

μL; 正向引物, 1 μL; 反向引物, 1 μL; cDNA 模板, 5 μL; dd H<sub>2</sub>O 3 μL。考察扩增条件为 94 °C, 3 min; 30 循环 (94 °C, 30 s; 55~65 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C, 5 min。PCR 结果凝胶电泳检测, 多功能 DNA 纯化回收试剂盒 (BioTeke) 纯化回收 PCR 产物, 由上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.4 *LGT* 生物信息学分析

使用在线软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>, 找出 *LGT* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 并获得其编码蛋白质序列; 使用在线软件 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 将结果与 NCBI 中已登录的类似物种进行对比分析; 使用软件 MEGA 5.1 将结果相似性达 90% 以上的物种 *LGT* 构建进化树; 使用在线软件 <http://web.expasy.org/protparam/>, 分析其编码蛋白质序列的一级结构。运用 SOPMA 软件 [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测椪柑 *LGT* 蛋白的二级结构。使用 SWISS-MODEL 软件 <http://swissmodel.expasy.org/workspace/> 对其三级结构进行分析。

### 1.5 椪柑橘皮、橘肉、橘核 *LGT* 基因的表达

查阅文献报道<sup>[9]</sup>, 得到 *LGT* 基因的 real-time PCR 引物序列和内参基因 *β-actin* 的 RT-PCR 引物序列, 见表 2。扩增体系 20 μL: Thunderbird SYBR qPCR Mix, 10 μL; 正向引物 1 μL; 反向引物 1 μL; cDNA 模板, 5 μL; dd H<sub>2</sub>O, 3 μL。考察引物扩增曲线、熔解曲线及标准曲线, 考察 RT-PCR 条件: 95 °C, 2 min; 40 个循环 (94 °C, 15 s; 55~65 °C, 45 s; 60 °C, 45 s)。65~95 °C 进行熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5 °C 上升。确定条件后测试果实不同部分 *LGT* 基因表达量和 *β-actin* 基因的表达量。数据通过 Bio-Rad cycle IQ 进行分析, 用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法获得 *LGT* 基因的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 提取结果

Trizol 法提取所得 RNA 紫外分光光度法测定

表 2 *β-actin* 和 *LGT* 基因引物序列

Table 2 Primer sequences of *β-actin* and *LGT* genes

基因名称	引物序列(3'—5')
<i>β-actin</i>	正向: CCAAGCAGCATGAAGATCAA
	反向: ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG
<i>LGT</i>	正向: GCTGCTTATTACCATCACTTTACGG
	反向: GAAAGGATAAGGAGTTGACGGATGC

表 1 引物设计

Table 1 Primer design

编号	引物序列(3'—5')
引物 1	正向: ATGGGAAGTGAATCTCTTGTTTCAT
	反向: TCAATACTGTACACGTGTCCGTCG
引物 2	正向: CGGGATCCATGGGAAGTGAATCTCTTGTTTCAT
	反向: CGAGCTCTCAATACTGTACACGTGTCCGTCG
引物 3	正向: GCTGCTTATTACCATCACTTTACGG
	反向: GAAAGGATAAGGAGTTGACGGATGC
引物 4	正向: TGCTATGCTTTGGGTTCAATC
	反向: CGTTGCCGTCTTCTCCACTA

$A_{260}$  和  $A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  为 2.0, 凝胶电泳检测可见清晰 3 条带, 可用于后续实验, 见图 1。

### 2.2 LGT 基因克隆及测序结果

引物 2 在扩增条件: 94 °C, 3 min; 30 循环 (94 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C, 5 min 下, 可以得到 1 000 bp 左右的产物, 见图 2。测序结果为 1 530 bp 的序列。

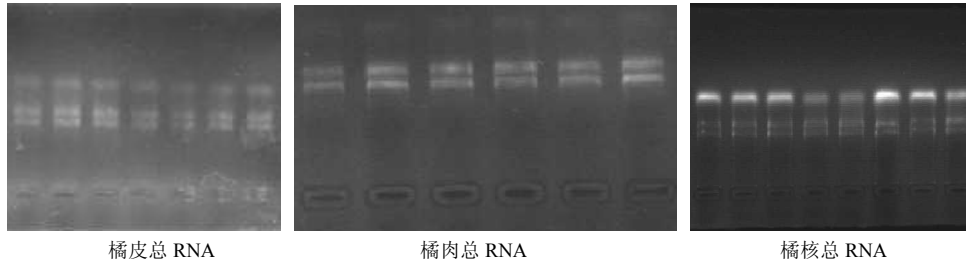


图 1 Trizol 法提取 RNA 凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of RNA extracted by Trizol

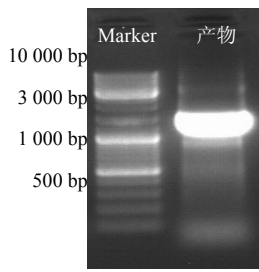


图 2 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products

性, 其中与同科植物甜橙 *Citrus sinensis* L.、阿尔及利亚橘 *C. clementina* Hort. ex Tan.、葡萄柚 *C. paradise* Macf. 的相似性分别达 100%、99%、98%。将相似性达 90% 以上的比对结果用 MEGA5.1 构建进化树, 见图 4。

通过 ProtParam 预测 LGT 蛋白分子式为  $C_{4585}H_{7642}N_{1530}O_{1932}S_{328}$ , 相对分子质量为 125 629.8, 理论等电点为 4.99。对该氨基酸序列进行亲疏水性分析, 结果见图 5, 横坐标表示氨基酸残基的序号, 纵坐标表示残基的疏水、亲水特性, 正值为疏水, 负值为亲水。椪柑 LGT 蛋白中疏水性最大值为 2.111, 最小值为 -0.567, 总平均疏水指数 (GRAVY) 为 0.711, 预测其为疏水性蛋白。SOPMA 软件预测椪柑 LGT 蛋白的二级结构为  $\alpha$ -螺旋占 40.24%,  $\beta$ -转角占 4.18%, 无规则卷曲占 41.04%, 延伸链占 14.54%, 结果见图 6。SWISS-MODEL 对其三级结构进行预测, 结果见图 7。

### 2.3 LGT 生物信息学分析结果

测序分析表明, 椪柑 LGT 基因全长 1 530 bp, 包含一段 1 509 bp 的 ORF, 编码 502 个氨基酸组成的蛋白, 见图 3。

将该蛋白通过 NCBI 上的 Blastp 比对发现, 该蛋白属于葡萄糖基转移酶基因家族。比对结果显示, 椪柑 LGT 基因与 100 余种 NCBI 上登录的植物有相似

```

1 atgggaactgaatctcttggctatgtcttactagtttcaatcccc
M G T E S L V H V L L V S F P
46 ggccatggccaaagtaaccggcttctggagctggcagactcctt
G H G H V N P L L R L G R L L
91 gcttcaagggtttcttctcaacttgaccacactgaaagcttt
A S K G F F L T L T T P E S F
136 ggcacaacaatgagaaaagcgggtaacttcacctacgagcctact
G K Q M R K A G N F T Y E F T
181 ccagttggcagcgttctcattcgcttcaatcttccgagatgga
P V G D G F I R F E F F E D G
226 tggagcagaagcagatccaaagcgggagatcttgaccacaatcatg
W D E D D P R R G D L D Q Y M
271 gctcaactgagcttattggcacaagaatgattccaaaataatc
A Q L E L I G K Q V I P K I I
316 aggaaaagcgtgaaagatcgcgccctttctgctgatcaat
R K S A E E Y R P V S C L I N
406 aaccatttacccttgggttctgatgtgctgaatccctaggg
N P F I P W V S D V A E S L G
451 ctctcgtctgctatgcttgggttcaactcttgctgttttgc
L F S A M L W V Q S C A C F A
496 gcttatacattacttccacgggttggctccatttccatgtagaa
A Y V H V F H G L V F P F S E
541 aaggaaccgaaatgatgttcagttgcggcgaatgcaactatg
K E F F I D V Q L F C M P L L
586 aagcagatgaaagtcgctagcttctgcatcctcaactcctat
K H D E V P S F L H P S T P Y
631 ccttcttggagagcatttggcagcacttctatgagcttggc
P F L R R A I L G Q Y E H L G
676 aagcgttttgcatttggcagcacttctatgagcttggc
K P F C I L L D T F Y E L E K
721 gagattatcattcagtcgcaaaaatcgccttataaaccgtc
E I I D Y M A K I C P I K P V
766 ggcctctgttcaaaaacctaaagctcaacttaaccgtcgc
G P L F K N P K A P T L T V R
811 gatgactgcatgaaaccgatgaatgcatgactgctgcacaaa
D B C M K P D E C I D W L D K
856 aagccacctatccttggcagcacttctgagcagcttgc
K P P S V V Y T S F G T V W
tacttgaagcagaacaggttgaagaattgctatgattggtg
901 Y L K Q E Q V E I I G Y A L L
aactcgggatttcttcttggctgagcagcagcagcagcagc
946 N S G I S F L W V M K P F P E
gactctggcttaaaattgttggatgcagatgggttctggag
991 D S G V K I V E L P D G F L E
aaagtggagataaggcgaagttgtgcaatggagtcacaaagaa
1 036 K V G D K G K V V Q V S P Q E
aaagtgtggctcaccctagtgttctgcttcttggctcactgc
1 081 K V L A H P S V A C F V T H C
ggctggaactcaaccatggagctgttggatcgggctgagggtg
1 126 G W N S T M E S L A S G V P F V
atcacttccgcaatggggtgactcaactgactgactgactg
1 171 I T F P Q W G D Q V T B A M Y
ttgtgtagtgttcaagcaggttaagatttccgclgagag
1 216 L C D V F K T G L R L C R G E
gcagagaacagggttaatttcaaggatgagtagcagagcttg
1 261 A E N R V I S R D E V E K C L
ctcagagccaccggcggcacttggcggcggcggcggcggcggc
1 261 L E A T A G P R A A E L K E N
tcttgaagtggaagagagcggcggcggcggcggcggcggcgg
1 306 S L K W K K E A E E A V A D G
ggctcgtcggataggacacttcaagcttcttcttggatgaaga
1 351 G S S D R N I Q A F V D E V R
aggagaagtgtcagattataaccagcagcagcagcagcagcagc
1 396 R R S V E I T S S K S V
caagagttaaagaaatggtgagagagcggcggcggcggcggc
1 441 H R V K E L V E K T A T A N E
aaagtgaattgtggactcagc 1509
K V E L V E S *
    
```

图 3 椪柑 LGT 基因编码的氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid sequence encoded by LGT gene in *C. reticulata*

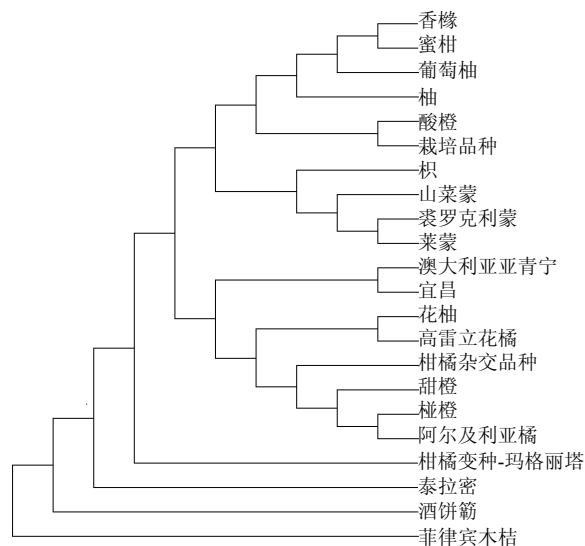


图4 椪柑 *LGT* 基因与相似物种的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *LGT* gene of *C. reticulata* and other related species

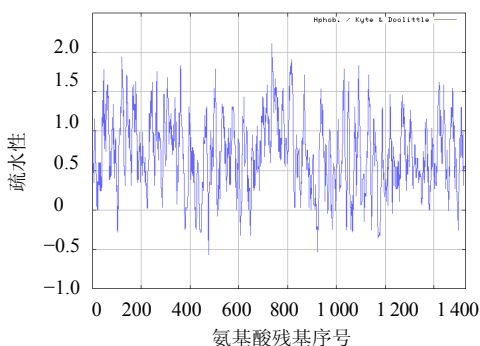
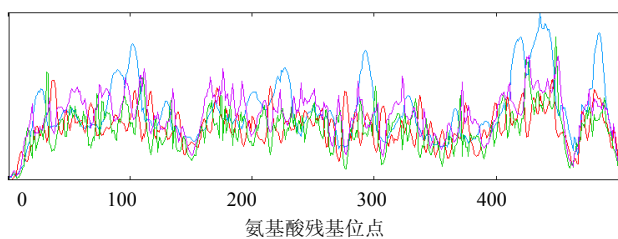


图5 *LGT* 蛋白质疏水性分析

Fig. 5 Analysis of hydrophobic *LGT* protein



蓝色- $\alpha$ -螺旋 红色-折叠 绿色- $\beta$ -转角 紫色-卷曲  
blue- $\alpha$ -helix red-turn green- $\beta$ -extended strand purple-coil

图6 *LGT* 蛋白二级结构预测图

Fig. 6 Two-dimensional structure prediction of *LGT* protein

### 2.4 椪柑 *LGT* RT-PCR 表达结果

引物序列可用于 RT-PCR, 条件考察结果是 *LGT* 扩增条件: 95 °C, 2 min; 30 c 循环 (95 °C, 15 s; 57 °C, 45 s; 60 °C, 45 s),  *$\beta$ -actin* 扩增条件为 95 °C, 2 min; 30 循环 (95 °C, 15 s; 57 °C, 45 s; 60 °C, 45 s), 65~95 °C 进行溶解曲线分析, 每个

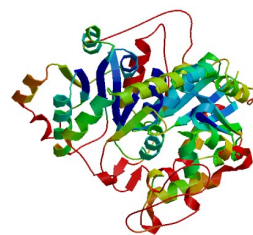


图7 *LGT* 蛋白三级结构预测图

Fig. 7 Three-dimensional model prediction of *LGT* protein

温度以每步 0.5 °C 上升。

选择  *$\beta$ -actin* 为内参基因, 每个样品做 4 个重复, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对样本基因进行表达差异相对定量分析。在本研究中选择橘核的表达为校准样本, 橘皮和橘肉为待测样本。根据所得结果橘肉中 *LGT* 基因表达量较高, 约为橘核表达水平的 1.477 5 倍(图 8)。

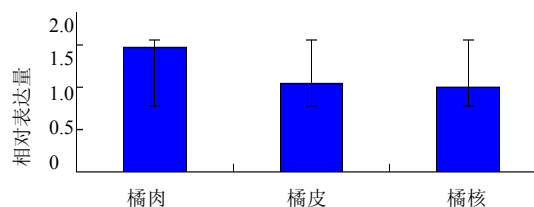


图8 *LGT* 基因相对表达量

Fig. 8 Relative expression histogram of *LGT* gene

### 3 讨论

研究克隆获得的椪柑 *LGT*, 序列全长为 1 530 bp, 具有 1 509 bp 的完整 ORF, 编码 502 个氨基酸。将该蛋白通过 NCBI 上的 Blastp 比对发现, 该蛋白属于 *LGT* 家族。预测 *LGT* 蛋白分子式为  $C_{458}H_{764}N_{153}O_{193}S_{32}$ , 相对分子质量为 125 629.8, 理论等电点为 4.99。并对该基因进行了生物信息学分析, 为椪柑 *LGT* 基因提供了更多更详尽的信息。

研究发现椪柑 *LGT* 基因表达存在一定的器官组织特异性, 在橘肉中表达量最高, 有研究表明柠檬苦素类物质在橘核中的量最高, 其次是果皮, 果肉中量最低<sup>[5]</sup>。在今后研究中, 可以同时结合化学成分研究, 找出基因表达与化学成分的相关性, 为进一步研究该基因的功能及其在柠檬苦素类物质合成过程中的作用及其调控机制研究提供更多的信息。

开展柠檬苦素类物质代谢工程研究, 进而利用细胞工程生产柠檬苦素类物质前景良好。深入探讨

柠檬苦素类物质合成代谢的关键酶的作用及调控机制,期望以基因工程手段干预增加柠檬苦素类物质的量成为现实。为最终实验利用基因工程结合细胞工程生产柠檬苦素类物质生产奠定理论基础。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 何中燕,裴瑾,莫书蓉,等. 不同橘核炮制品中柠檬苦素和诺米林的测定 [J]. 中成药, 2011, 33(10): 1761-1763.
- [3] 万福根,邓仁华,黄贵平,等. 中药橘核的研究进展 [J]. 中国药业, 2011, 20(17): 76-77.
- [4] 葛维,李小定,吴谋成. 柠檬苦素类似物及其配糖体的研究与应用进展 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(4): 1000-1004.
- [5] 蒋俊平,袁芳,吴宾,等. 柠檬苦素类似物研究进展综述 [J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 10-14.
- [6] 蔡护华,桥永文男. 柑桔果实中柠檬苦素类化合物的研究现状与展望 [J]. 植物学报, 1996, 38(4): 328-336.
- [7] 睦顺照,张倩,罗江会,等. 柚苦味形成相关基因 *cmLGT* 的克隆与分析 [J]. 果树学报, 2008, 25(4): 607-610.
- [8] 马鑫,王斌,胡雨晴,等. 梁平柚葡萄糖基转移酶基因的克隆及原核表达 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(8): 63-67.
- [9] 王斌,杨汶源,张军,等. 不同柑橘品种间柠檬苦素类似物葡萄糖基转移酶基因序列的分析及表达分析 [J]. 中国科技论文在线, 2012(1): 1-6.

---

## 2015年《中国医院药学杂志》征订启事

《中国医院药学杂志》系中国科协主管、中国药学会主办的综合性医院药学专业性学术核心期刊。本刊为湖北省优秀期刊,2008年中国科协精品科技期刊,主要面向全国医院药学工作者、医务人员和广大药学工作者,主要介绍国内外医院药学创新性成果、药学先进技术、临床合理用药、中西药制剂、药剂科的科学管理与改革、药学基础知识及理论等。

本刊为半月刊,大16开,每期为88页,定价18.00元,全年432元。每月15,30号出版,国内邮发代号38-50,国外代号:M 65-38。欢迎广大读者订阅。

本刊在线投稿网址: <http://www.zgyyyx.com>。编辑部地址: 武汉市胜利街155号(邮政编码: 430014); 电话: 027-82836596, 82809190; 传真: 027-82836596; E-mail: [pharmacy@vip.163.com](mailto:pharmacy@vip.163.com)。