

金线莲 *UGPase* 基因克隆与表达及在多糖合成中的作用

嵇元烨¹, 吴梅², 吴秋丽¹, 江晴儿¹, 谢晓鸿^{1*}, 孔向军^{2*}, 王忠华^{1*}

1. 浙江万里学院生物技术研究所, 浙江 宁波 315100

2. 金华市匠康金草生态农业科技科技有限公司, 浙江 金华 321007

摘要: 目的 克隆出金线莲 *Anoectochilus roxburghii* 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-Glucose pyrophosphorylase, *UGPase*) 基因全长, 并对其表达量及酶活性与多糖积累量之间的相关性进行分析, 以研究 *UGPase* 基因在金线莲多糖合成代谢途径中的调控作用。方法 利用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 技术和 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术克隆金线莲中 *UGPase* 基因序列; 以金线莲尖叶、无纹等 7 个品种组培期及种植期茎段部位为材料, 采用 qRT-PCR、ELISA 试剂盒法及苯酚-硫酸法分别测定 *UGPase* 基因表达量、酶活和多糖含量, 并对其进行相关性分析。结果 克隆得到的序列全长 1786 bp。开放阅读框为 1425 bp, 编码 475 个氨基酸。7 个不同品种金线莲中 *UGPase* 基因表达量、酶活与多糖含量具有极显著正相关 (相关系数分别为 0.823、0.785)。结论 成功克隆出金线莲 *UGPase* 全长基因, 初步证明 *UGPase* 基因是参与金线莲多糖合成代谢的关键基因之一。

关键词: 金线莲; *UGPase* 基因; 克隆; 荧光表达; 酶活; 相关性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3671-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.025

Cloning and expression of *UGPase* gene and its role in polysaccharide synthesis of *Anoectochilus roxburghii*

Ji Yuan-ye¹, Wu Mei², Wu Qiu-li¹, Jiang Qing-er¹, Xie Xiao-hong¹, Kong Xiang-jun², Wang Zhong-hua¹

1. Institute of Biotechnology, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

2. Jinhua Jinglong Biotechnology Co., Ltd, Jinhua 321007, China

Abstract: Objective UDP-Glucose pyrophosphorylase (*UGPase*) gene of *Anoectochilus roxburghii* was cloned and the correlation between the expression content of gene and enzyme activity and polysaccharide accumulation was analyzed to explore the role of *UGPase* gene in the regulation of polysaccharide synthesis and metabolism. **Methods** In this study, the stem segments of *A. roxburghii* were used to clone the full-length sequence of *UGPase* gene via RT-PCR and RACE technology. RT-qPCR, ELISA technology and phenol-sulfuric acid process were used to determine the expression of *UGPase* and enzyme activity in seven different varieties of *A. roxburghii* and the content of polysaccharide. Finally, the correlation was analyzed. **Result** The cloned sequence is 1786bp in length, the ORF is 1425bp, encodes 475 amino acids. The results of correlation analysis showed that the expression level of *UGPase* gene and enzyme activity had significant positive correlation with the content of polysaccharide in seven different varieties of *A. roxburghii* (the correlation coefficients were 0.823 and 0.785, respectively). **Conclusion** The Full-length sequence of *UGPase* gene was successfully cloned in this study. Preliminary proof that *UGPase* gene is the one of the key genes involved in the anabolic polysaccharide metabolism.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; *UGPase* gene; cloning; gene expression; enzyme activity; correlation

收稿日期: 2020-10-20

基金项目: 浙江省科技厅中药材育种专项 (2016C02058); 浙江省重点研发项目 (2017C02019); 浙江金线莲质量分析评价与特色功能产品开发项目 (20202002a) 和浙江万里学院省一流学科开放基金项目 (KF2018001) 共同资助

作者简介: 嵇元烨 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为金线莲分子生物学。E-mail: 674549432@qq.com

*通信作者: 谢晓鸿 (1965—), 男, 高级农艺师, 研究方向为园林园艺植物推广应用。E-mail: zwuxh@zwwu.edu.cn

孔向军 (1978—), 男, 高级农艺师, 从事中药材等作物配套栽培技术研究和产业开发研究。E-mail: junekx@163.com

王忠华 (1972—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药用植物生理生化与分子生物学。E-mail: wang1972@zwwu.edu.cn

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 是兰科开唇兰属植物, 是名贵的中草药, 其全草入药, 具有清热凉血、除湿解毒的功效, 可治疗肺结核咯血、糖尿病、肾炎、膀胱炎、重症肌无力、遗精、风湿性及类风湿性关节炎、小儿惊风、妇女白带以及毒蛇咬伤等症^[1]。研究表明, 多糖是金线莲主要的药用活性成分之一, 金线莲多糖具有降血糖^[2]、抗氧化^[3]、抗肿瘤^[4]、保肝^[5]、免疫调节^[6]等生物活性。

在植物糖代谢途径中, *UGPase* 基因主要催化尿苷三磷酸和葡萄糖-1-磷酸, 形成尿苷二磷酸葡萄糖和 PPi ($\text{Glucose 1-phosphate} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{PPi} + \text{UDPG}$), 这是一个依赖 Mg^{2+} 的可逆反应, 其反应产物 UDPG 可以参与植物中蔗糖合成, 纤维素合成以及淀粉合成等, 并为植物细胞壁合成提供前体物质^[7], 同时 *UGPase* 是合成植物多糖的关键酶^[8]。目前, 已从马铃薯 *Solanum tuberosum* L.^[9]、大麦 *Hordeum vulgare* L.^[10]、小果野蕉 *Musa acuminata* Colla^[11]、水稻 *Oryza sativa* L.^[12]、香瓜 *Cucumis melo* L.^[13]、棉花 *Gossypium hirsutum* L.^[14]、小麦 *Triticum aestivum* L.^[15]等植物中分离出 *UGPase* 基因。目前国内外关于金线莲多糖合成途径中的关键基因的报道较少, 而 *UGPase* 基因在金线莲多糖合成代谢途径中的调控作用尚未明确。本研究采用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 技术和 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术, 首次从金线莲中克隆出 *UGPase* 基因全长, 并用生物信息学手段对该序列进行分析验证。同时分析了其在 7 个金线莲品种中组培期与种植期茎段中的表达

量、酶活与多糖含量的相关性。为深入研究 *UGPase* 基因在金线莲多糖合成途径中的分子调控作用和通过基因工程手段特异性调控关键酶基因从而促进代谢产物大量合成积累提供基础。

1 材料与仪器

1.1 材料收集与处理

本研究以由 2019 年下半年同批的 7 个不同品种金线莲 (尖叶、小叶、圆叶、健君、无纹、匠康 1 号、匠康 2 号) 的组培苗以及种植苗的茎段为材料, 具体差异见图 1。其中组培苗产自 2019 年 11 月, 组培时间 3 个月; 种植苗产自 2020 年 5 月, 经炼苗后种植时间 6 个月, 材料收集自金华市农业科学研究院, 经浙江万里学院生物与环境学院王忠华教授鉴定为兰科开唇兰属植物金线莲 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl. 的茎段部位。新鲜材料经过清水冲洗后, 用酒精擦拭及 DEPC 处理水洗涤后, 放入液氮中速冻, 然后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2 仪器

MastercyclerproS 梯度 PCR 仪、5430R 低温高速离心机、微量移液器 (Eppendorf 公司); GelDocXR+凝胶成像仪、CFX96 实时荧光定量 PCR (Bio-RAD 公司); NanoDropTM2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific 公司); 蒸汽高压灭菌锅 (SANYO 公司); 超低温冰箱 (New Brunswick); 电子分析天平 (Mettler Toledo 公司); 电泳仪 (北京六一生物科技公司); 紫外分光光度计 (上海天能科技有限公司); 恒温金属浴 (上海生工有限公司); 冷冻恒温摇床 (上海智城有限公司); 智能生化培养箱 (宁波江南仪器厂)。



图 1 不同品种金线莲样品差异

Fig. 1 Samples differences in different varieties of *Anoectochilus roxburghii*

2 方法

2.1 总 RNA 提取、cDNA 第 1 链的合成及 RACE cDNA 的合成

以尖叶金线莲组培苗茎段为材料,按北京金线莲茎段的总 RNA。采用 NanoDrop™ 2000 分光光度计(Thermo Fisher, 美国)测定总 RNA 的质量和纯度,1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。使用北京全式金公司的 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 第 1 链合成试剂盒反转录合成 cDNA 第 1 链。使用 TaKaRa SMARTer® RACE 5'/3' Kit 试剂盒合成 5' 及 3'RACE cDNA, -20 °C 保存。

2.2 简并引物设计与合成、PCR 扩增 UGPase 基因序列及信息生物学分析

根据 GenBank 中已注册的植物 UGPase 基因部分或全长序列(基因编号 JX294909.1、XM_020741275.1、FJ536261.1、XM_021452444.1 等),采用 MEGA7.0 软件的多序比对功能检索不同植物 UGPase 基因序列中重合度较高的部分,设计出简并引物:UGPase-F: 5'-GAGTGGAGYAA-GATYCAGAC-3', UGPase-R: 5'-AACCAKACA-TCACCAGARACCTTCA-3'。目的产物约 1170 bp。引物由北京擎科新业生物技术有限公司杭州合成部合成。

以“2.1”项获得的 cDNA 为模板,UGPase-F、UGPase-R 为上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为:50 μL 反应体系,含 2×Flash Hot Start MasterMix 25 μL、上下游引物各 2 μL、cDNA 模板 2 μL、ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 51.7 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 2 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,切下目的片段,经北京全式金公司的 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化后与 PMD 18-T 载体进行连接,将重组载体转入到 DH5α 大肠杆菌感受态细胞中。过夜培养后筛选 8 个阳性菌落进行测序分析,将测序结果进行 BLAST 比对分析,验证测序结果的正确性。

根据上述测序得到的 UGPase 基因保守区序列,利用 Primer5 设计特异性引物,3'RACE 引物为 3-UGPase 5'-GGTGGCAGCTAATCTCATATGAA-GGAAG-3', 5' 的 RACE 引物为 5-UGPase 5'-ATGGGAAGACATCACCGTGCCTGGAG-3'。2

次 RACE-PCR 反应体系均为 50 μL,包括 SeqAmp DNA Polymerase 1 μL、2×SeqAmp Buffer 25 μL、PCR-Grade H₂O 15.5 μL、5'or3'RACE cDNA 2.5 μL、3-UGPaseor5-UGPase 1 μL、10×UPM 5 μL。PCR 程序为 5'RACE: 94 °C、30 s, 72 °C、3 min, 5 个循环; 94 °C、30 s, 70 °C、30 s, 72 °C、3 min, 5 个循环; 94 °C、30 s, 68 °C、30 s, 72 °C、3 min, 30 个循环; 4 °C 保温。3'RACE: 94 °C、30 s, 68 °C、30 s, 72 °C、3 min, 30 个循环; 4 °C 保温。后续实验步骤同保守区克隆过程。

得到 UGPase 基因完整序列后,使用 ExPASy 中的 Translate 工具将基因序列翻译成氨基酸序列,使用 ProtParam 软件分析蛋白质的基本性质。使用 Net Phos 3.1 Server 软件分析蛋白质的磷酸化位点,使用 NetOGlyc 4.0 软件分析蛋白质的糖基化位点。使用 TMHMM-2.0 软件分析蛋白质的跨膜情况,使用 SignalP-5.0 软件分析蛋白质的信号肽,使用 SoftBerry 网站分析蛋白质的亚细胞定位。使用 SOPMA 软件分析蛋白质的二级结构,使用 SWISS-MODEL 软件分析蛋白质的三级结构。在 NCBI 中的 Conserved Domain Database (CDD) 在线软件中分析蛋白质结构功能域,最后在 MEGA7.0 软件中使用邻位相连法(neighbor-joining)构建 UGPase 蛋白的系统进化树。

2.3 UGPase 基因表达量、相关酶活性与不同金线莲多糖含量测定及分析

按照“2.1”项的方法提取 7 个不同品种金线莲组培期及种植期茎段 qRT-PCR cDNA,按照“2.2”项得到的测序结果,设计 qRT-PCR 引物,UGPase-YGF: 5'-GATTATCCCAAACCCAAAGG-3', UGPase-YGR: 5'-AGAGGGGTTAGCAGGATTTG-3'; 预计扩增长度 232 bp。选择金线莲 Actin-2^[16] 基因作为内参基因,Actin-2-F: 5'-CGGGCAT-TCACGAGACCAC-3', Actin-2-R: 5'-AATAGAC-CCTCCAATCCAGACACT-3'。分别以不同品种的茎段 cDNA 为材料,UGPase-YGF、UGPase-YGR 为上下游引物进行 qRT-PCR 反应,反应体系共 20 μL: Tip Green qPCR SuperMix 10 μL,上、下游引物以及 DNA 模板各 0.4 μL, ddH₂O 8.8 μL。扩增程序: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环;qRT-PCR 结果按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ^[17] 计算。

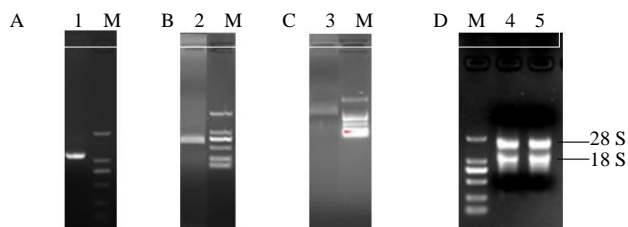
以 7 个不同品种金线莲茎段液氮研磨后离心取上清液为材料,采用上海科兴公司的酶联免疫分析

(ELISA)试剂盒数据检测不同品种金线莲组培期及种植期茎段中的 UGPase 酶活性。另外以不同品种金线莲茎段固体粉末为材料,采用苯酚-硫酸法^[18]测定不同品种金线莲茎段中多糖含量。分析采用 SPSS24.0 软件进行单因素方差分析并采用 Pearson 双变量相关性法^[19]结合多糖含量、基因表达量及酶活进行修改下分析。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取及金线莲 UGPase 基因的克隆

金线莲总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果见图 2-D,可清晰地看到 2 条 RNA 条带(28 S 和 18 S)其中 28 S 条带亮度大约是 18 S 条带的 2 倍, A_{260}/A_{280} 值在 2.08,可进行下一步的 cDNA 第一链合成实验^[20]及 RACE cDNA 合成实验。测序得到中间序列 1160 bp(图 2-A)、5'端序列 657 bp(图 2-B)和 3'端序列 924 bp(图 2-C)。拼接各片段,得到 UGPase 基因 cDNA 序列全长 1786 bp。开放阅读框为 1425 bp,编码 475 个氨基酸,cDNA 全长中还包含 5'非编码区 53 bp,3'非编码区 308 bp,以及起始密码子 ATG、终止密码子 TGA 和多聚 A 尾。将全长序列上传至 GENBANK,获得 NCBI 登录号 MT978185。



1-中间片段序列 2-5'端序列 3-3'端序列 4,5-总 RNA 琼脂糖凝胶电泳 M-Marker

1-middle fragment sequence 2-5' end sequence 3-3' end sequence 4,5-total RNA agarose gel electrophoresis M-Marker

图2 UGPase 基因全长序列的克隆及总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 The cloning of full nucleotide sequences of UGPase gene

3.2 金线莲 UGPase 基因信息生物学分析

通过 ProtParam 软件预测得到:UGPase 蛋白相对分子质量为 64 996.47,理论 pI 为 6.40,氨基酸中亮氨酸(Leu)占比最高,达到 10.8%,分子式为 $C_{2969}H_{4711}N_{757}O_{846}S_{14}$ 。在体外哺乳动物网织红细胞中预测半衰期为 30 h,不稳定指数为 34.49,属于稳定蛋白,脂肪系数为 108.41,亲水性平均值为 0.096,属于疏水蛋白。通过 Net Phos 3.1 Server 及 NetOGlyc

4.0 软件预测得到:UGPase 蛋白有磷酸化位点 47 个,其中丝氨酸 24 个,苏氨酸 17 个,酪氨酸 6 个。有糖基化位点 4 个,分别在第 67、71、73 及 82 个氨基酸。通过 SignalP-5.0、TMHMM-2.0 及 SoftBerry 网站预测得到:UGPase 蛋白存在信号肽,位置可能位于第 22~23 个氨基酸,表明该蛋白为分泌型蛋白,同时该蛋白存在跨膜位点,跨膜区可能位于第 494~516 个氨基酸,表明该蛋白为跨膜蛋白,亚细胞定位系数表明,UGPase 蛋白定位于细胞质的可能性最高。通过 SOPMA 及 SWISS-MODEL 软件预测得到:UGPase 蛋白具有 203 个 α -螺旋(alpha helix),占比 34.18%;137 个延伸链(extended strand),占比 23.06%;49 个 β -转角(beta turn),占比 8.25%;205 个无规卷曲(random coil),占比 34.51%,三级结构预测结果见图 3。通过 CDD 软件分析得到:UGPase 蛋白属于糖基转移酶家族 A (Glyco_tranf_ GTA_type) 成员之一,具有 PLN02474(位于第 22~486 位氨基酸)、UDPGP(位于第 48~458 位氨基酸)、UGPase_euk(位于第 97~396 位氨基酸)及 QR11(位于 49~486 位氨基酸)4 个结构域。

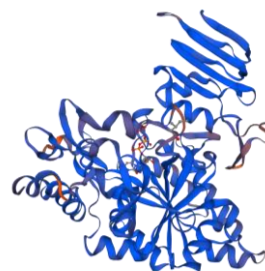


图3 金线莲 UGPase 蛋白三级结构

Fig. 3 Tertiary structure of UGPase protein from *Anoectochilus roxburghii*

通过 BLAST 氨基酸序列比对发现金线莲 UGPase 氨基酸序列与铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo(AGA17038.1)、蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb. f. (XP_020596934.1)、深圳拟兰 *Apostasia shenzhenica* Z. J. Liu&L. J. Chen (PKA66203.1)、芦笋 *Asparagus officinalis* L. (XP_020273555.1)、油棕 *Elaeis guineensis* Jacq. (XP_010935335.1)、糜子 *Panicum miliaceum* L. (RLN32892.1)、海枣 *Phoenix dactylifera* L. (XP_008804801.1)、菠萝 *Ananas comosus* (Linn.) Merr. (OAY68359.1)、狗尾草 *Setaria viridis* (L.) Beauv. (XP_034583618.1)、高粱 *Sorghum bicolor*

(L.) Moench (XP_002453185.1) 和甘蔗 *Saccharum officinarum* L. (ACL80329.1) 的相似性分别达到 88.60%、87.96%、86.51%、85.31%、85.07%、84.55%、84.01%、83.80%、82.86%、82.43% 和 85.34%。其中金线莲 *UGPase* 氨基酸序列与同属兰科的铁皮石斛、同源性最高(图4)。选取了一部分典型的单子叶植物使用 MEGA7.0 软件构建系统进化树(图5), 进行分子系统学分析, 系统进化树结果显示, 金线莲与铁皮石斛、蝴蝶兰、深圳拟兰、油棕、海枣聚为一大支, 其中进行与铁皮石斛、蝴蝶兰具有最近的亲缘关系, 这可能由于3种植物都属于兰科, 所以亲缘较近。

3.3 不同品种金线莲多糖含量测定

不同品种金线莲茎段多糖含量测定结果见图6所示。结果显示, 在这7个品种中, 金线莲茎段多糖变

化趋势均为明显上升, 且每个品种在2个时期中茎段多糖含量均不相同, 在组培期茎段中多糖含量最高的是无纹品种, 最低的是匠康2号品种, 所有品种之间均存在显著差异, 而在种植期茎段中多糖含量最高的是匠康1号, 最低的是匠康2号, 所有品种之间均存在显著差异。从组培期至种植期多糖增加最多的是小叶品种, 最少的是匠康2号品种, 多糖含量最少增加了1倍以上, 最多达到了9倍。

3.4 不同品种金线莲 *UGPase* 基因的表达分析

不同品种金线莲 *UGPase* 基因荧光定量PCR实验结果结果如图7所示, 结果显示, *UGPase* 基因在7个不同品种金线莲2个时期的茎段中均有表达, 但在不同时期具有有表达水平。在组培期, 茎段中表达最高为无纹品种, 最低为圆叶品种, 其中无纹品种与匠康1号、尖叶品种表达量有显著差

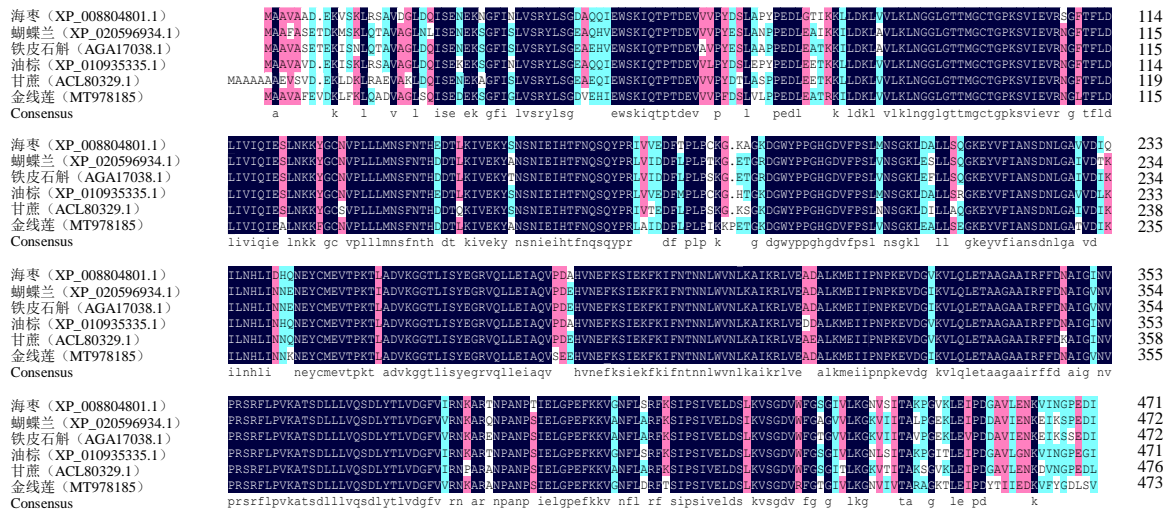


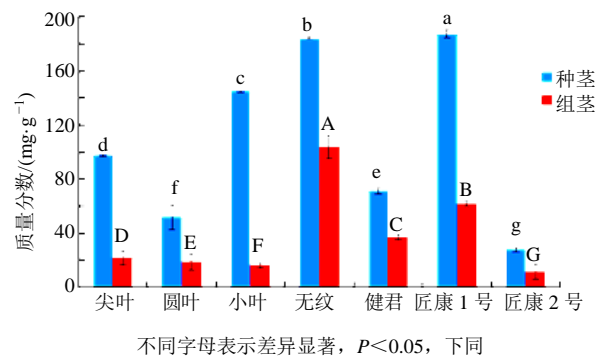
图4 金线莲 *UGPase* 氨基酸序列与其他植物比对结果

Fig. 4 Results of comparison of *UGPase* amino acid sequence with other plants



图5 12种植物 *UGPase* 蛋白进化树

Fig. 5 Evolutionary tree of *UGPase* protein in 12 plant species



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同
Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$, same as below

图6 不同品种金线莲茎段多糖含量测定

Fig. 6 Determination of polysaccharides in different varieties of *Anoectochilus roxburghii*

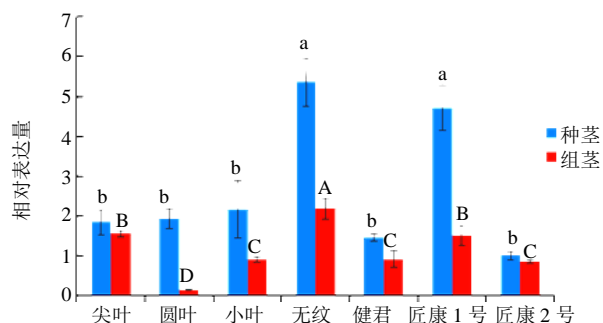


图7 不同品种金线莲 UGPase 基因茎段表达量

Fig. 7 Relative expression levels of UGPase of stem in different varieties of *Anoechilus roxburghii*

异,而这2个品种与健君、小叶和匠康2号3个品种茎段表达量有显著差异,最后表达量最小的圆叶品种和前面3个品种有显著差异。种植期茎段表达量最高同样是无纹品种,最低为匠康2号品种,无纹品种与匠康1号品种与其他5个品种茎段表达量有显著性差异。另外在组培期到种植期之间,7个品种金线莲茎段部位的表达量均呈现上升趋势,且增加趋势较为明显。

3.5 不同品种金线莲 UGPase 酶的酶活性测定

不同品种金线莲茎段 UGPase 酶活性测定结果如图8所示。结果显示,UGPase 酶在7个不同品种金线莲2个时期的茎段中均有活性,但在不同时期酶活变化不大。在组培期,茎段中酶活最高为圆叶品种,最低为匠康2号品种,7个品种茎段部位酶活均无显著差异。种植期茎段酶活最高匠康1号品种,最低为匠康2号品种,匠康2号品种较其他6个品种茎段酶活略低。另外在组培期到种植期之间,7个品种的金线莲茎段部位酶活均呈现上升趋势,但没有出现大幅度增加的情况。

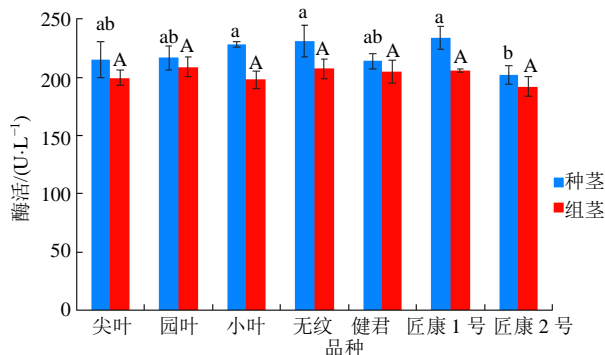


图8 不同品种金线莲 UGPase 酶茎段酶活

Fig. 8 Enzymatic activity of UGPase of stem and leaf in different varieties of *Anoechilus roxburghii*

3.6 不同品种金线莲多糖与表达、酶活性相关性分析

通过 SPSS 软件对实验结果进行相关性分析,结果如表1所示。不同品种不同时期金线莲茎段部位多糖含量变化均与 UGPase 基因表达量以及酶活呈极显著正相关性,而表达量与多糖含量的相关系数要高于酶活,另外,UGPase 基因表达量与单独组培时期以及单独种植时期不同品种金线莲茎段部位多糖含量均呈极显著正相关,相关系数较与不同品种不同时期金线莲茎段部位多糖含量略小。但酶活只与单独种植时期不同品种金线莲茎段部位多糖含量呈极显著正相关,与单独组培时期多糖含量并未有显著相关性,而且与种植期多糖含量相关系数同样小于与不同品种不同时期金线莲茎段部位多糖含量的相关系数。

表1 金线莲多糖含量与 UGPase 基因表达量及酶活相关性分析

Table 1 Analysis of correlation between polysaccharide content and expression of UGPase gene or enzyme activity in *Anoechilus roxburghii*

项目	多糖含量(全)	多糖含量(组培苗茎)	多糖含量(种植苗茎)
表达量	0.823**	0.759**	0.794**
酶活	0.785**	0.387	0.748**

*P<0.05, 相关性显著; **P<0.01 相关性极显著

*P<0.05, correlation is significant; ** P<0.01 correlation is extremely significant

4 讨论

植物多糖具有调节免疫功能、抑制肿瘤、延缓衰老、抗疲劳、降血糖、抗辐射、抗菌抗病毒及保肝等作用。为了利用植物基因工程、细胞工程工业化大量生产该重要活性成分,多糖合成途径及调控的关键酶基因成为研究热点,植物多糖合成途径是植物糖代谢相关途径的一部分,植物的糖代谢相关途径是整个植物生物代谢的中心,它勾通了蛋白质代谢、脂类代谢、核酸代谢及次生物质代谢。尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase)是植物糖代谢途径中的一个关键酶,其首先由 Munch-Petersen、Kalckar 和 Cutolo 于1953年在酵母细胞中发现^[21],近年来,国内外学者已在党参^[22]、白花泡桐^[23]、龙须菜^[24]、黄芪^[25]、铁皮石斛^[26-27]、落叶松^[28]、海带^[29]和紫穗槐^[30]等植物中克隆分离出 UGPase 基因。它催化反应 UTP+葡萄糖-1-P⇌UDP-葡萄糖+PPi,在不同的植物组织中,其催化方向有所不同。在源组织中,二氧化碳经卡尔文循环固定生成磷酸丙糖后,将其转化为果糖-

1-6-二磷酸,然后在磷酸酶、己糖磷酸变位酶以及葡萄糖磷酸变位酶的催化下生成葡萄糖-1-磷酸随后经 UGPase 催化生成 UDP-葡萄糖,为蔗糖的生物合成提供底物其产物^[31],在库组织中,催化蔗糖的降解,即催化 UDP-葡萄糖生成葡萄糖-1-磷酸^[32]。UGPase 还与胞液中的腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)相偶联,形成腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG),参与淀粉的合成^[10,33]。生物体合成多糖的前提是单糖以活化的形式存在,使其可以被充分利用,UDP-Glc 作为活化糖,它在被 UGPase 经葡萄糖催化生成后充分参与到植物中多种多糖类物质的合成中,是植物多糖合成的关键酶。

本研究利用已报到的其他植物 UGPase 基因序列,首次从兰科植物金线莲中克隆出 UGPase 基因全长序列,该基因全长 1786 bp。开放阅读框为 1425 bp,编码 475 个氨基酸,在 NCBI 上进行在线 BLAST 序列比对,UGPase 氨基酸序列同源性比对及系统进化树分析显示,金线莲 UGPase 氨基酸片段与其他植物有较高的同源性(88.60%~82.43%),其中与铁皮石斛等兰科植物同源性最高,表明 UGPase 基因编码区高度保守,与前人报道的结果非常相似^[34]。另外李帅玲^[35]研究得出金线莲是多糖积累型植物,其主要积累部位为根茎,其他部位多糖几乎可忽略不计,因此本研究选择 7 个不同品种金线莲的茎段来作为实验材料。在本研究中发现,不同品种金线莲之间多糖含量具有显著性差异,这与魏翠华等^[36]、施满容等^[37]研究结果类似。UGPase 基因表达量在不同品种金线莲茎段中与多糖含量呈极显著正相关,这与在铁皮石斛^[38]的类似研究中结果一致。此外,UGPase 酶活性也同样与多糖含量存在极显著正相关,不过相关系数较表达量小。由此可以初步判断 UGPase 基因确实参与金线莲多糖合成代谢途径,在主要多糖积累部位参与调控多糖的合成积累。

本研究以尖叶金线莲茎段为材料,克隆出金线莲 UGPase 基因全长。通过氨基酸序列同源性分析及系统进化树等的方法,可推断克隆得到的序列片段就是金线莲 UGPase 基因的 cDNA 片段。另外通过测定 7 个不同品种金线莲茎段 UGPase 基因表达量及相关酶活,并与多糖含量进行相关性分析,初步证明 UGPase 基因是参与金线莲多糖合成代谢的关键基因之一。这为金线莲多糖的合成代谢途径研

究提供了必要的前期准备,并为今后通过分子生物学手段增加其多糖含量奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 400.
- [2] 邓燕群, 李伟, 张晓辉, 等. 金线莲多糖对 α -葡萄糖苷酶活性及糖尿病小鼠血糖的影响 [J]. 汕头大学学报: 自然科学版, 2014, 29(3): 41-45.
- [3] 林丽清, 黄丽英, 郑艳洁, 等. 金线莲多糖的提取及清除氧自由基作用的研究 [J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(5): 37-39.
- [4] 张锦雀. 金线莲多糖的分离纯化、结构表征及其抗肿瘤活性 [D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
- [5] 黄立峰, 卢若艳. 金线莲提取物对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 福州总医院学报, 2005, 12(4): 277-278.
- [6] 许丹妮. 金线莲多糖对小鼠免疫调节作用的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [7] 谢朋辉. 胡杨/灰杨一个尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因克隆及功能研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2013.
- [8] 罗玉. 植物中的糖代谢及其相关酶 [J]. 文山师范高等专科学校学报, 2004, 17(2): 155-159.
- [9] Katsube T, Kazuta Y, Mori H, et al. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing [J]. *J Biochem*, 1990, 108(2): 321-326.
- [10] Eimert K, Villand P, Kilian A, et al. Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues [J]. *Gene*, 1996, 170(2): 227-232.
- [11] Pua eng-chong, Lim S S W, Liu P, et al. Expression of a UDPglucose pyrophosphorylase cDNA during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*) [J]. *Funct Plant Biol*, 2000, 27(12): 1151.
- [12] Abe T, Niiyama H, Sasahara T. Cloning of cDNA for UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(2/3): 216-221.
- [13] Dai N, Petreikov M, Portnoy V, et al. Cloning and expression analysis of a UDP-galactose/glucose pyrophosphorylase from melon fruit provides evidence for the major metabolic pathway of galactose metabolism in raffinose oligosaccharide metabolizing plants [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(1): 294-304.
- [14] Wang Q H, Zhang X, Li F G, et al. 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.
- [15] Sowokinos J R, Thomas C, Burrell M M. 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.
- [16] Zhang G, Zhao M M, Song C, *et al.* Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5905-5912.
- [17] 何焱, 李忠玥, 刘江, 等. 翼首草实时荧光定量 PCR 内参基因筛选 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(09): 2987-2993.
- [18] 李萍, 潘晓丽, 郑小香, 等. 金线莲多糖提取工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(13): 105-107.
- [19] Wang Y, Chen H W, Han D G, *et al.* Correlation of the A-FABP gene polymorphism and mRNA expression with intramuscular fat content in three-yellow chicken and hetian-black chicken [J]. *Anim Biotechnol*, 2017, 28(1): 37-43.
- [20] Ogura T, Tsuchiya A, Minas T, *et al.* Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct [J]. *BMC Res Notes*, 2015, 8: 644.
- [21] Kalckar H M, Braganca B, Munch-Petersen A. Uridyl transferases and the formation of uridine triphosphate: Uridyl transferases and the formation of uridine diphosphogalactose [J]. *Nature*, 1953, 172(4388): 1038.
- [22] 李晶, 郭琼琼, 孙海峰, 等. 党参 *CpUGPase* 基因的克隆、序列分析与原核表达 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3876-3883.
- [23] 熊治国, 刘志刚, 李建祥, 等. 白花泡桐尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 mRNA 全序列克隆及序列分析 [J]. 河南农业大学学报, 2012, 46(3): 263-267.
- [24] 张杨, 隋正红, 丁弘叶, 等. 龙须菜 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因的克隆及其表达与琼胶产量的关系 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2011, 41(Z1): 80-86.
- [25] Wu X J, Du M, Weng Y Q, *et al.* UGPase of *Astragalus membranaceus*: CDNA cloning, analyzing and expressing in *Escherichia coli* [J]. *Acta Botan Sin*, 2002, 44(6): 689-693.
- [26] Wan R L, Sun J, He T, *et al.* Cloning cDNA and functional characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Dendrobium officinale* [J]. *Biol Plant*, 2017, 61(1): 147-154.
- [27] 吕楠, 安红强, 裴薇, 等. 铁皮石斛尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因的克隆与分析 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(7): 1215-1219.
- [28] 梅丽丽. 兴安落叶松 UDP 焦磷酸化酶基因启动子的克隆及功能分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [29] Chi S, Feng Y J, Liu T. Molecular cloning, characterization, and comparison of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Gracilaria chouae* and *Saccharina japonica* [J]. *J Appl Phycol*, 2016, 28(3): 2051-2059.
- [30] 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.
- [31] Kleczkowski L A, Geisler M, Ciereszko I, *et al.* UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(3): 912-918.
- [32] Winter H, Huber S C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000, 35(4): 253-289.
- [33] ap Rees T, Leja M, MacDonald F D, *et al.* Nucleotide sugars and starch synthesis in spadix of *Arum maculatum* and suspension cultures of *Glycine max* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(11): 2463-2468.
- [34] 吴晓俊, 刘涤, 胡之璧. 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(3): 193-200.
- [35] 李帅玲. 金线莲多糖的含量变化、结构表征及药理活性研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018.
- [36] 魏翠华, 谢宇, 秦建彬, 等. 不同品种金线莲氨基酸和多糖含量的比较研究 [J]. 福建林业科技, 2016, 43(1): 43-45.
- [37] 施满容, 龚林光, 钟幼雄. 不同来源金线莲活性成分含量的研究 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(28): 9731-9734.
- [38] 谢腾飞, 赖增哲, 唐雄, 等. 不同来源铁皮石斛多糖积累相关基因表达差异研究 [J]. 热带农业科学, 2020, 40(5): 42-47.

[责任编辑 时圣明]