

岗梅磺酸基转移酶基因的克隆与体外表达

林 青, 负小芸, 官慧儿, 纪晓宇, 徐 晖*

广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心 岭南中药资源教育部重点实验室 (广州中医药大学) 国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006

摘 要: 目的 药用植物岗梅 *Ilex asprella* 含有多种活性磺化三萜类成分, 克隆岗梅中的磺酸基转移酶编码 (sulfotransferase, ST) 基因, 以了解其独特的磺化机制。方法 利用 RT-PCR 技术, 由岗梅叶片 RNA 扩增获得了 2 个可能的磺酸基转移酶基因 IaST1 和 IaST2, 利用生物信息学工具对其进行分析, 并将其转化至大肠杆菌 *E. coli* 进行原核表达。结果 序列分析显示, IaST1 与 IaST2 各包含 1 个开放阅读框, 分别长 1 002 bp 和 993 bp, 编码 333 和 330 个氨基酸, 理论相对分子质量为 55 500 和 54 700。二者均具有 ST 的 5 个保守结构氨基酸序列, 与黄顶菊 *Flaveria bidentis* 的黄酮醇 C-3 磺酸基转移酶亲缘关系较近。SDS-PAGE 显示在 *E. coli* 中成功表达了 IaST1 和 IaST2 蛋白。结论 首次从岗梅中克隆了 ST 基因, 为后续阐明其功能及其在岗梅三萜磺化中的作用奠定了基础。

关键词: 岗梅; 磺酸基转移酶基因; 序列分析; 基因克隆; 体外表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2683-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.027

Cloning and *in vitro* expression of sulfotransferase genes from *Ilex asprella*

LIN Qing, YUN Xiao-yun, GUAN Huier, JI Xiao-yu, XU Hui

Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicines, Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective The medicinal plant *Ilex asprella* contains various biologically active sulfonated triterpenoids and triterpenoid saponins. The objective of this study was to clone sulfotransferases (ST) from *I. asprella* and facilitate the elucidation of the sulfonation mechanism therein. **Methods** The physicochemical properties, secondary structure and tertiary structure of two ST candidates of IaST1 and IaST2 were forecasted and analyzed using related software. IaST1 and IaST2 were cloned by RT-PCR and expressed in *Escherichia coli*. **Results** The open reading frame (ORF) of IaST1 was 1 002 bp long and encoded a protein of 333 amino acids with the calculated molecular weight of 55 500, while the ORF of IaST2 was 993 bp long and encoded a protein of 330 amino acids with the calculated molecular weight of 54 700. Both contain the five highly conserved domains of ST. Phylogenetic analysis revealed that IaST1 and IaST2 were genetically closely related and clustered together with flavonol C-3 ST of *Flaveria bidentis*. **Conclusion** This is the first report on the cloning of STs from *I. asprella*, providing an important basis for further investigations into their functions and roles in the biosynthesis of sulfonated triterpenoids in *I. asprella*.

Key words: *Ilex asprella* (Hook. et Arn.) Champ. ex Benth.; sulfotransferase; sequence analysis; gene cloning; *in vitro* expression

冬青科冬青属植物岗梅 *Ilex asprella* (Hook. et Arn.) Champ. ex Benth. 是岭南地区习用中药材岗梅的来源植物, 其干燥根有清热解毒、生津止渴、

利咽消肿、散瘀止痛的功效^[1]。杜冰墨等^[2]从岗梅中分离出了 10 种带有磺酸基的皂苷。文思等^[3]在岗梅根中发现 1 种新的三萜皂苷, 该皂苷的糖基上也

收稿日期: 2018-11-19

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2015A030313347)

作者简介: 林 青 (1996—), 男, 广东潮州人, 在读本科生, 研究方向为岗梅磺酸基转移酶基因的功能研究。

Tel: 13724079786 E-mail: 13724079786@163.com

*通信作者 徐 晖, 女, 浙江苍南人, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药效活性成分的生物合成研究。

Tel: (020)39358331 E-mail: zyfxsherry@gzucm.edu.cn

存在磺酸基。对 3 个岗梅磺化三萜皂苷 asprellcoside A、asprellanoside A、oblonganoside H 的药理实验研究发现它们具有较强的抵抗流感病毒引发的炎症反应作用,显著抑制血小板的聚集、抗 HSV-1 活性等药理作用^[4-5]。陈川等^[6]研究发现,磺酸具有静电排斥力,对于带负电性的血液组分具有静电排斥作用,使纤维蛋白原和血小板吸附量及变形程度减小,血栓形成减少。因此,研究岗梅皂苷的磺化机制对开发其药用价值具有重要意义。

磺酸基转移酶(sulfotransferase, ST)催化磺酸基团从 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸酯(3'-adenosine phosphate-5'-phosphate sulfate, PAPS)转移到特定底物^[7],如糖、蛋白质和各类小分子,实现底物的磺酸化,是生物体磺化反应的关键酶,具有重要的生物学意义。相对于动物和人类,植物类 ST 编码基因的功能研究相对较少。目前已鉴定的植物 ST 绝大多数是黄酮类的磺酸基转移酶,如最早报道从菊科植物 *Flaveria chloraefolia* A. Gray 中分离纯化得到的 3 个催化黄酮醇不同位点磺化的 STs^[8];来自模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 的催化黄酮苷磺化的 AtSULT202B7^[9]。与黄酮类似,岗梅三萜等许多具有药用价值的植物萜类成分结构中也含有 1 个或多个磺酸基^[10-11],其磺化是否也是由类似的萜类 ST 来完成,尚未见研究报道。

本课题组前期对岗梅根转录组数据(Accession 编号: NPRJNA236423)的注释结果显示,有 31 个转录本注释为 ST 基因,本实验报道了其中 2 条可能的 ST 基因(分别命名为 IaST1、IaST2)的克隆与蛋白原核表达,为后续的功能研究奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

岗梅为 2 年生的盆栽植株,源自广东省梅州市平远县南岭药业种植基地,经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员鉴定为冬青科冬青属植物岗梅 *Ilex asprella* (Hook. et Arn.) Champ. ex Benth. 菌种为 *E. coli* Trans1-T1、*E. coli* Transetta (DE3),购自 TransGen 公司(北京)。

1.2 试剂

植物 RNA 小量提取试剂盒、凝胶 DNA 小量回收试剂盒、质粒小量快速抽提试剂盒购于广州美基

生物科技有限公司; TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix For PCR 反转录试剂盒、pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 零背景快速克隆试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; Trelief SoSoo Cloning Kit 试剂盒购于广州擎科生物技术有限公司; In-FusionTM HD Cloning Kits 试剂盒、Prime STAR MAX 高保真酶购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; 2×High-Fidelity Master Mix 高保真聚合酶购于 Toyobo 公司; Ni-NTA Superflow Columns 购于 Qiagen 公司。

2 方法

2.1 IaST1 和 IaST2 序列的生物信息学分析

通过对岗梅转录组数据的分析,筛选出 2 条具有完整开放阅读框(ORF)的 ST 基因,即 IaST1 和 IaST2。采用 neighbor-joining (NJ) 法对 2 个基因的编码蛋白与其他植物 ST 蛋白构建系统进化树,进行同源性分析,重复次数为 10 000 次;用 SMART 在线软件分析蛋白结构域;用 TMHMM Server v.2.0 预测跨膜结构域;利用在线分析软件 ExPASy-ProtParamtool、NPS@SOPMA secondary structure prediction、SWISS-MODEL 对氨基酸序列进行理化分析和结构模拟。

2.2 引物设计

利用 PrimerPrimer 5.0 软件设计特异性 PCR 扩增引物 IaST1-F/R 与 IaST2-F/R(表 1)。根据 Clontech 公司 In-FusionTM 克隆引物设计说明,设计构建表达质粒用引物 eIaST1-F、eIaST1-R、eIaST2-F、eIaST2-R(表 1)。引物序列由天一辉远生物科技有限公司合成。

2.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取岗梅新鲜嫩叶,用植物 RNA 小量提取试剂盒提取总 RNA,用微量分光光度计测定其纯度和浓度,并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,然后用反转录试剂盒根据说明书将 RNA 反转录成 cDNA。

2.4 IaST1 和 IaST2 基因克隆与质粒构建

以 cDNA 为模板,分别以 IaST1-F/R 或 IaST2-F/R 为引物,用高保真聚合酶进行 PCR,获得 IaST1、IaST2 的完整 ORF。PCR 的反应条件为 94 °C 保持 2 min; 94 °C 变性 30 s、50~60 °C 退火 30 s、68 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;68 °C 保持 10 min,4 °C 保存。回收 PCR 产物,与 pEASY-Blunt 零克隆载体进行连接,转化至 *E. coli*

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')
IaST1-F	ATGGCAGACAATTCCCCAAT
IaST1-R	TCAAGCCAAATCCTTGAAC
IaST2-F	ATGGCGAACCTTTTGCTTC
IaST2-R	TCAGACCAAATCCTTCAGCTT
eIaST1-F	<u>CGACAAGGCCATGGCTGATATCATGGCAGACAATTCCCCAAT</u>
eIaST1-R	<u>GGTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGAGCCAAATCCTTGAAC</u>
eIaST2-F	<u>CGACAAGGCCATGGCTGATATCATGGCGAACCTTTTGCTTC</u>
eIaST2-R	<u>GGTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGGACCAAATCCTTCAGCTT</u>

表引物序列波浪线部分为酶切位点，双下划线部分为载体同源臂，单下划线部分为基因同源臂

The wavy part of the primer sequence is the restriction site, the double underline part is the carrier homology arm, and the single underline part is the gene homology arm

Trans1-T1, 用氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆, 测序。将序列正确的克隆扩大培养, 提取质粒, 分别命名为 pEASY-IaST1 和 pEASY-IaST2。

以上述 pEASY-IaST1 质粒为模板, 以 eIaST1-F 和 eIaST1-R (表 1) 为引物, 用高保真酶进行 PCR 扩增, PCR 的反应条件为: 98 °C 保持 2 min, 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s, 35 个循环, 72 °C 保持 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物纯化后, 用限制性内切酶 *EcoR* V、*Xho* I 对载体 pET-32a (+) 与 PCR 纯化产物进行双酶切处理, 将酶切产物分别切胶回收, 将 IaST1 连接到 pET-32a (+) 载体上, 转化 *E. coli* Trans1-T1, 经抗性筛选获得阳性克隆, 测序。同法操作, 以 pEASY-IaST2 质粒为模板, eIaST2-F 和 eIaST2-R 为引物, 扩展获得 IaST2 基因片段, 通过 In-Fusion™ 克隆将 IaST2 连接到线性化的 pET-32a (+) 载体上, 转化 *E. coli* 筛选阳性克隆, 测序。将序列正确的阳性克隆扩大培养, 提取得到质粒 pET-32a-IaST1、pET-32a-IaST2, 在 2 个基因的 3'-端均插入了编码 6×His 的核苷酸序列。

2.5 IaST1 和 IaST2 的诱导表达与纯化

将 pET-32a-IaST1、pET-32a-IaST2 分别转化 *E. coli* Transetta (DE3), 挑取阳性克隆置 LB 培养基中, 于 37 °C、225 r/min 震荡培养至 A_{600} 值为 0.6~0.8, 加入 0.1 mmol/L IPTG, 于 16 °C、225 r/min 继续培养 12~16 h。收集菌体, 加入适量 PBS 缓冲液 (含咪唑 10 mmol/L) 重悬, 加入 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 超声破碎 (功率 240 W, 频率 20 Hz)。破碎后的菌液于 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min, 分取上清液, 加至已平衡好的 Ni-NTA

Superflow Columns 预制柱上, 先用含 50 mmol/L 咪唑的 PBS 洗涤, 再用含 300 mmol/L 咪唑的 PBS 梯度洗脱收集目标蛋白。用 SDS-PAGE 分析目标蛋白。

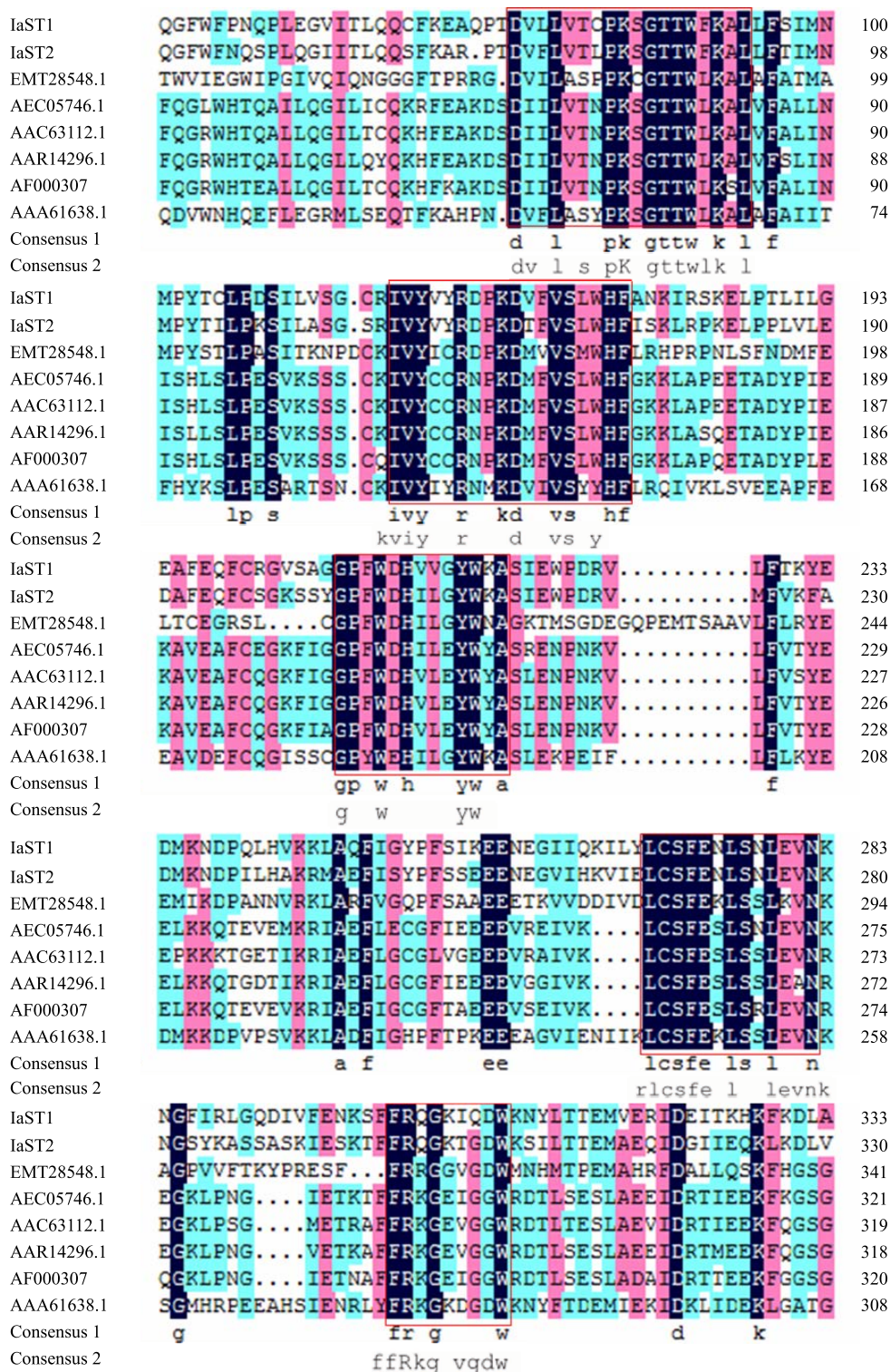
3 结果与分析

3.1 IaST1 和 IaST2 基因的序列分析

IaST1 基因全长 1 232 bp, OFR 为 1 002 bp, 编码 333 个氨基酸; IaST2 基因全长 1 246 bp, OFR 为 993 bp, 编码 330 个氨基酸。二者氨基酸序列的相似性为 59.41%, 使用 DNAMAN 软件与其他种属的 ST 氨基酸序列进行同源性对比, 发现 IaST1 和 IaST2 相应的 5 个保守氨基酸序列片段^[12] (图 1), 其中第 1 个 (从 DXXLXXPKSGTTW) 与第 2 个 (IVYXXRKDXXVSXXHF) 提示, 可能是 PAPS 的结合位点^[13]。SMART 在线软件分析得出, IaST1、IaST2 序列都含有 ST 结构域 (sulfotransfer-1 domain), 无信号肽区域和跨膜螺旋区; 另用 TMHMM Server v.2.0 预测跨膜结构域, 显示 2 个蛋白无跨膜结构域。

3.2 IaST1 和 IaST2 的系统进化分析

将 IaST1 和 IaST2 编码的氨基酸序列与 16 条来源于不同植物的已知磺酸基转移酶构建 NJ 系统进化树 (图 2), 结果发现 IaST1 与 IaST2 的同源性最高, 独立成一支, 其次与黄顶菊 *Flaveria bidentis* Kuntze 的黄酮醇 C-3 磺酸基转移酶 (F3-ST) 亲缘关系较近。据报道, F3-ST 是催化黄酮醇聚硫化物合成的第一步^[14], 同时该基因在芽尖和第一对扩张叶片高表达, 而在成熟叶子中低表达^[15], 可被 2,4-二氯苯氧乙酸诱导正向调节^[16]。因此, 推测 IaST1 和 IaST2 在岗梅中可能具有类似的功能。



EMT28548.1 来源于节节麦, AEC05746.1 来源于拟南芥, AAC63112.1、AAR14296.1、AF000307 来源于欧洲油菜, AAA61638.1 来源于黄顶菊; Consensus 1 为 9 个氨基酸序列比对结果, Consensus 2 为 116 个植物和 11 个人类磺酰基转移酶氨基酸序列比对结果 (仅列出 IaST1、IaST2 氨基酸保守序列所对应的序列比对结果)

Species: EMT28548.1 from *Aegilops tauschii*, AEC05746.1 from *Arabidopsis thaliana*, AAC63112.1, AAR14296.1, AF000307 from *Brassica napus*, and AAA61638.1 from *Flaveria bidentis*. Consensus 1 is derived from the alignment of 9 plant sequences, Consensus 2 is derived from the alignment of 116 plant and 11 human SULT sequences^[12] (Showing the amino acid conserved sequences of IaST1 and IaST2)

图 1 岗梅 IaST1 和 IaST2 的保守氨基酸序列

Fig. 1 Conserved amino acid residues of ST found in IaST1 and IaST2

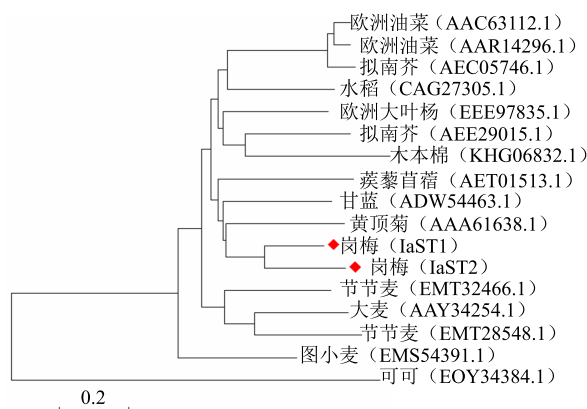


图 2 IaST1 和 IaST2 与其他植物 ST 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of IaST1, IaST2, and other known plant STs

3.3 IaST1 和 IaST2 的蛋白结构预测

利用在线分析软件 ExPASy-ProtParam tool 对 2 条氨基酸序列进行理化分析。IaST1 和 IaST2 编码蛋白的分子质量分别为 38 890 和 38 100，等电点 5.83 和 6.54，亲脂系数为 81.05 和 78.00，总平均亲水性 (GRAVY) -0.397 和 -0.424，都属于亲水性蛋白。

利用在线分析软件 NPS@-SOPMA secondary structure prediction 对 2 条氨基酸序列进行分析，发现 IaST1 和 IaST2 编码蛋白的 α 螺旋结构分别占整体的 33.03% 和 37.27%、 β 转角结构占 10.51% 和 9.39%、延伸链占 21.62% 和 17.88%，无规折叠占 34.83% 和 35.45%。

采用 SWISS-MODEL 对 IaST1、IaST2 蛋白进行三维结构预测 (图 3)，发现 IaST1 的氨基酸序列与来自拟南芥模板 5mek.1.A (cytosolic sulfotransferase18) 的氨基酸序列最为相似，相似度为 47.56%；IaST2 的氨基酸序列与来自拟南芥模板 2q3m.1.A (flavonol sulfotransferase-like) 的氨基酸

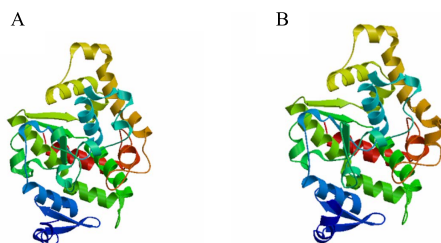


图 3 IaST1 (A) 和 IaST2 (B) 蛋白结构预测

Fig. 3 Protein structure prediction of IaST1 (A) and IaST2 (B)

序列最为相近，相似度为 47.99%。

3.4 目的基因 IaST1 和 IaST2 的克隆

以岗梅叶片反转录获得的 cDNA 为模板，分别用 IaST1-F/R 与 IaST2-F/R 引物扩增获得 2 条目的片段，其大小与预期的一致 (图 4)。将目的片段与克隆载体 pEASY-Blunt 连接后，转化 *E. coli* Trans1-T1，筛选阳性克隆。菌落 PCR 的凝胶电泳结果显示获得了预期大小的条带 (1 200 bp)。DNA 测序表明所得序列与转录组序列一致，说明获得了目的基因 IaST1 和 IaST2。

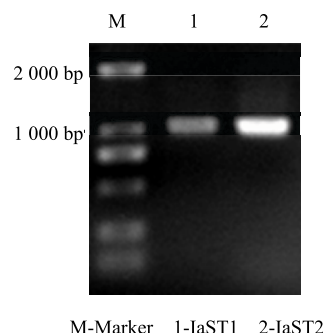


图 4 IaST1 和 IaST2 编码基因 PCR 产物电泳图

Fig. 4 Obtained PCR products of IaST1 and IaST2 analyzed by gel electrophoresis

进一步将 IaST1 和 IaST2 分别连接到表达载体 pET-32a (+)，转化 *E. coli* Transetta (DE3)，筛选阳性克隆，菌落 PCR 和 DNA 测序均显示成功构建了表达质粒 pET-32a-IaST1 和 pET-32a-IaST2。

3.5 IaST1 和 IaST2 的表达与纯化

由跨膜结构预测，可知 IaST1 和 IaST2 不具有跨膜结构，故用超声破碎 *E. coli* 提取蛋白，Ni-NTA 亲和树脂纯化蛋白。由 SDS-PAGE (图 5) 可知，IaST1

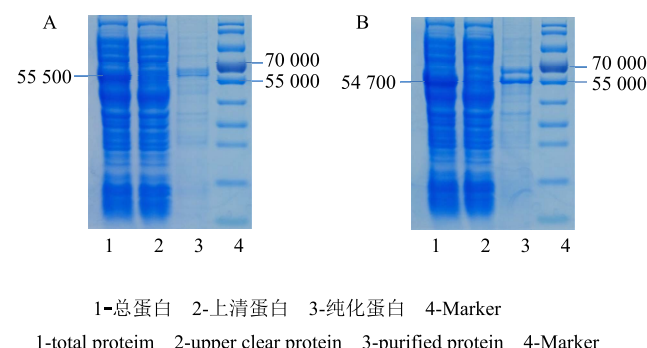


图 5 IaST1 (A) 和 IaST2 (B) 纯化蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE of purified protein of IaST1 (A) and IaST2 (B)

和 IaST2 在 *E. coli* 中成功表达, 纯化效果较好, 在 55 000 大小位置出现了与预期理论大小 (55 500 和 54 700) 相应的条带。IaST1 和 IaST2 总蛋白泳道对应的目的条带比上清蛋白泳道对应的目的条带颜色较深, 表明蛋白主要形成了包涵体。经亲和柱纯化后的蛋白, 在目的条带上方还出现了一条较浅的条带, 推测可能与蛋白质存在不同折叠有关。

4 讨论

ST 的研究可追溯到 1989 年第 1 个磺酸基转移酶 cDNA 的克隆报道, 之后对植物类 ST 酶的研究主要集中在其克隆表达与酶活实验的研究。目前国内对植物类磺酸基转移酶的相关研究较少, 进度也缓慢; 国外对磺酸基转移酶在蛋白质结构与其生物化学反应机制等研究目前已多有报道^[17]。

ST 是一个超级基因家族, 数量大且多样, 可分为胞溶和膜偶联磺酸基转移酶 2 大类^[12], 胞溶磺酸基转移酶又分为黄酮类、油菜素类固醇类、胆碱类和胞质磺酸基转移酶等。根据转录组基因注释以及生物信息学的分析, 本研究的 IaST1 与 IaST2 分别为胞质 ST 和黄酮类磺酸基转移酶。由磺酸基转移酶催化的磺化反应广泛存在于植物体内, 调节植物的生长、发育以及对环境的适应反应等^[18-19], 具有解毒^[20]、抗病、抗逆性等作用^[21]。另一方面, 磺化修饰对于许多药用植物药效成分的活性至关重要, 如磺化岗梅三萜、乌头磺化二萜生物碱 A (conicarmisulfonine A) 等^[22]。除黄酮外, 萜类等重要植物次生代谢物相关 ST 知之甚少, 也值得深入研究。

岗梅是岭南地区的常用药材之一, 主治病种多, 是多种中成药和常用凉茶的原料药材, 年耗量日益增加, 其主要有效成分为三萜及皂苷, 包括部分磺酸基化的三萜及皂苷。近年来本课题组对岗梅三萜及皂苷生物合成通路的相关基因进行挖掘^[23-24], 并在分子水平上调控其生物合成的关键基因, 增加表达, 为岗梅三萜及皂苷的工业化生产奠定一定的基础。目前发现岗梅中约 1/5 的三萜类化合物带有磺酸基, 已有 3 个磺化三萜经研究表明具有抗流感病毒等药理作用, 所以对这些磺化三萜的磺化机制研究也值得关注。然而, 目前岗梅三萜类生物合成途径仅研究至糖基化部分, 磺酸基化的步骤暂无进展。岗梅转录组中 31 个转录本被注释为 ST, 但各自的功能并不明确。本实验得到 2 个磺酸基转移酶基因, 并通过原核表达, 获得了预期大小的蛋白。后续可通过

体内外实验验证它们是否参与岗梅三萜结构的磺化修饰, 进一步充实人们对不同植物 ST 的认识, 补充 ST 家族的基因来源, 为比较不同来源 ST 间的相互差异与关联, 解析差异基因的功能特点提供线索。

参考文献

- [1] 陈彩英, 黄永秋, 贺小英, 等. 南药岗梅本草溯源 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(9): 117-121.
- [2] 杜冰翌, 杨鑫瑶, 冯 晓, 等. 岗梅的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 20-28.
- [3] 文 思, 管希锋, 黄晓君, 等. 岗梅根中 1 个新的齐墩果烷型三萜皂苷 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2503-2509.
- [4] Peng M H, Dai W P, Liu S J, *et al.* Bioactive glycosides from the roots of *Ilex asprella* [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(10): 2127-2134.
- [5] Zhou M, Xu M, Ma X X, *et al.* Antiviral triterpenoid saponins from the roots of *Ilex asprella* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(15): 1702-1705.
- [6] 陈 川, 黄明富, 颜善银, 等. 类肝素化聚合物的研究进展 [J]. 化工新型材料, 2011, 39(4): 18-21.
- [7] Coughtrie M W H. Sulfation through the looking glass--recent advances in sulfotransferase research for the curious [J]. *Pharm J*, 2002, 2(5): 297-308.
- [8] Varin L, Ibrahim R K. Partial purification and characterization of Three flavonol-specific sulfotransferases from *Flaveria chloraefolia* [J]. *Plant Physiol*, 1989, 90(3): 977-981.
- [9] Hashiguchi T, Sakakibara Y, Shimohira T, *et al.* Identification of a novel flavonoid glycoside sulfotransferase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Bioch*, 2014, 155(2): 91-97.
- [10] Shi Y S, Zhang Y, Hu W Z, *et al.* Anti-inflammatory triterpene glycosides from the roots of *Ilex dunniana* Levl [J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1206.
- [11] Sanchez-contreras S, Diaz-lanza A M, Matellano L F, *et al.* A sulfated saponin from *Bupleurum rigidum* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(11): 1383-1385.
- [12] Hernández-sebastià C, Varin L, Marsolais F. *Sulfotransferases from Plants, Algae and Phototrophic Bacteria* [M]. Netherlands: Springer, 2008.
- [13] Kakuta Y, Pedersen L G, Pedersen L C, *et al.* Conserved structural motifs in the sulfotransferase family [J]. *Trends Bioch Sci*, 1998, 23(4): 129-130.
- [14] Barron D, Ibrahim R K. Synthesis of flavonoid sulfates. II. The use of aryl sulfatase in the synthesis of flavonol-3-sulfates [J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*,

- 1988, 43(9): 625-630.
- [15] Hannoufa A, Varin L, Ibrahim R K. Spatial distribution of flavonoid conjugates in relation to glucosyltransferase and sulfotransferase activities in *Flaveria bidentis* [J]. *Plant Physiol*, 1991, 97(1): 259-263.
- [16] Ananvoranich S, Varin L, Gulick P, *et al.* Cloning and regulation of flavonol 3-sulfotransferase in cell-suspension cultures of *Flaveria bidentis* [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106(2): 485-491.
- [17] Hirschmann F, Krause F, Baruch P, *et al.* Structural and biochemical studies of sulphotransferase 18 from *Arabidopsis thaliana* explain its substrate specificity and reaction mechanism [J]. *Sci Reports*, 2017, 7(1): 4160.
- [18] Varin L, Marsolais F, Richard M, *et al.* Biochemistry and molecular biology of plant sulphotransferases [J]. *FASEB J*, 1997, 11(7): 517-525.
- [19] Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, *et al.* *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(23): 13560-13565.
- [20] 董龙, 罗聪, 何新华, 等. 芒果类黄酮磺基转移酶基因克隆及表达分析 [J]. 热带作物学报, 2014, 35(4): 95-100.
- [21] 燕瀚翔. 大豆 GmFLC 基因的克隆与功能验证 [D]. 北京: 中央民族大学, 2012.
- [22] Guo Q, Xia H, Shi G, *et al.* Aconicarmisulfonine A, a Sulfonated C20-diterpenoid alkaloid from the lateral roots of *Aconitum carmichaelii* [J]. *Organ Lett*, 2018, 20(3): 816-819.
- [23] 郑夏生. 岗梅转录组及三萜皂苷生物合成相关酶基因的挖掘 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [24] 郑夏生, 罗秀秀, 徐晖, 等. 岗梅转录组及其乌索烷型三萜皂苷生物合成相关酶基因的发掘 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(7): 1505-1512.