

党参 CpUGPase 基因的克隆、序列分析与原核表达

李 晶¹, 郭琼琼¹, 孙海峰², 高建平^{1*}

1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘 要: 目的 为研究党参多糖代谢途径, 从党参 *Codonopsis pilosula* 根中克隆多糖代谢关键酶尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 CpUGPase 基因, 并进行序列分析和原核表达。方法 根据党参转录组中 CpUGPase 基因序列设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得 CpUGPase 开放阅读框 (ORF) 序列, 并进行 TA 克隆、测序和序列分析; 构建原核表达载体 PET-28a-CpUGPase, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 在异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导下进行表达。结果 CpUGPase ORF 序列全长 1 413 bp, 编码 470 个氨基酸。序列分析表明, CpUGPase 基因具有保守的 UGPase_euk 催化位点, 属于 A 型糖基转移酶蛋白家族。构建 PET-28a-CpUGPase 重组质粒, 获得稳定的原核表达体系。SDS-PAGE 结果显示该蛋白的大小约 54 900, 与预测的蛋白相对分子质量一致。结论 从党参根中克隆得到 CpUGPase 基因, 并建立了稳定的原核表达体系, 为进一步纯化 CpUGPase 蛋白, 研究其结构和功能奠定了基础。

关键词: 党参; CpUGPase; 基因克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)21-3876-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.21.021

Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of CpUGPase gene in *Codonopsis Radix*

LI Jing¹, GUO Qiong-qiong¹, SUN Hai-feng², GAO Jian-ping¹

1. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** In order to study the metabolic pathway of *Codonopsis Radix* polysaccharide, the key enzyme gene UDP-glucose pyrophosphorylase involving in the polysaccharide metabolism, a CpUGPase gene was cloned from the roots of *Codonopsis Radix*, and its sequence analysis and prokaryotic expression were performed. **Methods** According to the CpUGPase gene sequence of transcriptome of *Codonopsis Radix*, a pair of primers were designed, and the open reading frame (ORF) of cDNA sequences was obtained by RT-PCR. Then TA cloning, sequencing, and sequence analysis were performed. Prokaryotic expression vector PET-28a-CpUGPase was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for the expression under the induction of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). **Results** The ORF of CpUGPase had a length of 1413 bp coding for 470 amino acids. Sequence analysis showed that CpUGPase had a conserved UGPase_euk catalytic site and belonged to A type of glycosyl transferase protein family. PET-28a-CpUGPase recombinant plasmid was constructed to obtain a stable prokaryotic expression system. The SDS-PAGE results showed that the expressed protein were about 54 900 in size and consistent with the anticipated size. **Conclusion** The CpUGPase gene is successfully cloned, and the stable prokaryotic expression system is established. This study will provide a foundation for the further purification, structural and functional researches of CpUGPase protein.

Key words: *Codonopsis Radix*; CpUGPase; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPase) 在所有的真核生物碳水化合物代谢中起重要作用, 主要催化反应 $\text{Glc-1-P} +$

$\text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDPG} + \text{PPi}^{[1]}$ 。其产物 UDPG (尿苷二磷酸葡萄糖) 作为葡萄糖基供体主要参与蔗糖、纤维素、肌酐质、糖原等寡糖与多糖的合成, 同时也是尿苷

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072987); 国家科技支撑计划项目 (2011BAI07B07); 山西省高等学校中青年拔尖创新人才支持计划 (晋教材 [2012] 146 号)

作者简介: 李 晶 (1990—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为分子生药学。Tel: 15135102653 E-mail: jingli815@sina.com

*通信作者 高建平, 女, 教授, 研究方向为药用植物资源与植物药。Tel: (0351)4690345 E-mail: jpgao123@sina.com

二磷酸葡萄糖酸、尿苷二磷酸木糖、尿苷二磷酸半乳糖等核苷二磷酸单糖的前体^[2]。在植物的不同组织中 UGPase 所催化的反应方向不同。在源 (source) 组织中, UGPase 主要参与蔗糖的合成, 为蔗糖磷酸合成酶 (sucrose phosphate, SPS) 提供 UDP-葡萄糖, 同时 UDP-葡萄糖可参与下游多糖、糖脂、糖蛋白等的合成。在库 (sink) 组织中, UGPase 则参与蔗糖的降解, 将 UDP-葡萄糖转化成葡萄糖-1-磷酸, 葡萄糖-1-磷酸则可为淀粉合成提供碳骨架^[3]。

目前, 研究者已经从黄芪^[4]、水稻^[5]、棉花^[6]等植物中克隆得到 UGPase。吴晓俊等^[7]发现, 不同生长时期黄芪毛状根中总多糖量与 UGPase 活性具有较强的相关性, 较高的酶活性对应较高的多糖量; 转化水稻 OsUgp2 基因的紫芝菌株胞内多糖与胞外多糖较之野生型对照菌株均有较明显的提高^[8]; 在拟南芥中过表达棉花 GhUGPase 基因的转基因植株中可溶性糖量显著增加^[6]; 转化紫穗槐 AfUGPase 基因的烟草中, 细胞壁合成所需的基质多糖量显著增加^[9]; 过表达兴安落叶松 LgUGPase 基因的拟南芥植株中葡萄糖、果糖蔗糖量均显著高于野生型^[10]。这些研究表明: 植物体内 UGPase 基因过表达, 具有促进糖代谢及多糖合成与积累的作用。

党参 *Codonopsis Radix* 为桔梗科 (Campanulaceae) 植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 或川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv. 的干燥根^[11], 为传统补益类中药, 含有多糖、党参炔苷、党参苷、生物碱、萜类、挥发油等活性成分, 且多糖量远高于其他组分^[12]。党参多糖是目前研究最多的成分, 具有增强机体免疫、调节血液循环、抗溃疡、抗衰老等生物学活性, 亦可作为党参的质量评价标准^[13]。开展党参多糖代谢研究、阐明党参多糖合成代谢途径, 对党参多糖代谢调控、指导良种繁育具有重要的意义。党参的多糖代谢过程复杂^[14], 关于党参 UGPase 基因的克隆等研究至今未见有报道。为此, 本实验针对党参多糖代谢途径中的关键酶基因尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 CpUGPase 基因开展研究。根据党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf 转录组文库 CpUGPase 基因序列^[14], 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 从党参中扩增得到 CpUGPase 基因, 构建得

原核表达载体并成功诱导其表达, 以期为 CpUGPase 蛋白的功能研究奠定基础。

1 材料和试剂

2013 年 10 月, 于党参采收期, 自山西省晋城市陵川县党参 GAP 基地采集党参鲜根, 无菌水洗净后灭菌刀片迅速切碎投入液氮速冻, 之后存于 -80°C 用于总 RNA 提取。原植物由山西医科大学药学教研室高建平教授鉴定为党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.

大肠杆菌菌株 DH5 α 购自生工生物工程股份有限公司, 克隆载体 pMDTM18-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。表达宿主菌 BL21 (DE3) 获赠于普健生物 (武汉) 科技有限公司, 表达载体 PET-28a 购于武汉淼灵生物科技有限公司。

Trizol 总 RNA 提取试剂购自康为世纪公司; 反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser、*Ex taq* 酶、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I、T4 DNA 连接酶购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; X-Gal 和 IPTG 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 CpUGPase 基因全长 cDNA 的扩增

按照试剂盒说明书, 提取党参根总 RNA 并反转录合成 cDNA。根据转录组中 CpUGPase 序列, 利用 primer premier 5.0 和 Oligo 7.37 设计一对特异引物 CpUGPaseF: 5'-AATACAACACTTCCCCGT-3', CpUGPaseR: 5'-AGTAAACTCTCCCTCCG-3'。将 cDNA 稀释 10 倍后作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系包括: *TaKaRa Ex Taq* 0.25 μL ; 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer 5 μL ; dNTP Mixture 4 μL ; Template 2 μL ; CpUGPase-F 2.0 μL ; CpUGPase-R 2.0 μL ; 灭菌 ddH₂O 34.75 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

2.2 CpUGPase 基因克隆和测序

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶后, 采用胶回收试剂盒对目的片段进行回收, 并连接至 pMD18-T 载体上, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选, 重组质粒 pMD18-CpUGPase 委托北京六合华大基因科技股份有限公司双向测序, 确认核苷酸序列。

2.3 CpUGPase 的生物信息学分析

利用 NCBI 在线工具 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找 CpUGPase 的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。编码蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 进行分析。利用 NCBI 在线工具 “blastp” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对编码蛋白保守结构域进行分析。利用糖基化位点在线预测软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 对 CpUGPase 编码的氨基酸糖基化位点进行预测分析。利用在线软件 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白的跨膜区。利用在线工具 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽。应用在线工具 WoLFPSORT 进行亚细胞定位预测。氨基酸序列相似性通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的蛋白质序列数据库进行 blast, 并利用 DNAMAN6.0 软件进行氨基酸多重序列比对。通过 MEGA5.1 重建 Neighbor-joining 系统进化树, 设置 bootstrap=1 000。

2.4 CpUGPase 基因原核表达载体的构建

在 CpUGPase 基因 ORF 两侧添加酶切位点, 设计带有酶切位点的引物 CpUGPase (BamH I) F: 5'-CGCGGATCCATGGCTGCTGCCGATA-3', CpUGPase (XhoI) R: 5'-CCGCTCGAGTTAGATATCCTCGGG-ACCA-3', 以测序正确的、含有目的基因的重组质粒为模板进行 PCR 扩增。将扩增得到的目的基因切胶回收后与 PET-28a (+) 分别进行 BamH I 和 XhoI 双酶切, 琼脂糖电泳回收。按 1:4 物质的量比 (载体: 目的基因) 过夜连接, 转化至 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 挑取阳性克隆, 摇菌提取质粒并酶切鉴定, 获得重组质粒 PET-28a-CpUGPase。

2.5 PET-28a-CpUGPase 在大肠杆菌中的表达及表达条件的优化

分别转化 PET-28a-CpUGPase 和 PET-28a 至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 3 mL 含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h。然后以 1:100 的比例接种到含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 待 A_{600} 为 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 30 °C、140 r/min

诱导培养 5 h。诱导完成后取 1 mL 菌液 4 000 r/min 离心, 弃上清液, 加入 100 μ L SDS 上样缓冲液, 充分悬浮, 煮沸 10 min, 自然冷却至室温后进行 SDS-PAGE (5%浓缩胶, 12%分离胶) 分析, 以确定重组蛋白是否表达。

在此基础上, 通过添加不同浓度的 IPTG (终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)、诱导处理不同时间 (0、1、2、3、5、7、9 h)、在不同的温度 (25、30、37 °C) 下诱导, 进行诱导条件的优化。

3 结果与分析

3.1 党参 CpUGPase cDNA 序列的克隆

以党参 cDNA 为模板, 扩增得到 1 600 bp 左右的片段 (图 1), 通过 TA 克隆获得重组质粒 pMD18-CpUGPase, 测序结果表明所扩增序列与前期课题组已提交 NCBI 的登录号为 AJA91184.1 的 cDNA 序列一致。

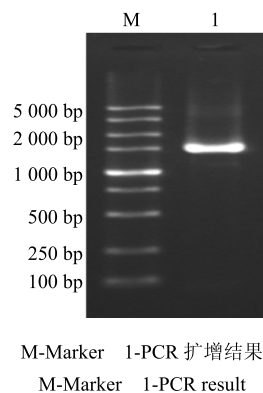


图 1 CpUGPase 基因 PCR 结果
Fig. 1 PCR result of CpUGPase gene

3.2 CpUGPase 基因的生物信息学分析

克隆得 CpUGPase 基因 cDNA 全长为 1 612 bp, 含完整的开放阅读框, 长度为 1 413 bp, 编码 470 个氨基酸。相对分子质量为 51 402 a; 理论等电点 (pI) 为 5.99, 带正电残基数 (Arg+Lys) 为 50, 负电残基数 (Asp+Glu) 为 55。该蛋白的不稳定系数为 25.94, 表明该蛋白质稳定。

NCBI blastp 分析结果显示, CpUGPase 蛋白具有保守的 UGPase_euk 的催化位点, 属于 A 型糖基转移酶家族 (图 2), 进一步证实所克隆序列属于 UGPase 基因家族。

对 CpUGPase 糖基化位点预测分析结果显示, 该蛋白在 162~164 位氨基酸 (N-Q-S) 处存在 N 连接糖基化位点, 在 6 位 (Tys)、35 位 (Ser)、169

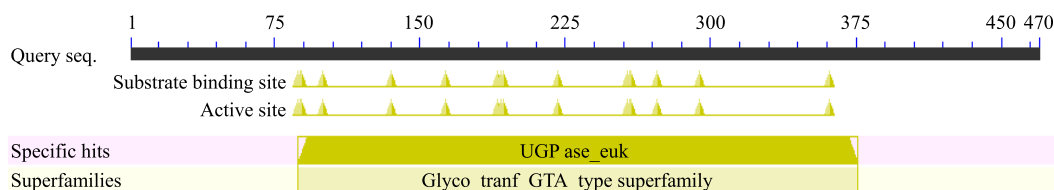


图 2 CpUGPase 蛋白保守区域分析

Fig. 2 Prediction of conserved domains of CpUGPase protein

位 (Tyr)、371 位 (Ser)、377 位 (Ser)、426 位 (Ser) 处存在 O 连接糖基化位点。包含植物 UGPase 中保守的第 356~361 位氨基酸残基 (RFLPVK) 与保守氨基酸位点 257 位 (Lys)、323 位 (Lys)、361 位 (Lys)、402 位 (Lys)、403 位 (Lys)。同时在 93~96 位氨基酸 (T-M-G-C) 处存在核苷酸结合环 (图 3)。

在线工具 WoLFPSORT 亚细胞定位分析结果显示, 细胞质定位系数为 9, 叶绿体定位系数为 3, 细胞核定位系数为 1, 说明 CpUGPase 蛋白最有可能位于细胞质中。TMHMM Server v.2.0 跨膜结构预测结果表明, CpUGPase 的整个氨基酸序列中, 未发现跨膜结构或膜结合区域, 推测其属于膜外蛋白。SignalP 4.1 Server 信号肽预测结果显示, CpUGPase 平均 S 值 0.110、C 值 0.115、Y 值 0.111、最大 S 值 0.110, 均小于 0.45, 表明 CpUGPase 蛋白序列中不存在已知的信号肽, 预示该蛋白不可能在细胞中发生移动, 与跨膜区分析结果相一致。

利用 DNAMAN 6.0 软件对 CpUGPase 和其他物种的 UGPase 进行氨基酸序列的多重比对分析, 结果表明 CpUGPase 与其他物种的 UGPase 均有较高的相似度, 其中与葡萄 UGPase 的相似度最高, 达 88% (图 4)。从 NCBI 上搜索到其他 11 个物种的 UGPase 蛋白序列, 利用 MEGA 5.1 软件重建系统发育树 (图 5)。结果显示党参 CpUGPase 与葡萄的亲缘关系相对较近, 可聚为一支, 而与同为药用植物的黄芪亲缘关系相对较远。

3.3 CpUGPase 基因原核表达载体的构建

用带有酶切位点的引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经电泳检测表明与预期大小一致 (图 6)。将目的片段切胶回收纯化后用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切, 连接到相同酶切回收后的 PET-28a 上, 获得 PET-28a-CpUGPase 原核表达载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 。重组质粒酶切鉴定正确后送测序 (图 7), 结果表明目的基因与原序列一致, 说明重组质粒 PET-28a-CpUGPase 构建成功。

```

1  MAAADTEKLAKLQSAVAALNQISQNEKSGFINLVSRYLSGAEQHV
46  EWSKIQTPTDEIVVPYDTLASVPEDSSETKLLDKLVVLKLNGL
91  GTTMCCTGPKSVIEVRNGLTFLDLIVVQIESLNTKYGCNVPLLLM
136 NSFNTHDDTLKIVEKEYSNSKIEHTFNQSQFPRLVVDEFPLPSK
181 GNAGKDGWYPPGHGDVFPALVNSGKLDTLLSQGKEYVVFVANSNDL
226 GAVVDLKILHHLIQNKNEYCMEVTPKTLADVKGGLISYEGKVQL
271 LEIAQVPDEHVNEFKSIEKFKIFNTNNLWVNLNAIKRLVQADALK
316 MEIIPNPKEVDGKVLQLETAAGAAIKFFDHSIGINVPRSRFLPV
361 KATSDLLLVQSDLYSVSDGYVTRNTARKNPANPSIELGPEFKKVG
406 SFLSRFKSIPSIHIELDCLKVSGDVYFGSSVVLKGKVVIAAKSGVK
451 LEIPNGAVLENKEVNGPEDI*
    
```

画直线部分为 N 连接的糖基化位点, 画框线部分为 O 连接的糖基化位点, 画双直线部为保守氨基酸残基, 阴影为保守的 Lys 残基, 画波浪线部分为核苷酸结合环

N linked glycosylation site was marked with a straight line, O-linked glycosylation sites was painted with red frame, the double line part was conservative amino acid residues; yellow shade was conservative Lys residues, wavy line part was nucleotide binding loop

图 3 CpUGPase 蛋白的氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid sequence of CpUGPase protein

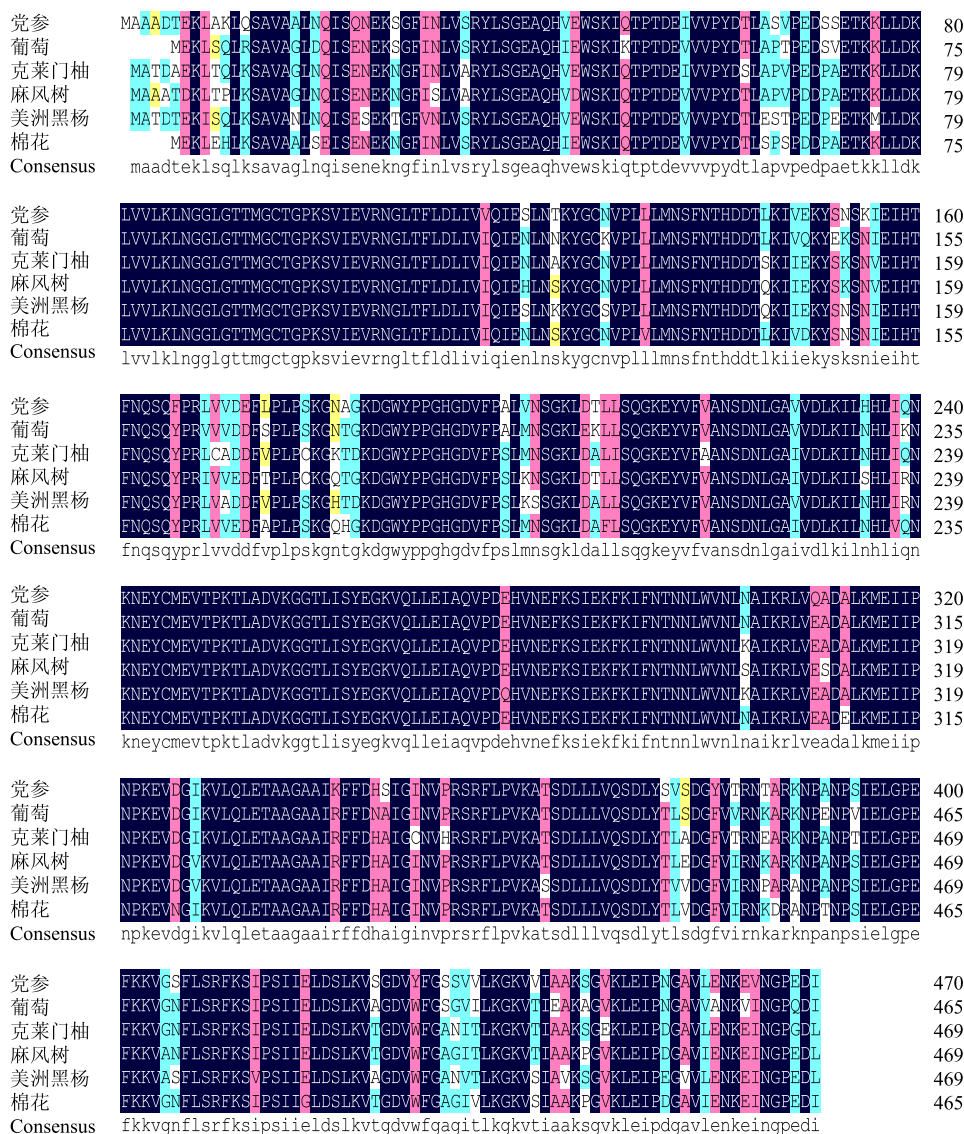


图 4 CpUGPase 与其他植物 UGPase 序列比对结果

Fig. 4 Multiple sequence alignment of CpUGPase amino acid sequence with UGPase sequence in other plants

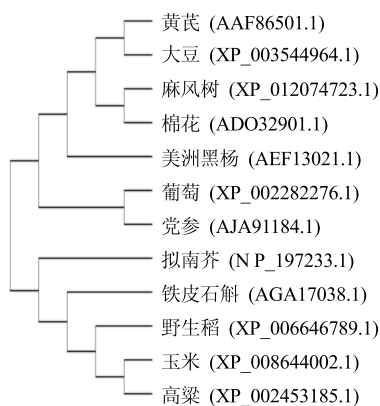
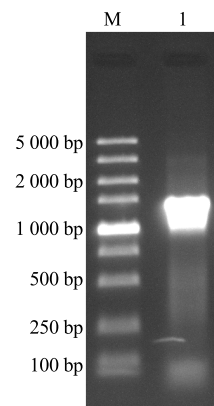


图 5 CpUGPase 蛋白与其他植物 UGPase 蛋白的系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic relationship of CpUGPase and UGPase proteins in other plants

M-Marker 1-CpUGPase ORF PCR 扩增结果
M-Marker 1-PCR result of CpUGPase ORF图 6 CpUGPase ORF PCR 扩增结果
Fig. 6 PCR amplification of CpUGPase ORF

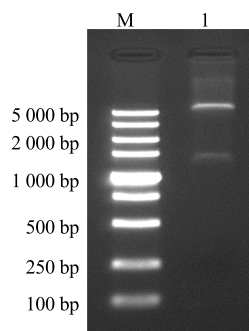
M-Marker 1-*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果M-Marker 1-double digestion result by *Bam*H I and *Xho* I

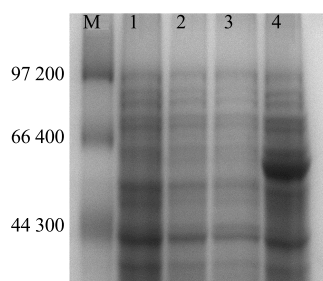
图 7 PET-28a-CpUGPase 质粒的双酶切结果

Fig. 7 Double digestion of PET-28a-CpUGPase plasmid

3.4 PET-28a-CpUGPase 在大肠杆菌中的诱导表达及条件优化

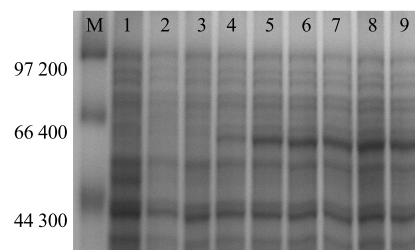
将 PET-28a-CpUGPase 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后进行 IPTG 诱导表达。结果表明, 与对照相比, PET-28a-CpUGPase 工程菌经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量 54 900 (含融合蛋白) 左右有一条蛋白条带(图 8), 表明重组质粒 PET-28a-CpUGPase 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达了 CpUGPase 蛋白。

设置的所有 IPTG 浓度均能有效诱导 CpUGPase 重组蛋白的表达, IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L 时重组蛋白表达量已达到最大, 从节约成本的角度选择诱导剂 IPTG 的终浓度为 0.4 mmol/L, 见图 9。



M-Marker 1-含 PET-28a 的菌未诱导 2-含 PET-28a 的菌诱导 3-含 PET-28a-CpUGPase 的菌未诱导 4-含 PET-28a-CpUGPase 的菌诱导

M-Marker 1-PET-28a-carrying host cells non induced 2-PET-28a-carrying host cells induced 3-PET-28a-CpUGPase carrying host cells non induced 4-PET-28a-CpUGPase carrying host cells induced

图 8 PET-28a-CpUGPase 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达的 SDS-PAGE 分析Fig. 8 SDS-PAGE analysis of expression products of *E. coli* BL21 (DE3)/PET-28a-CpUGPaseM-Marker 1-含 PET-28a 的菌未诱导 2-含 PET-28a 的菌诱导 (IPTG 浓度为 0.2 mmol/L) 3~9-含 PET-28a-CpUGPase 的菌 IPTG 诱导浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol·L⁻¹

M-Marker 1-PET-28a-carrying host cells non induced

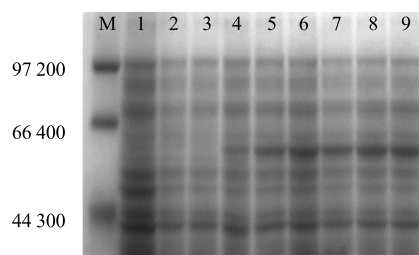
2-PET-28a-carrying host cells induced with 0.2 mmol/L IPTG

3~9-PET-28a-CpUGPase carrying host cells induced with 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG

图 9 不同诱导浓度 IPTG 下 PET-28a-CpUGPase 基因表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis on expression products of *E. coli* BL21 (DE3)/PET-28a-CpUGPase at different concentration

加入 IPTG 1 h 后 CpUGPase 重组蛋白即有表达, 在 3 h 后表达量达到最大, 之后其表达量占宿主菌总蛋白的比例基本保持一致, 因此可选择其最佳诱导时间为 3 h, 见图 10。诱导温度对 CpUGPase 重组蛋白的表达量有一定的影响, 在 30 °C 时该蛋白表达量最大, 见图 11。



M-Marker 1-含 PET-28a 的菌未诱导 2-含 PET-28a 的菌诱导 5 h 3~9-含 PET-28a-CpUGPase 的菌分别诱导 0~3、5、7、9 h

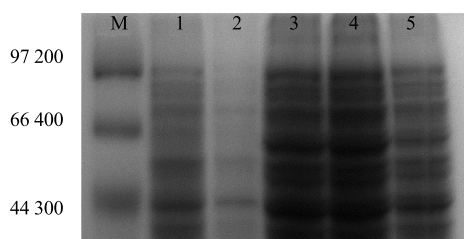
M-Marker 1-PET-28a-carrying host cells non induced 2-PET-28a-carrying host cells induced for 5 h 3~9-PET-28a-CpUGPase carrying host cells induced for 0~3, 5, 7, 9 h

图 10 不同诱导时间下 PET-28a-CpUGPase 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of expression products of *E. coli* BL21 (DE3)/PET-28a-CpUGPase at different time

4 讨论

已从党参中分离出多个党参多糖组分, 这些党参多糖主要由单糖和单糖衍生物组成, 其中单糖主要是戊糖和己糖, 如戊糖的阿拉伯糖、木糖, 己糖的葡萄糖、果糖、半乳糖等; 单糖衍生物主要是糖醇如甘露醇, 糖酸如半乳糖醛酸等^[15-17]。Feingold 等^[18]报道 UGPase 催化生成的 UDP-葡萄糖



M-Marker 1-含 PET-28a 的菌未诱导 2-含 PET-28a 的菌 37 °C 下诱导 3~5-含 PET-28a-CpUGPase 的菌 IPTG 诱导温度分别为 25、30、37 °C

M-Marker 1-PET-28a-carrying host cells non induced
2-PET-28a-carrying host cells induced at 30 °C
3—5-PET-28a-CpUGPase carrying host cells induced at 25, 30, 37 °C

图 11 不同诱导温度下 PET-28a-CpUGPase 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 11 SDS-PAGE analysis of expression products of *E. coli* BL21 (DE3)/PET-28a-CpUGPase at different temperatures

是 UDP-阿拉伯糖、UDP-木糖、UDP-半乳糖、UDP-葡萄糖醛酸等次生活化单糖的前体，而这些活化单糖是合成党参多糖的重要底物，因此 CpUGPase 是党参多糖生物合成过程中重要的酶，克隆和鉴定 CpUGPase 基因对党参多糖代谢途径研究具有重要意义。

早期的研究者认为植物中只有 1 种 UGPase 基因，但后来的研究发现在水稻^[5]、马铃薯^[19-20]、拟南芥^[21]等中存在两种相似性很高的 UGPase。水稻基因组中 2 个同源 UGPase 基因 UGP1 和 UGP2 核苷酸序列相似性为 81%，氨基酸序列相似性为 88%，这两种基因在根、茎、叶各组织均有表达，而 UGP2 则比 UGP1 表达量低很多。马铃薯中的 2 种 UGPase 基因分别为 UgpA 和 UgpB，这 2 种序列中有 27 个碱基不同，并导致了 5 个氨基酸的差异。拟南芥基因组中的 2 个 UGPase 基因 UGP1 和 UGP2 分别由 469 和 470 个氨基酸编码，它们的主要区别是 N 端、C 端的结构略有不同。综上所述，植物中可能存在 2 种 UGPase 基因，但至今还没有对 UGPase 基因家族作专门研究或对基因序列进行系统分析及归类的文献报道。

在党参转录组中，仅检测到 1 个 CpUGPase^[14]。本研究从党参中成功扩增出 CpUGPase 基因的 cDNA 序列，并对其编码的氨基酸序列的结构和功能进行了生物信息学分析。已有的研究表明，植物之间的 UGPase 有超过 80% 的相似度^[22]，本实验获得的 CpUGPase 蛋白与已知植物的 UGPase 氨基酸序列均有较高的相似度，其中与葡萄 UGPase 的相

似度达 88%。CpUGPase 含有植物组织中 UGPase 所具有的糖基化位点：162~164 位氨基酸 (N-Q-S) 处的 N 连接糖基化位点和 6 位 (Tys)、35 位 (Ser)、169 位 (Tyr)、371 位 (Ser)、377 位 (Ser)、426 位 (Ser) 处的 O 连接糖基化位点，可能与膜结合活性有关^[2,23]。在 93~96 位氨基酸 (T-M-G-C) 处存在核苷酸结合环，可能与核苷酸结合活性相关，96 位处的 Cys 为关键氨基酸，可能与 PPi 结合有关^[6,24]。另外含有活性中心的保守 Lys 残基：257 位 (Lys)、323 位 (Lys)、361 位 (Lys)、402 位 (Lys)、403 位 (Lys)，这些氨基酸对于维持 CpUGPase 蛋白质的空间结构，使其能够与底物结合并发挥催化活性起到了关键作用^[25]。

本实验还成功构建了 PET-28a-CpUGPase 原核表达载体，实现了 CpUGPase 基因的异源表达，同时对表达条件进行了优化，确定了 PET-28a-CpUGPase 重组质粒的最佳表达条件为 30 °C 下 0.4 mmol/L IPTG 诱导 3 h。CpUGPase 的成功表达为进一步研究 CpUGPase 蛋白结构和功能奠定了实验基础，也为阐明党参多糖代谢途径积累了资料。

党参多糖的研究虽然起步较早，但这些研究主要集中在含量测定及药理作用上，而极少涉及党参多糖的合成代谢机制。因此，有关党参多糖的研究还有待更深入的开展工作，在今后的研究中，可以将化学与分子生物学技术相结合，研究在党参中过表达 UGPase 对党参多糖的影响，为党参多糖的生物合成及调控机制研究提供更多的信息。

参考文献

- [1] Levine S, Gillett T A, Hageman E. Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. IT. Polymeric and subunit structure [J]. *J Biol Chem*, 1969, 244(20): 5729-5734.
- [2] Kleczkowski L A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1507-1515.
- [3] Ciereszko I. Sucrose and light activation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis* [J]. *Biochem J*, 2001, 354(1): 67-72.
- [4] Wu X J, Du M, Weng Y. UGPase of *Astragalus membranaceus*: cDNA cloning, analyzing and expressing in *Escherichia coli* [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(6): 689-693.
- [5] Abe T, Niiyama H, Sasahara T. Cloning of cDNA for

- UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm [J]. *Theoret Appl Genet*, 2002, 105(2/3): 216-221.
- [6] Wang Q, Zhang X, Li F. Identification of a UDP-glucose pyrophosphorylase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involved in cellulose biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(7): 1303-1312.
- [7] 吴晓俊, 刘 涤, 胡之璧. 黄芪毛状根中尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶活性与多糖含量关系的研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(2): 53-55.
- [8] 张 帆, 钟 威, 穆 虹, 等. 过量表达 OsUgp2 基因提高紫芝多糖含量 [J]. 菌物学报, 2011, 30(3): 442-452.
- [9] 刘文哲. 紫穗槐 UGPase 和 4CL 基因的克隆及在植物中的转化与表达 [D]. 大连: 大连理工大学, 2002.
- [10] 李宁宁. 兴安落叶松 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶和 UDP-葡萄糖脱氢酶基因的克隆及特性分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2014.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 马红燕, 高宏伟, 刘素波. 潞党参多糖的提取与精制工艺研究 [J]. 长治医学院学报, 2012, 26(5): 330-332.
- [13] 李黎星, 康杰芳. 中药党参的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(12): 2371-2373.
- [14] Gao J P. Transcriptome sequencing of *Codonopsis pilosula* and identification of candidate genes involved in polysaccharide biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): 3833.
- [15] Yang C X. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula* [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(1): 886-895.
- [16] Zhang Y J, Liang Z Y, Zhao W. Separation, purification and compositional analysis of water soluble polysaccharide CPPS_3 from *Codonopsis pilosula* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2005, 40(14): 1107-1109.
- [17] 杨丰榕, 李卓敏, 高建平. 党参多糖分离鉴定及体外抗肿瘤活性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2876-2878.
- [18] Feingold D S, Barber G A. *Methods in Plant Biochemistry* (Vol. 2) [M]. London: Academic Press, 1990.
- [19] Sowokinos J R C, Thomas M M, Burrell. Pyrophosphorylases in potato. V. Allelic polymorphism of UDP-glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113(2): 511-517.
- [20] Sowokinos, Vigdorovich V, Abrahamsen M. Molecular cloning and sequence variation of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNAs from potatoes sensitive and resistant to cold sweetening [J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(8): 947-955.
- [21] Meng M, Wilczynska M, Kleczkowski L A i. Molecular and kinetic characterization of two UDP-glucose pyrophosphorylases, products of distinct genes, from *Arabidopsis* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784(6): 967-972.
- [22] Meng M. Domain-specific determinants of catalysis/substrate binding and the oligomerization status of barley UDP-glucose pyrophosphorylase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(12): 1734-1742.
- [23] Lance W, Whelan S A, Hart G W. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2003, 302(3): 435-441.
- [24] Martz F, Wilczynska M, Kleczkowski L A. Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase [J]. *Biochem J*, 2002, 367(1): 295-300.
- [25] Katsube T, Kazuta Y, Tanizawa K, et al. Expression in *Escherichia coli* of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA from potato tuber and functional assessment of the five lysyl residues located at the substrate-binding site [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(35): 8546-8551.