

茶树尿苷二磷酸-葡萄糖-脱氢酶基因的克隆及其表达分析

郑玉成, 王鹏杰, 林 滢, 陈 笛, 郑知临, 孙 云, 叶乃兴*

福建农林大学 园艺学院茶学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002

摘要:目的 对参与多糖合成途径的茶树尿苷二磷酸-葡萄糖-脱氢酶基因 (*Camellia sinensis* UDP-glucose-dehydrogenase gene, CsUGD) 进行克隆、生物信息学分析、组织表达特异性分析及测定茶树不同器官组织多糖含量。方法 通过转录组数据获得茶树同源基因序列。利用 ProtParam、TMpred、signalP、NetPhos、SMART、SSPro 4.0 等在线软件进行生物信息学分析。VMD 编辑 CsUGD 基因蛋白质三维结构; Jalview 软件进行多序列比对; MEGA5.0 构建系统进化树。采用 qRT-PCR 对不同器官组织进行基因表达差异分析, 通过蒽酮硫酸比色法测定不同器官的多糖含量。结果 获得茶树 CsUGD 基因 (MG366591) 全长 cDNA 序列, 该序列全长 1 866 bp, 编码 480 个氨基酸。CsUGD 蛋白属于稳定亲水蛋白, 不含信号肽, 具有跨膜结构, 并与柿树亲缘关系最近。荧光定量 PCR 显示, CsUGD 在茶树的侧根中表达量最高; 蒽酮硫酸比色法测定显示, 在侧根中多糖含量最高。结论 首次从茶树中克隆出 CsUGD 基因, 阐明该基因在茶树生长发育中的重要作用, 在茶树多糖合成途径中起到关键作用, 为茶树育种并提高茶叶药用价值提供科学依据。

关键词: 茶树; 尿苷二磷酸-葡萄糖-脱氢酶; 基因克隆; 多糖含量; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5640-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.025

Cloning and expression of UGD-glucose-dehydrogenase gene CsUGD in *Camellia sinensis*

ZHENG Yu-cheng, WANG Peng-jie, LIN Yi, CHEN Di, ZHENG Zhi-lin, SUN Yun, YE Nai-xing

Key Laboratory of Tea Science at University in Fujian, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective To clone the UGD-glucose-dehydrogenase (CsUGD) gene involved in the polysaccharide metabolic pathway, and to analyze by bioinformatics analysis, tissue expression specificity analysis, and determination of polysaccharide content in different organs of *Camellia sinensis*. **Methods** The sequence of homologous gene was obtained by transcriptome. The bioinformatics analysis was carried out by using ProtParam, TMpred, signalP, NetPhos, SMART, SSPro 4.0 and so on. Three-dimensional structure of CsUGD protein was edited by VMD; Jalview software was used for multiple sequence alignment; MEGA5.0 was used for phylogenetic tree construction. Gene expression analysis in difference organs was performed by Real-time PCR and the determination of polysaccharide content in different organs was done by anthrone sulfuric acid colorimetric method. **Results** The cloned CsUGD gene (GenBank accession number MG366591) had a full length of 1 866 bp encoding a predicted protein of 480 amino acids. The results of bioinformatics showed that the protein encoded by CsUGD gene belongs to the stable hydrophilic protein with transmembrane structure but no signal peptide; Phylogenetic tree analysis showed that CsUGD keeps closest genetic relationship with *Diospyros kaki*. The highest expression was observed in lateral roots by RT-PCR. Determination of polysaccharides in different organs of *C. sinensis* by colorimetric method of anthrone and sulphuric acid showed that the content of tea polysaccharide (TPS) in lateral root was higher than other parts of *C. sinensis*. **Conclusion** The CsUGD gene was cloned from the tea plant for the first time and its important role in the growth and development of the tea tree was clarified. It also played a key role in the pathways of synthesis of *C. sinensis* polysaccharides, which provided a scientific basis for quality breeding of *C. sinensis* and improving the medicinal value of tea.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze; UGD-glucose-dehydrogenase; gene cloning; polysaccharide content; expression analysis

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 国家现代农业 (茶叶) 产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-19); 福建省“2011 协同创新中心”中国乌龙茶产业协同创新中心专项 (闽教科 [2015] 75 号); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (CXZX2017181)

作者简介: 郑玉成 (1994—), 男, 硕士研究生, 主要从事茶树栽培育种与生物技术研究。Tel: 18094159524 E-mail: 592447706@qq.com

*通信作者 叶乃兴 (1963—), 硕士生导师, 教授, 主要从事茶树栽培育种与茶叶品质化学研究。E-mail: ynxtea@126.com

茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, 其叶药食两用, 在唐代《新修本草》、宋代《太平圣惠方》等中多有记载。茶叶性凉, 味苦辛甘, 并具有下气消食、清利头目、清降痰浊的功效^[1]。茶多糖 (Tea Polysaccharides, TPs) 是茶叶的重要保健成分之一。药理研究表明茶多糖具有良好的生物活性^[2], 如降血糖^[3]、抗血栓^[4]、抗肿瘤^[5]等, 从茶树叶片中提取的高活性多糖可作为医药保健品的主辅料。茶多糖是一种多糖和蛋白质的复合体^[6]。其中多糖中的单糖主要由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖组成^[7]。茶树尿苷二磷酸-葡萄糖-脱氢酶 (UDP-glucose dehydrogenase, UGD) 是茶多糖合成中的一个关键酶, 它能催化 UDP-葡萄糖 (UDP-Glc) 氧化生成 UDP-葡萄糖醛酸 (UDP-GlcA), 此步骤是细胞壁多聚糖合成中的限制步骤, 而 UDP-葡萄糖醛酸随后会转化成半纤维素和果胶的前体包括半乳糖醛酸、木糖和阿拉伯糖等 UDP-葡萄糖衍生物^[8-9]。作为尿苷二磷酸-葡萄糖-脱氢酶的底物, UDP-Glc 是植物体内中重要的一种核苷酸糖, 不仅是高等植物中蔗糖合成的主要供体也是质膜中纤维素和胼胝质的直接前体^[10]。

UGD 在哺乳动物荷兰猪的肝脏首次被纯化出来^[11], 1996 年于高等植物大豆中分离^[12], 目前已在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L.^[13]、棉花 *Gossypium hirsutum* L.^[14]、桃树 *Prunus persica* L.^[15]、人 *Homo sapiens* L.^[16] 和老鼠 *Cavia porcellus* L.^[17] 等物种中克隆出来。在对其他植物中 UGD 基因的机制研究中主要通过其时空表达的特异性及信号传导实现。通过融合报告基因显示在拟南芥发育过程中它们有明显不同的组织特异性表达模式^[18-20]。运用荧光定量 PCR 分析表明, 按树的根、茎中表达量较高, 在叶中表达

量明显偏低^[21]。利用转座子技术研究发现该基因在玉米 *Zea mays* L. 细胞壁合成中起到关键作用^[22]。对超表达兴安落叶松的 UGD 基因的转基因拟南芥植株分析表明, 植株可溶性糖和半纤维素含量高于野生型植株^[23]。在逆境胁迫下分析盐藻和南极菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 的 UGD 基因发现, 该基因明显表达上调^[24-25]。

目前, 在茶树中尚未见有关 UGD 基因的研究报道。本研究以茶树品种“铁观音”为供试材料, 克隆并验证从茶树转录组中筛选出的茶树 UGD 基因全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析; 采用 qRT-PCR 技术研究茶树各部位该基因的特异性表达情况, 并采用苯酚硫酸法测定各部位器官多糖含量, 为利用茶树基因工程改善并提高茶叶药用价值提供科学依据。

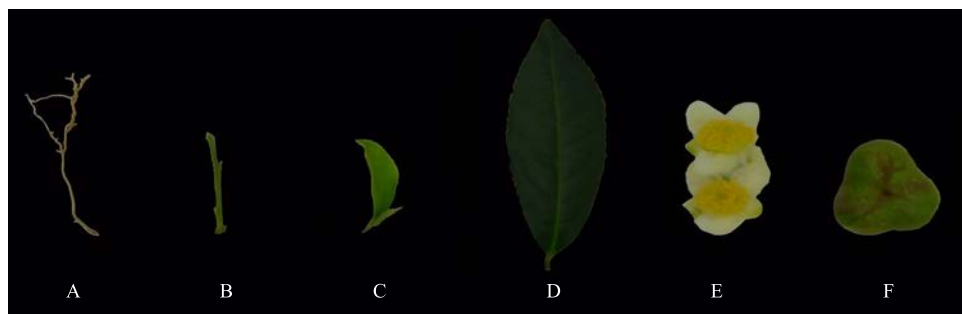
1 材料

2017 年 11 月中旬于福建农林大学南区教学茶场采集茶树的侧根、茎、芽叶 (一芽一叶)、老叶、花和茶籽, 以上部位各取 3 个生物学重复为供试材料 (图 1), 用于荧光定量及多糖含量测定。供试品种为“铁观音”, 经标记后的锡箔纸包好后, 迅速置入液氮速冻, -80°C 冷藏。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取上述材料各 0.1 g, 采用天根多糖多酚植物总 RNA 试剂盒提取茶树总 RNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, Nanodrop 2000 (Thermo scientific 公司) 测定其纯度和浓度。全式金 EasyscriptOne-step gDNA Removal and cDNA synthesis su-perMix 试剂盒进行 cDNA 的第 1 链合成, 具体步骤参照说明书进行。



A-侧根 B-茎 C-芽叶 D-老叶 E-花 F-茶籽

A-lateral roots B-stems C-bud and young leaf D-old leaf E-flower F-tea seed

图 1 “铁观音”茶树不同器官部位

Fig. 1 Different organs in *C. sinensis* of Tieguanyin

2.2 茶树多糖含量测定

参照王在贵等^[26]方法提取茶树不同组织的多糖,将上述材料 50 °C 干燥后研磨,茶树各部位分别取 8 g 研磨后的茶粉用于多糖含量测定,并设置 3 个技术重复采用苯酚-硫酸比色法绘制葡萄糖标准曲线^[26],取 20 mg 葡萄糖(分析纯)105 °C 烘至恒定质量并定容至 500 mL,用于配制标准葡萄糖溶液(0.040 mg/mL)。取 15 个 20 mL 试管并分成 3 组,设置 5 个葡萄糖溶液浓度梯度,分别加入葡萄糖标准溶液 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,加蒸馏水补至 2 mL。每个试管依次加入苯酚溶液(0.06 g/mL)1 mL,浓硫酸 5 mL,静置 10 min 摇匀,放入 40 °C 恒温水浴锅中 15 min,测定各质量浓度的 $A_{490\text{nm}}$ 值。以 $A_{490\text{nm}}$ 值为横坐标(X),以质量浓度为纵坐标(Y)绘制标准曲线回归方程 $Y=0.0055 X+0.0731$, $R^2=0.9979$ 。方法学考察参考王在贵等^[26]方法。

采用苯酚-硫酸比色法对多糖含量进行测定,将提取后的茶粗多糖 25 mg 定容至 25 mL。吸取

1 mL 定容好的样品液加入超纯水 9 mL,取稀释后的样品液 2 mL 于试管中,依次加入苯酚溶液(0.06 g/mL)1 mL,浓硫酸 5 mL,静置 10 min 摇匀,放入 40 °C 恒温水浴锅中 15 min。根据标准曲线方程计算多糖含量。

2.3 茶树 UGD 的基因克隆

在茶树高通量全转录组(SRX1676258)中筛选出 1 条 UGD 全长序列,在 NCBI 上经 BLAST 比对后发现该基因具有完整的开放阅读框(ORF),并在该基因的起始密码子上游和终止密码子下游设计引物用于 RT-PCR 扩增(表 1),验证全长的准确性。RT-PCR 扩增体系为 1 μL 模板,0.5 μL 引物,2.5 μL 10 $\times$ TransTaq HiFi Buffer,0.2 μL HiFi Polymerase,2 μL dNTPs,最后用 ddH₂O 补至 25 μL 。程序为 5 min 95 °C 预变性,95 °C、30 s,55 °C、30 s,72 °C、2 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。另参照俞滢等^[27]方法进行后续克隆实验,PCR 产物经回收、连接、转化、测序后,得到茶树 UGD(CsUGD)全长 cDNA 序列。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列(5'→3')	用途
CsUGD-RT-F	GCGTGAGGAGGTTCTAGATA	验证 CsUGD 全长 cDNA 序列 实时荧光定量 PCR
CsUGD-qRT-F	CAAGGCACTGAAGGATGTC	
CsUGD-qRT-R	GCACTCGCAAATGTAAACC	
Cs- β -actin-qPCR-F	GCCATCTTTGATTGGAATGG	茶树内参基因
Cs- β -actin-qPCR-R	GGTGCCACAACCTTGATCTT	

2.4 CsUGD 生物信息学分析

在 NCBI 上查找序列 ORF 并进行同源性分析,利用在线软件 ProtParam、TMPred、signalP、WoLF PSORT Prediction 和 TargetP 1.1 Server,NetPhos 3.1 Serve,SMART 对蛋白质基本理化性质,跨膜结构区、信号肽、蛋白质磷酸化位点、蛋白质保守结构域进行预测与分析。利用 SSPro 4.0 和 SWISS-MODEL 对蛋白质二级结构与三级结构进行分析。利用 VMD 蛋白质可视化软件编辑 CsUGD 基因蛋白质三维结构,利用 Jalview 软件进行多序列比对,利用 MEGA5.0 构建系统进化树。

2.5 CsUGD 荧光定量表达分析

实时荧光定量(qRT-PCR)步骤按照 Transstart[®] Tip Green qPCR superMix 试剂盒说明书进行。设计的荧光定量引物序列为 CsUGD-qRT-F、CsUGD-qRT-PCR(表 1),另外根据孙美莲等^[28]以 β -actin 为内参基因,检测 CsUGD 基因在茶树不同器官部位的表达量。最后结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定

量分析。

3 结果与分析

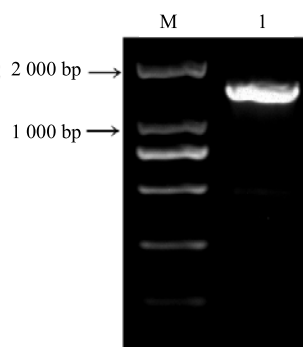
3.1 茶树 UGD 克隆及序列分析

以“铁观音”叶片 cDNA 为模板经 PCR 扩增后获得茶树 UGD 全长基因,经琼脂糖凝胶电泳检测与实验 2 期相符(图 2)。测序结果拼接后,经 NCBI BLASTx 显示,具有完整的 ORF,命名为 CsUGD,GenBank 登录号为 MG366591。该序列全长 1 866 bp,编码 480 个氨基酸(图 3)。包含 134 bp,非编码区(UTR)、1 443 bp ORF(134~1 576 bp)和 9 bp,非编码区(3'UTR)。就功能结构而言,在蛋白质序列的第 89 和 156 位的 Pro 残基代表蛋白质结构中的主要弯曲位置,且在所有物种都是保守的^[11]。在 N-terminus 附近发现的 GXGXXGG 模式(aa#8-14)是辅酶结合折叠的特征。该模体通过牛 UGD 蛋白的化学修饰,然后进行肽序列测定^[29],真核生物 UGD 的放射性催化位点(GFGGSCFQKDIL)也具有同源性,该位点位于蛋

白质的中间部分,并具有中央 Cys 残基(aa#272),据推测该过程涉及 UDP-葡萄糖醛酸转化为 UDP-葡萄糖醛酸盐的第 2 个半反应中的酶催化作用^[11]。

3.2 CsUGD 蛋白质理化性质及结构预测

利用在线软件 ProtParam 对 CsUGD 进行蛋白质基本理化性质预测与分析。结果显示该蛋白相对分子质量为 52 995.84,等电点为 5.81,包括 7 466 个原子,分子式为 C₂₃₇₁H₃₇₄₁N₆₂₉O₇₀₄S₂₁。其中该蛋白氨基酸组成成分中缬氨酸(VAL)含量最高,占比达到 9.6%,组氨酸(HIS)含量最低,为 1.2%;不稳定系数为 22.1,为稳定蛋白。脂肪指数为 92.00。亲疏水性分析表明该蛋白总平均亲水性为-0.077,推测该蛋白为亲水性蛋白。使用 TMpred 预测,得



M-DNA 分子标准量 1-CsUGD 基因 PCR 产物
M-DNA marker 1-PCR products of CsUGD

图 2 CsUGD 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of CsUGD

```

1      CCGGGATCGGTTTGTCTGTCTCCGACTCTTGACGACCCCCAACCTCTTTAGCACACTTCTCTCCCTAGATTCT
76     CGTTCTACTTTCTCTCTATTGATCTTCCGCGTGAGGAGGTCTAGATAGAGAAGGAAAATGTTGAAGATTGCTG
1      M V K I C C
151    CATTGGAGCTGGGTATGTTGGTGGCCCTACCATGGCCGTGATAGCCCTCAAGTGCCCTCCCGTTGAAGTGGCCGT
7      I G A G Y V G G P T M A V I A L K C P S V E V A V
226    TGTTGATATTTCTATTCTCGTATTACAGCCTGGAACAGTGACCAGCTCCCCATCTACGAGCCAGGTCTTGATGA
32     V D I S I P R I T A W N S D Q L P I Y E P G L D D
301    TGTGGTGAAGCAGTGCCGCGGCAAGAACCTCTTCTCAGCACTGATGTGGAGAACATGTATGCGAAGCTGATAT
57     V V K Q C R G K N L F F S T D V E K H V C E A D I
376    AGTCTTTGTTTCTGTCAACACGCCAACCAAGACCAGGGGCTTGGAGCAGGCAAGCTGCAGATTGACATACTG
82     V F V S V N T T K T R G L G A G K A A D L T Y W
451    GGAGAGCGCAGCTCGCATGATTGCTGATGTGTCAAAATCTGATAAAATAGTGGTCGAGAAATCAACAGTCCCGT
107    E S A A R M I A D V S K S D K I V V E K S T V P V
526    CAAAACAGCTGAGGCAATAGAGAAAATTCTGACCCACAACAGCAAGGGAATTAACCTCCAAATCTCTCAAACCC
132    K T A E A I E K I L T H N S K G I N F Q I L S N P
601    AGAGTTCTTGCAGAGGGTACTGCAATCCAAGATCTTCCGCTCTGACCGGGTCTCATTTGGAGGCAGGGATAC
157    E F L A E G T A I Q D L F R P D R V L I G G R D T
676    CCCAGATGGCCAGAAGCAATCAAGGCACTGAAGGATGCTACGCTCACTGGGTCCCTGAAGACCCGATCATATG
182    P D G Q K A I K A L K D V Y A H W V P E D R I I C
751    CACCAATCTATGGTCTGCAGAGCTCTCTAAGCTTGCTGCCAATGCTTTCTTGGCCAGAGAATCTCATCTGTTAA
207    T N L W S A E L S K L A A N A F L A Q R I S S V N
826    TGCCATGTCAGCACTGTGTGAGGCTACCGGAGCCGATGTGACACAGGTGTCTTATGCTGTGGGTACCGACTCTAG
232    A M S A L C E A T G A D V T Q V S Y A V G T D S R
901    GATTGGGCCCAAGTTCCTGAATGCTAGTGTGTTGGTGGTCTTCTGCTCCAAAAGGATATCTTGAACCTGGT
257    I G P K F L N A S V G F G G S C F Q K D I L N V
976    TTACATTTGCGAGTGCAATGGCCTTCCGGATGTAGCTGAATACTGGAACAAGTCATCAAGATCAATGATTATCA
282    Y I C E C N G L P D V A E Y W K Q V I K I N D Y Q
1 051  GAAGAGTCGCTTTGTGAACCGTGTGTTTCCATGTTTAAACAGTTTCAAACAAAAGGTGGCCATTGTTGGG
307    K S R F V N R V V S S M F N T V S N K K V A I L L G
1 126  GTTGGCTTCAAGAAGGATACAGGTGACACCGAGAGACCCTGCTATTGATGTGTGCAAGGGCTATTGGGGGA
332    F A F K K D T G D T R E T P A I D V C K G L L G D
1 201  CAAGGCCAGGTTGAGCATCTATGACCCACAGGTACGGGAGGACCAATCCAGAGGATCTTACAATGAACAAGTT
357    K A R L S I Y D P Q V T E D Q I Q R D L T M N K F
1 257  TGACTGGGACCATCTCTCCACCTCCAGCCAAATGAGTCTTACAATGTGAAGCAAGTCAGTGTGGTTTGGGACGC
382    D W D H P L H L Q P M S P T T V T V K Q V S V W D A
1 351  ATACGAGGCAACAAAAGACGCTCATGTTGTTGCTTCTCACCAGTGGGATGAGTTCAAGAATCTGGATTACCA
407    Y E A T K D A H G I C I L T E W D E F K N L D Y Q
1 426  AAGGATATATGACAACATGCAGAAGCCAGCTTTCGCTTTGATGGTAGGAACGTTGTGAATGCAGATAAACTGAG
432    R I Y D N M Q K P A F V F D G R N V V N A D K L R
1 501  GGATATTGGGTTTATTGTACTCAATTGGTAAGCCTCTGGATGCTTGGCTCAAGGACATGCCTGCCGTGGCTTA
457    D I G F I V Y S I G K P L D A W L K D M P A V A
1 576  AAGAAGATATGCTCTGTTCAATTGGCTTGTGTTGAATCAAAGAATTATAGTTAAGACGCGGTCTGATCCTTTACC
1 651  CTTTCCCTCCCTGTTTGGAGATTATTGGTATTACCGTTTATCTAAGCAGTAGGCTATGTGTTTTTGTGCTT
1 726  ACATTAATAATAAGAACTCAATTTGTACTTCAATTTATTTTGTCTATAAAATTGTGACATTTTGAAACCATTTGT
1 801  TTCATTTGTTTCGTAAGAGTTGGTCTGTTAACAATAATACAGTATTAGATACTCCATTTTATCTT

```

起始密码子和终止密码子用阴影标出, GXGXXGG 模式用方框标出, 放射性催化位点(GFGGSCFQKDIL)用下划线标出, Pro 残基用圆圈标出
The initiator and terminator codon are shaded, the model of GXGXXGG are marked by box, the radioactive catalytic site are marked by underline and
Pro residue are marked by circle

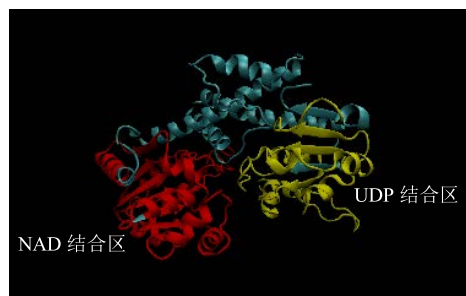
图 3 CsUGD 的全长序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and putative amino acid sequence of CsUGD

分超过 500 的为可能的跨膜结构区,结果显示,此蛋白含有两个跨膜结构区,第 1 个跨膜结构区是从第 1 个氨基酸残基到第 20 个氨基酸残基,方向从内到外;第 2 个跨膜结构区是从第 1 个氨基酸残基到第 22 个氨基酸残基,方向从外到内,推测该基因的功能相对稳定。使用 SignalP 在线预测,该蛋白没有信号肽,不属于分泌蛋白。采用 WoLF PSORT Prediction 对蛋白质进行亚细胞定位,结果显示最有可能定位在细胞膜外,该结果与 TargetP 1.1 Server 预测相一致。使用 NetPhos 3.1 Serve 对蛋白进行磷酸化位点进行预测分析,磷酸化位点预测表明,茶树尿苷二磷酸-葡萄糖 6-脱氢酶蛋白质在序列中的 15 个丝氨酸、15 个苏氨酸和 4 个酪氨酸这三种氨基酸上可能发生磷酸化修饰,表明该蛋白对植物的代谢方面起到重要的调节作用。使用 SMART 服务器对 CsUGD 蛋白进行保守结构域分析,分析结果显示 CsUGD 蛋白第 2~191 位蛋白、第 210~305 位蛋白和 328~452 位蛋白是 3 个高度保守的结构功能区域,分属于 UDP—葡萄糖/GDP—甘露糖脱氢酶家族的 3 个典型区域,分别为 N 端 NAD 结合区 UDPG_MGDP_dh_N、中间部分 UDPG_MGDP_dh 和 C 端 UDP 结合 UDPG_MGDP_dh_Cdh_C,推测该基因编码的蛋白质是脱氢酶家族的成员。采用 SSPro 4.0 对 CsUGD 蛋白二级结构进行预测,预测结果显示, α -螺旋(H)占 43.4%; β -折叠占 13.6%;无规卷曲占 43%。使用 SWISS-MODEL 对 CsUGD 蛋白三维结构进行预测,并使用 VMD 软件绘制蛋白质三维结构(图 4),该模型基于人的尿苷二磷酸-葡萄糖 6-脱氢酶进行建模,二者相似度高达 61.52%,全模型质量评估值为 0.80,其预测结果具有较高的可信度。

3.3 对 CsUGD 蛋白质系统发育分析

采用 BLASTP 对该基因进行同源对比分析,结果显示该基因对比出的 UGD 基因相似度均在 90%



红色区域表示 N 端 NAD 结合区,黄色部分表示 C 端 UDP 结合区
The red area indicates the N-terminal NAD binding domain, the yellow part indicates the C-terminal UDP binding region

图 4 CsUGD 蛋白三级结构分析

Fig. 4 Three-dimensional structure analysis of CsUGD protein

以上,如与柿树 *Diospyros kaki* L. (ASL69220.1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (XP 010661131.1)、向日葵 *Helianthus annuus* L. (XP 022021963.1) 的相似性分别达到 96%、94%和 93%。其中与柿树的相似度最高。保守结构域预测显示,CsUGD 中的第 3~189 位氨基酸序列为 NADB-Rossmann 超家族的保守结构域,这也是 UDP 的主要功能域(图 5)。使用 Jalview 软件对 CsUGD 与其他 18 种植物的 UGD 蛋白氨基酸序列进行比对,结果显示(图 6)UGD 蛋白在各种植物中具有高度的保守性。利用 MEGA5 对选取得 18 条不同种植物的 UGD 进行进化树分析,结果显示(图 7)这些 UGD 可以聚为 2 类(A 和 B)。其中,茶树 CsUGD 聚在 A 组中,且与柿树(ASL69220.1)关系最近。

3.4 CsUGD 在茶树不同部位的表达分析

采用 qRT-PCR 技术,检测不同茶树部位的 3 个生物学重复 CsUGD 基因表达量变化情况。结果显示(图 8),在茶树不同器官中 CsUGD 基因的表达情况差别明显,其中在根部表达量最高,其次是芽叶,两者差异不明显。在花中的表达量最低,

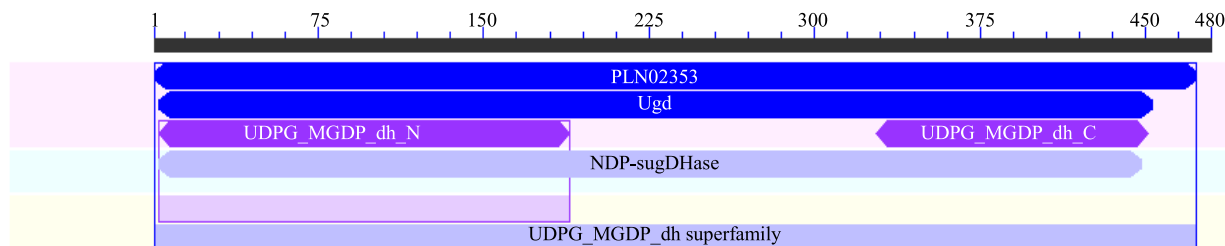
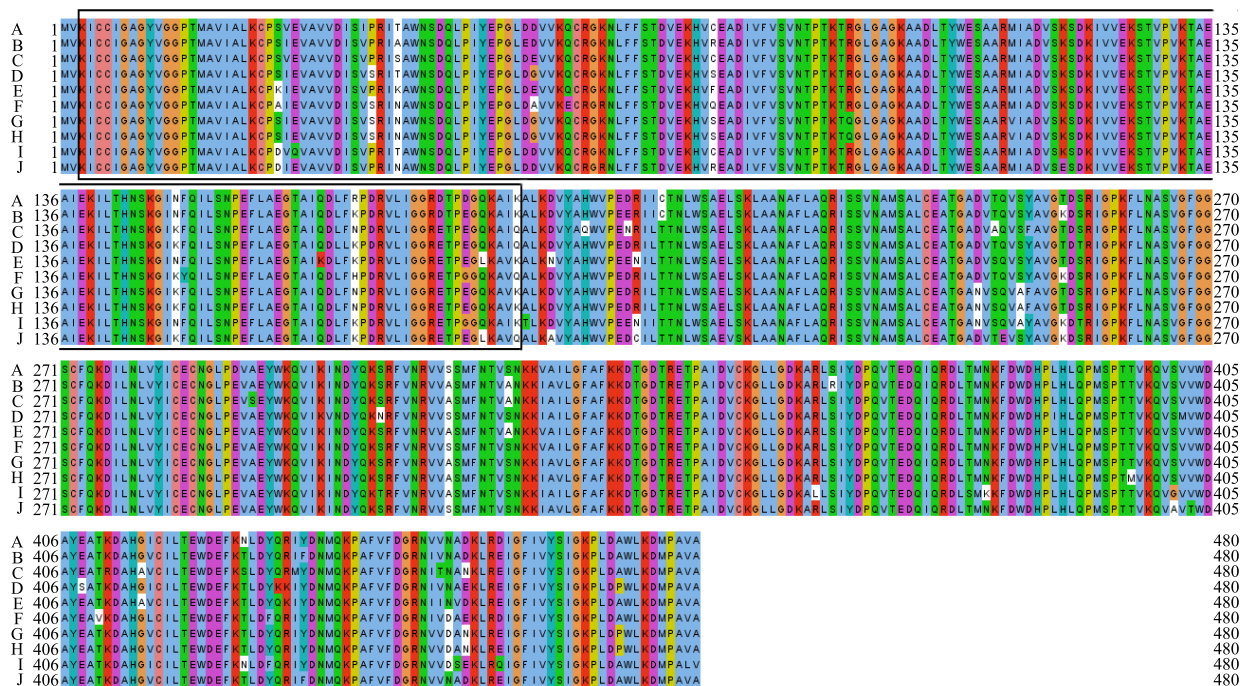


图 5 CsUGD 蛋白功能性位点分析

Fig. 5 Functional site analysis of CsUGD protein



方框表示 NADB-Rossmann 超家族的保守结构域；不同植物间相同蛋白质用同一颜色表示，不同蛋白质用白色以示区别；A-茶树 UGD (MG366591)；B-柿树 UGD (ASL69220-1)；C-土瓶草 UGD (XP_010661131)；D-葡萄 UGD (XP_010661131)；E-欧洲樟子松 UGD (XP_022853008.1)；F-石榴 UGD (OWM74789.1)；G-克莱门柚 UGD (XP_006431272.1)；H-甜橙 (XP_006482729.1)；I-洋蓐 UGD (KVI09089.1)；J-醉蝶花 UGD (XP_010528399.1)

Sequence boxed represent NADB-Rossmann of CsUGD protein; The same protein is expressed in the same color among different plants, and different proteins are shown in white to distinguish; A-*Camellia sinensis* (MG366591) B-*Diospyros kaki* (ASL69220.1) C-*Cephalotus follicularis* (XP_010661131.) D-*Vitis vinifera* (XP_010661131.) E-*Europaea sylvestris* (XP_022853008.1) F-*Punica granatum* (OWM74789.1) G-*Citrus clementina* (XP_006431272.1) H-*Citrus sinensis* (XP_006482729.1) I-*Cynara scolymus* (KVI09089.1) J-*Tarenaya hassleriana* (XP_010528399.1)

图 6 CsUGD 与其他植物 UGD 同源比对

Fig. 6 Amino acid sequence alignment of CsUGD and that of other plant species

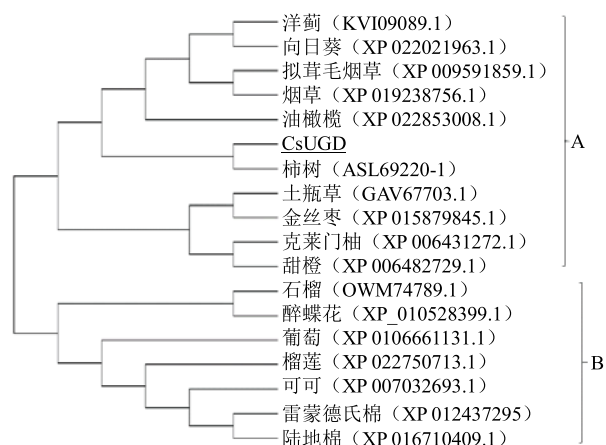


图 7 CsUGD 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 7 NJ phylogenetic tree of CsUGD amino acid sequence

CsUGD 在茶树根中的表达量是花中的 30 倍，芽叶中的表达量是老叶表达量的 3.69 倍。

3.5 茶树不同组织器官多糖含量分析

采用蒽酮硫酸比色法，测定茶树不同组织器官

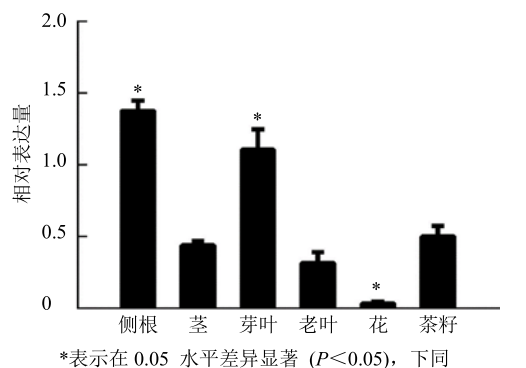


图 8 茶树不同器官 CsUGD 基因表达分析

Fig. 8 Expression analysis of CsUGD in different organs of *C. sinensis*

的多糖含量。结果显示图 9，茶树根、芽叶和茶籽中多糖显著高于茶树其他部位，达到 1.61%、1.35% 和 1.14%。在茶树茎中茶多糖含量最低，只有 0.74%。在茶树茎、老叶和花中的多糖含量分别为 0.74%、0.86% 和 0.89%。

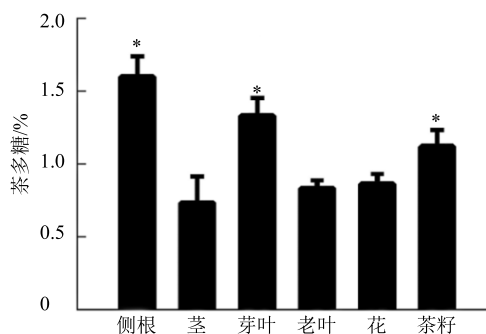


图9 茶树中不同器官茶多糖含量分析

Fig. 9 Analysis of tea polysaccharide content in *C. sinensis* obtained by different organs

4 讨论

大多数光合作用固定的碳被结合到细胞壁聚合物中,使细胞壁成为陆地最主要的可再生能源之一,多数中草药多糖具有极高的药用与经济价值,如黄芪多糖^[30]、人参多糖^[31]和灵芝多糖^[32]等。核苷糖是多糖合成的活化底物,它的合成由一系列酶来完成,其中 UDP-Glc 经 UGD 生成 UDP-GlcA 是其关键步骤^[33]。在本研究中,笔者首先将茶树 UGD 基因的全长序列克隆出来,经分析表明, CsUGD 基因编码 480 个氨基酸,相对分子质量为 52 995.84,这与从不同物种组织中纯化和部分纯化的 UGDHs 测定的结果(52 000~53 000)相似^[12,34]。经生物信息学分析,该基因属于 UDP-Glc/GDP-甘露糖家族,并具有该家族 3 个典型的结构域,可能是植物多糖代谢的主要功能区或与植物细胞识别受体有关。经比较发现,该基因不仅在植物中高度保守外,在高等动物、微生物、真核生物及原核生物中均具有较高的保守性。在高等动物中,该基因主要参与了包括益生菌、雄激素和血红素蛋白的形成^[35];在真核细胞中,如蓝藻和盐藻,主要与细胞防御机制有关,包括逆境胁迫和非生物胁迫,并为细胞产生生命活动必须的阳离子螯合剂^[24,36];在原核生物中,该基因主要参与了荚膜多糖的合成并与逆境胁迫有关^[25];植物中主要与细胞的生长发育以及逆境胁迫有关。对 CsUGD 跨膜结构及信号肽分析发现, CsUGD 不具有信号肽,即该蛋白不是分泌蛋白不被分泌到胞外。进一步分析显示该蛋白含有跨膜区并多个磷酸化位点,表明该蛋白可能作为膜受体起作用或为膜上的锚定蛋白,这与苧麻^[37]分析结果一致。同源进化树分析显示, CsUGD 与柿树、油橄榄等亲缘关系较近与陆地棉、可可等关系较远,推测可能与不同植物细胞壁多糖组成比例不同。

经前人研究表明植物中存在 2 条 UDP-GlcA 途径,一条是通过 UGD 利用由蔗糖合成酶或 UDP-Glc 焦磷酸化酶 (UGPase)^[38-40]产生的 UDP-Glc 从而形成 UDP-GlcA 盐进一步转化为半乳糖醛酸的 UDP-衍生物,最后转化成木糖和阿拉伯糖的衍生物,半纤维素和果胶形成的前体;另一条途径是葡萄糖-1-磷酸转化为肌醇随后氧化成葡萄糖醛酸和焦磷酸水解形成 UDP-葡萄糖醛酸盐^[41]。这 2 种途径都可能在植物中存在,其重要性取决于植物物种和组织^[13]。UGD 基因在植物不同器官组织存在明显的表达特异性。在大豆的根尖和侧根 UGD 基因表达量最高,胚轴中表达次之,而在下胚轴和叶中表达量最低^[12]。另外,龙眼 UGD 在植物不同生长发育时期,同一器官的 UGD 基因表达量有所变化,在营养生长阶段,龙眼的根和茎 UGD 基因表达量显著高于龙眼其他部位;而在生殖发育阶段,主要在花药和种子中表达量较高^[41]。在拟南芥中,UGD 基因主要在生长组织中表达,而不是在成熟组织中^[19]。在本实验中, CsUGD 基因主要在侧根和嫩叶表达量最高,且无明显差别,其次在茶籽中,这与前人研究的该基因表达模式相仿,说明 UGD 基因在快速发育组织中最活跃,并说明茶树细胞壁形成主要通过第 1 条路径,与 UGD 本质上参与细胞壁形成的观点^[39]一致。然而在杨树中,该基因主要在木质部和叶中表达,叶分生组织中的表达较低,甚至比成熟叶低,这可能意味着杨树细胞壁形成主要参与了第 2 条合成途径。另外,对茶树不同器官多糖含量进行测定分析表明,在茶树的根、芽和茶籽中有较高的多糖含量,生育期旺盛的部位多糖含量较高,说明多糖形成与茶树生长发育密切相关,这与陈玉琼等^[42]观点相一致。对茶树不同部位基因表达量和多糖含量进行相关性分析显示,表达量和多糖含量之间呈显著正相关 ($r=0.903$ 且 $P=0.014<0.05$),说明 CsUGD 基因参与茶树多糖合成,进一步印证了 CsUGD 在茶树生长中起到关键作用。

本研究克隆并分析了 CsUGD 基因在茶树不同组织器官的表达模式,推测了 CsUGD 基因在茶树细胞壁合成和茶树生长发育中起到了重要作用,且与茶树组织中多糖含量有紧密联系。后续可通过克隆 CsUGD 基因上下游基因或通过转基因技术和瞬时表达技术对该基因进一步功能验证,探明茶多糖的合成机制,以期提高茶叶的药用价值。

参考文献

- [1] 高树慧. 茶叶药用的文献研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [2] 张黎, 杨艳. 茶多糖药理活性研究进展 [J]. 中国实用医药, 2013, 8(16): 255-257.
- [3] 王莉英. 茶多糖对 NOD 小鼠 1 型糖尿病的预防作用 [D]. 上海: 复旦大学, 2004.
- [4] 王淑如, 王丁刚. 茶叶多糖的抗凝血及抗血栓作用 [J]. 中草药, 1992, 23(5): 254-256.
- [5] 沈健, 陈增良, 沈香娣, 等. 茶多糖抗肿瘤及其增强免疫作用的研究 [J]. 浙江预防医学, 2007, 19(8): 10-12.
- [6] 杨江帆, 郑德勇, 叶乃兴, 等. 乌龙茶多糖的单糖组成及结构的研究 [J]. 茶叶学报, 2007(4): 1-3.
- [7] Nie S, Xie M, Fu Z, *et al.* Study on the purification and chemical compositions of tea glycoprotein [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 71(4): 626-633.
- [8] Bradshaw H D, Ceulemans R, Davis J, *et al.* Emerging model systems in plant biology: Poplar (populus) as a model forest tree [J]. *J Plant Growth Regul*, 2000, 19(3): 306-313.
- [9] Nelsestuen G L, Kirkwood S. The mechanism of action of uridine diphosphoglucose dehydrogenase. Uridine diphosphohexodialdoses as intermediates [J]. *J Biol Chem*, 1971, 246(12): 3824-3834.
- [10] Amor Y, Haigler C H, Johnson S, *et al.* A Membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants [J]. *Pans*, 1995, 92(20): 9353.
- [11] Johansson H, Sterky F, Amini B, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1576(1/2): 53-58.
- [12] Tenhaken R, Thulke O. Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-glucose dehydrogenase [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112(3): 1127.
- [13] Seitz B, Klos C, Wurm M, *et al.* Matrix polysaccharide precursors in Arabidopsis cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns [J]. *Plant J*, 2000, 21(6): 537-546.
- [14] Pang C Y, Wang H, Pang Y, *et al.* Comparative proteomics indicates that biosynthesis of pectic precursors is important for cotton fiber and Arabidopsis root hair elongation [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(9): 2019-2033.
- [15] Sato K, Hihara E, Yamaguchi M, *et al.* Possible role of a peach homolog of UDP-glucose dehydrogenase in fruit development [J]. *Sci Hortic-Amsterdam*, 2013, 150(2): 195-200.
- [16] Marcu O, Stathakis D G, Marsh J L. Assignment of the UGDH locus encoding UDP-glucose dehydrogenase to human chromosome band 4p15. 1 by radiation hybrid mapping [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 86(3/4): 244-245.
- [17] Spicer A P, Kaback L A, Smith T J, *et al.* Molecular cloning and characterization of the human and mouse UDP-glucose dehydrogenase genes [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(39): 25117-25124.
- [18] Klinghammer M, Tenhaken R. Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in Arabidopsis, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(13): 3609-3621.
- [19] Seitz B, Klos C, Wurm M, *et al.* Matrix polysaccharide precursors in Arabidopsis cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns [J]. *Plant J*, 2000, 21(6): 537-546.
- [20] Reiter W D, Vanzin G F. *Molecular Genetics of Nucleotide Sugar Interconversion Pathways in Plants* [M]. Springer Netherlands: Plant Cell Walls, 2001.
- [21] Veneziano L M T, Ferreira B A L, Defávári D N D, *et al.* Cloning and endogenous expression of a Eucalyptus grandis UDP-glucose dehydrogenase cDNA [J]. *Genet Mol Biol*, 2010, 33(4): 686-695.
- [22] Kärkönen A, Murigneux A, Martinant J P, *et al.* UDP-glucose dehydrogenases of maize: A role in cell wall pentose biosynthesis [J]. *Biochemical J*, 2005, 391(2): 409-415.
- [23] 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.
- [24] 贺顺姬. 盐藻多糖合成关键酶—尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶(DsUGD)基因分析及耐盐相关性研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [25] 李江, 沈继红, 何培青, 等. 环境因子对南极菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 多糖合成关键酶 UGD 基因表达的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 824-828.
- [26] 王在贵, 刘朝良, 杨世高, 等. 茶多糖的提取与初步纯化 [J]. 中国饲料, 2008(10): 38-40.
- [27] 俞滢, 陈丹, 孙君, 等. 茉莉花萼类合成酶基因 JsTPS 的克隆及其表达分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 356-364.
- [28] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 植物学报, 2010, 45(5): 579-587.

- [29] Franzen B, Carrubba C, Feingold D S, *et al.* Amino acid sequence of the tryptic peptide containing the catalytic-site thiol of bovine UDP-glucose dehydrogenase [J]. *Biochemical J*, 1982, 199(3): 599-602.
- [30] 周振华, 王洪新, 赵素玲, 等. 黄芪多糖对脂多糖诱导大鼠心肌细胞肥大的保护作用 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 524-528.
- [31] 张皖东, 吕 诚, 刘振丽, 等. 人参多糖和猪苓多糖对大鼠肠道黏膜淋巴细胞功能的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 221-224.
- [32] 金春花, 姜秀莲. 灵芝多糖活血化瘀作用实验研究 [J]. 中草药, 1998, 29(7): 470-472.
- [33] Seifert G J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: How to bring the inside to the outside [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(3): 277-284.
- [34] Hempel J, Perozich J, Romovacek H, *et al.* UDP-glucose dehydrogenase from bovine liver: Primary structure and relationship to other dehydrogenases [J]. *Protein Sci*, 1994, 3(7): 1074-1080.
- [35] Spicer A P, Kaback L A, Smith T J, *et al.* Molecular cloning and characterization of the human and mouse UDP-glucose dehydrogenase genes [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(39): 25117.
- [36] 张成武, 吴 洁. 蓝藻细胞外多糖的研究概况 [J]. 中国海洋药物, 1997(3): 20-25.
- [37] 刘 峰, 黄 好, 郭清泉, 等. 苧麻 UDPGDH 基因的 cDNA 克隆及表达分析 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3542-3548.
- [38] Dey P M, Harborne J B. *Methods in Plant Biochemistry* [M]. Amsterdam: ELSEVIER, 1989.
- [39] Kleczkowski L A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1507-1515.
- [40] Loewus A F. *Plant Carbohydrates* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1982.
- [41] 徐小萍, 赖瑞联, 林玉玲, 等. 龙眼 UGD6 基因克隆及其表达特性分析 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(4): 636-645.
- [42] 陈玉琼, 余 志, 张 芸, 等. 茶树品种、部位和嫩度对茶多糖含量和活性的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 406-409.