

• 药材与资源 •

天麻中糖基转移酶基因 *GeGT1* 的克隆及原核表达分析刘梦丽¹, 余函纹¹, 单婷玉¹, 吴君贤¹, 彭华胜^{1,2}, 程铭恩¹, 查良平^{1*}, 桂双英^{1,3,4,5*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230038

2. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

3. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012

4. 现代药物制剂安徽省教育厅工程技术研究中心, 安徽 合肥 230012

5. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 克隆天麻糖基转移酶基因 (glycosyltransferase, *GeGT1*) 的全长 cDNA 序列, 进行序列分析和原核表达分析, 并探究该基因在天麻不同器官中的表达规律。方法 在天麻转录组数据库中通过注释和比对, 用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物。通过反转录聚合酶链式扩增 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法从天麻块茎中克隆得到 *GeGT1* 全长 cDNA 序列, 利用生物信息学软件预测基因编码蛋白的特征; 利用 ClustalW 和 MEGA 6.06 软件构建 *GeGT1* 的系统进化树; 构建原核表达载体 pET-28a-*GeGT1*, 转化至大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 进行诱导表达; 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术分析基因表达模式。结果 *GeGT1* 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 全长 1503 bp, 编码 500 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 55 494.33, 理论等电点为 5.51, 为稳定的酸性蛋白。蛋白质二级结构由 49% 无规卷曲、28.2% α -螺旋、22.8% 延伸链构成。*GeGT1* 属于糖基转移酶 GTB 超家族, 同时具有一个跨膜结构域, 无信号肽, 为非分泌蛋白。通过序列同源性分析, *GeGT1* 与铁皮石斛具有较高的同源性。系统进化树分析证实了兰科植物糖基转移酶基因的同源性。SDS-PAGE 结果显示, 诱导表达蛋白为 63 000, 与预期蛋白大小一致。基因表达结果显示, *GeGT1* 基因的表达水平在花中最高, 其次是块茎、茎。结论 首次克隆并分析了 *GeGT1* 基因, 建立了原核表达体系, 为进一步研究天麻活性成分合成的分子机制奠定基础。

关键词: 天麻; 糖基转移酶; 基因克隆; 序列分析; 原核表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4327-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.024

Cloning and prokaryotic expression of glycosyltransferase *GeGT1* from *Gastrodia elata*LIU Meng-li¹, YU Han-wen¹, SHAN Ting-yu¹, WU Jun-xian¹, PENG Hua-sheng^{1,2}, CHENG Ming-en¹, ZHA Liang-ping¹, GUI Shuang-ying^{1,3,4,5}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

4. Engineering Technology Research Center of Modernized Pharmaceutics Anhui Education Department (AUCM), Hefei 230012, China

5. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Technology and Application (AUCM), Hefei 230012, China

Abstract: Objective To clone and analyze the full-length cDNA sequence of *GeGT1*, performed sequence analysis and prokaryotic expression analysis, and to explore the expression law of this gene in different organs of *Gastrodia elata*. **Methods** Gene specific primers

收稿日期: 2020-11-02

基金项目: 安徽省中央引导地方科技发展专项资金资助项目 (YDZX20183400004233); 中央本级重大增减支项目 (2060302)

作者简介: 刘梦丽 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 18709864931 E-mail: liumengli489@163.com

*通信作者: 查良平, 副研究员。E-mail: zlp_ahtcm@126.com

桂双英, 教授。Tel: (0551)68129121 E-mail: guishy0520@126.com

were designed by primer premier 5.0 software through annotation and comparison in *G. elata* transcriptome database. The full-length cDNA sequence of *GeGT1* was cloned from the tuber of *G. elata* by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the characteristics of the gene-encoded protein were predicted by bioinformatics software. The phylogenetic tree of *GeGT1* was constructed by ClustalW and MEGA 6.06 software. Prokaryotic expression vector p ET-28a-*GeGT1* was constructed and converted to *E. coli* *Transetta* (DE3) for induced expression. The gene expression patterns were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** The open reading frame (ORF) of *GeGT1* gene was 1503 bp, encoding 500 amino acids, the relative molecular mass of the protein was 55 494.33, and the theoretical isoelectric point was 5.51. It was a stable acidic protein. The protein secondary structure was composed of 49% random coils, 28.2% α -helices, and 22.8% extended chains. *GeGT1* belonged to the GTB-type super family, without signal peptide, and was a non-secreted protein. Through sequence homology analysis, *GeGT1* and *Dendrobium candidum* had high homology. Phylogenetic tree analysis confirmed the homology of glycosyltransferase genes in orchidaceae. SDS-PAGE showed that the induced expression protein was 63 000 consistent with the expected protein size. The results of gene expression showed that the expression level of *GeGT1* gene was different in different parts of *G. elata*, the highest in flower, the second in tuber, and the lowest in stem. **Conclusion** In this study, the *GeGT1* gene of *G. elata* was cloned and analyzed for the first time, and established a prokaryotic expression system, which laid a foundation for further study on the molecular mechanism of *G. elata* active components synthesis.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; glycosyl transferases; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression; qRT-PCR

天麻始载于《神农本草经》列为上品，原名“赤箭”，因其茎似箭，端有花，远看如箭有羽而得名^[1]。天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎，性甘、平，归肝经，具有息风止痉、平抑肝阳和祛风通络的功效^[2]。天麻作为药食同源滋补保健类药材，包含酚类、有机酸类、多糖类等多种活性成分^[3-4]，具有抗惊厥、镇静催眠、镇痛、保护神经细胞、改善记忆及延缓衰老等药理作用^[5]。

糖基转移酶 (glycosyltransferase, GTs) 是一类高度分化的多基因家族酶，广泛存在于动物、植物和微生物中，GTs 能催化糖基团从供体分子转移到特异性受体分子，形成各种糖苷化合物^[6-8]。天麻中很多活性成分是以糖苷化的形式存在，包括天麻素、巴利森苷等主要活性成分，糖基化反应是由 GTs 介导的植物体内的一种重要的次生代谢反应，通过糖基化修饰，能改善天然药物的水溶性、稳定性和生物利用度等^[9]。

近年来，已经从霍山石斛^[10]、布渣叶^[11]、穿心莲^[12]、地黄^[13]、长春花^[14]、花楸^[15]等药用植物中克隆出了 GTs 基因。本研究以天麻作为实验材料，利用反转录聚合酶链式扩增 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术克隆天麻糖基转移酶基因 (glycosyltransferase, *GeGT1*) 的 cDNA 全长序列，构建原核表达载体并转化至大肠杆菌进行表达，研究 *GeGT1* 不同器官表达模式，为后期研究 *GeGT1* 及其生物学功能奠定了理论基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

供试天麻材料来源于安徽省六安市金寨县金山

寨食 (药) 用菌种植专业合作社，经安徽中医药大学药学院彭华胜教授鉴定为兰科植物 *Gastrodia elata* Bl.。天麻进入花期后，收集天麻的块茎、茎和花，迅速放入液氮中，带回实验室后保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ 购自于 TaKaRa 公司；高保真酶购自于 NEB 公司；切胶回收试剂盒、感受态细胞 Trans1-T1、感受态细胞 *Transetta* (DE3) 购自于北京全式金生物技术有限公司。所需引物由上海生工生物有限公司合成。

2 方法

2.1 基因数据获取

GeGT1 基因序列来源于天麻转录组数据 (本实验室)，经冗余序列去除、序列组装，功能注释后分类。其他物种的氨基酸序列均来自于 GenBank 数据库。

2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

按照 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒操作说明提取天麻块茎总 RNA，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。ND2000 (Denovix DS-11+)，S-03512) 测定天麻总 RNA 的 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值，选择 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~2.0 的总 RNA 反转录成 cDNA。以 RNA 为模板，采用 TaKaRa 反转录试剂盒 (PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 进行反转录，得到天麻的 cDNA，合成产物保存于 -20 °C 冰箱中。

2.3 *GeGT1* 基因的克隆

根据天麻转录组数据库，用 Primer Premier 5.0

软件设计基因特异性引物。上游引物: GT1-F: 5'-ATGGTAGCAGCGGCACAGAATCCAT-3'; 下游引物: GT1-R: 5'-TTACAAAAAAGGTCCCC TTCCAT-3', 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以天麻的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增采用 Phusion High-Fidelity 酶(NEB, M0501S), PCR 体系为 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 需 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测、回收, 然后使用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 切胶回收试剂盒回收目的条带, 并将扩增产物连接至克隆载体 pUC-GW-Amp, 转化至大肠杆菌中, 挑菌并进行菌液 PCR 验证, 挑选 8 个阳性克隆菌液送至苏州金唯智公司完成测序。

2.4 *GeGT1* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线工具 BLAST 对基因核苷酸序列和氨基酸序列进行相似性比对分析; ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找基因开放阅读框(open reading frame, ORF); ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *GeGT1* 基因编码的蛋白理化性质; NPS (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 进行蛋白质二级结构分析; Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), 进行三维结构建模, 结合 PyMOL 软件预测蛋白质的三级结构; CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析; TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白序列的跨膜结构域分析; SinalP4.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行蛋白序列的信号肽预测分析。运用 ClustalW 软件与其他植物的氨基酸序列进行比对, 用 MEGA 6.06 软件构建邻接(neighbor-joining)系统进化树, bootstrap 重复次数为 1000 次。

2.5 *GeGT1* 基因的原核表达

对测序后的序列进行分析, 设计含有接头序列的无缝拼接引物, 上游引物: *GeGT1*-BamH I-F: 5'-GACAGCAAATGGGTCGCGGAATGGTAGCAG CGGCACAGAATCCAT-3'; 下游引物: *GeGT1*-BamH I-R: 5'-CGACGGAGCTCGAATTCGGATTA-CAAAAAAAGGTCCCTTCCAT-3'。以重组质粒

为模板, 进行 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并进行切胶回收。用 BamH I 限制性内切酶将 pET-28a 进行单酶切, 并进行切胶回收。目的基因片段与原核表达载体进行无缝拼接, 转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 涂在卡那霉素抗性固体培养基上, 挑取单菌落, 菌液 PCR 验证并将 8 个阳性菌液送至公司测序。将测序阳性的重组质粒转化大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 感受态细胞, 于 LB 液体培养基中 37 °C 200 r/min 振荡培养, 至 A_{600} 值为 0.6~0.8, 加 0.4 mmol/L IPTG 于 28 °C 诱导 12 h, 收集菌液, 进行 SDS-PAGE 检测。

2.6 *GeGT1* 基因的表达水平分析

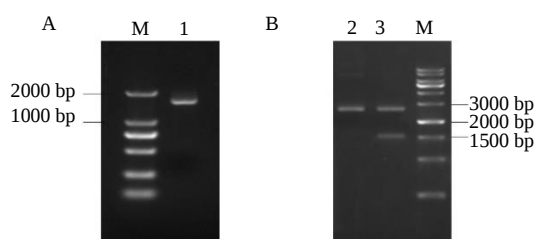
运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法检测 *GeGT1* 基因在天麻块茎、茎、花的相对表达量。以天麻 β -actin 基因为内参基因, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计实时荧光定量引物。*GeGT1* 基因 qRT-PCR 上游引物: GT1-RT-F: 5'-TGTTGGC-GTTAGATGTTTGA-3'; 下游引物: GT1-RT-R: 5'-ACCACCCAAACAAACGGA-3', β -actin 基因实时荧光定量 PCR 上游引物: β -actin-1-F: 5'-GGGGATGAAGCACAGTCCAA-3'; 下游引物: β -actin-1-R: 5'-GCCGTGGTTGTGAAGGAGTA-3', 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。按照“2.2”项方法, 提取天麻块茎、茎和花中的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 稀释 10 倍备用。应用 Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪(安捷伦, 美国)进行 PCR 扩增。反应体系为 25 μ L, 包括 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$) 12.5 μ L、ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.25 μ L、ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.25 μ L、GT1-RT-F 1 μ L、GT1-RT-R 1 μ L、cDNA 2 μ L、ddH₂O 8 μ L。PCR 条件: 95 °C、30 s, 95 °C、15 s, 60 °C、30 s, 72 °C、15 s, 40 个循环。实验中重复 3 次, 绘制熔解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 *GeGT1* 基因克隆和序列分析

以天麻的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 进行目的基因扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳条带约为 1503 bp (图 1-A), 与目的基因片段大小吻合。重组质粒 pUC-GW-Amp-*GeGT1* 经 MluI 和 AscI 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测得目的基因条带, 约为 1503 bp (图

1-B), 利用 DNAMAN 软件结合 ORF Finder 在线软件对 *GeGT1* 基因 cDNA 序列进行分析, *GeGT1* 基因开放阅读框 (ORF) 全长 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸。通过 Genbank 中 BLASTX 功能, 对 *GeGT1* 蛋白序列进行同源比对分析, 比对结果显示, *GeGT1* 基因与铁皮石斛 *Dendrobium catenatum* Kimura et Migo 同源相似性为 58.56%, 与小兰屿蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb. 同源相似性为 55.48%, 与深圳拟兰 *Apostasia shenzhenica* Z.J.Liu & L. J. Chen 同源相似性为 55.14%。比对结果表明所获基因属于 GTs 家族, 将该基因命名为 *GeGT1*, GenBank 注册号为 MW015078。



M-Marker 1-*GeGT1* 基因全长 2-pUC-GW-Amp 载体 3-经 MluI 和 AscI 双酶切的 pUC-GW-Amp-*GeGT1* 基因
M-Marker 1-Full length of *GeGT1* gene 2-pUC-GW-Amp 3-*GeGT1* in pUC-GW-Amp digested by MluI and AscI

图 1 *GeGT1* (A) 和 pUC-GW-Amp-*GeGT1* (B) 的基因克隆

Fig. 1 Cloning of *GeGT1* (A) and pUC-GW-Amp-*GeGT1* (B)

3.2 *GeGT1* 蛋白理化性质分析

利用在线工具 ExPASy 对 *GeGT1* 基因编码蛋白进行理化性质分析, 结果显示, *GeGT1* 编码蛋白由 500 个氨基酸残基组成, 蛋白理论等电点为 5.51, 相对分子质量为 55 494.33, 不稳定系数为 40.12, 脂肪指数为 80.34, 可初步判断 *GeGT1* 蛋白为稳定的酸性蛋白。

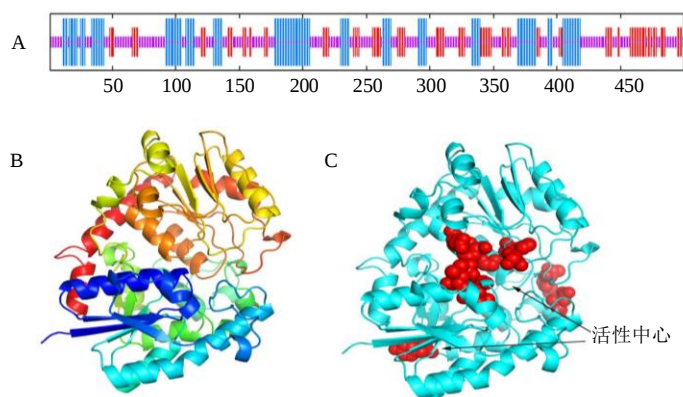
3.3 *GeGT1* 蛋白二级和三级结构预测分析

利用 NPS 在线软件对 *GeGT1* 蛋白的二级结构进行预测分析。结果显示 (图 2-A), *GeGT1* 蛋白二级结构元件中无规卷曲 (random coil) 所占的比例最高, 包含 245 个氨基酸, 占 49%; α -螺旋包含 141 个氨基酸, 占 28.2%; 延伸链包含 114 个氨基酸, 占 22.8%。

利用 SWISS-MODEL Workspace 在线软件对 *GeGT1* 蛋白进行同源建模, 结合 PyMOL 软件预测得到 *GeGT1* 三维空间模型 (图 2-B) 及 *GeGT1* 活性中心氨基酸序列 (图 2-C), 通过 ExPASy structure assessment 程序评测推导, *GeGT1* 蛋白模型 6lzx.1.B 序列相似性 42%, 全球性模型质量估测 (global model quality estimation, GMQE) 值为 0.68。

3.4 *GeGT1* 蛋白结构功能域、跨膜结构域以及信号肽分析

利用 NCBI 的 Conserved domains 在线工具对 *GeGT1* 蛋白进行结构域分析 (图 3-A), *GeGT1* 的 17~418 aa 具有 UDP-GTs 的保守结构域, 结果表明 *GeGT1* 蛋白属于 GTB 型超家族。利用 TMHMM2.0



A-*GeGT1* 蛋白的二级结构 (蓝色代表 α -螺旋, 红色代表延伸链, 紫色代表无规卷曲) B-*GeGT1* 蛋白的三级结构 C-*GeGT1* 蛋白的三级结构 (红色球形结构示意图酶的活性中心氨基酸)

A-secondary structure of *GeGT1* (blue: α helix; red: extended strand; purple: random coil) B-tertiary structure of *GeGT1* C-tertiary structure of *GeGT1* (red spherical structure indicates the active central amino acid of the enzyme)

图 2 *GeGT1* 蛋白的二级结构和三级结构

Fig. 2 Secondary and tertiary structure of *GeGT1*

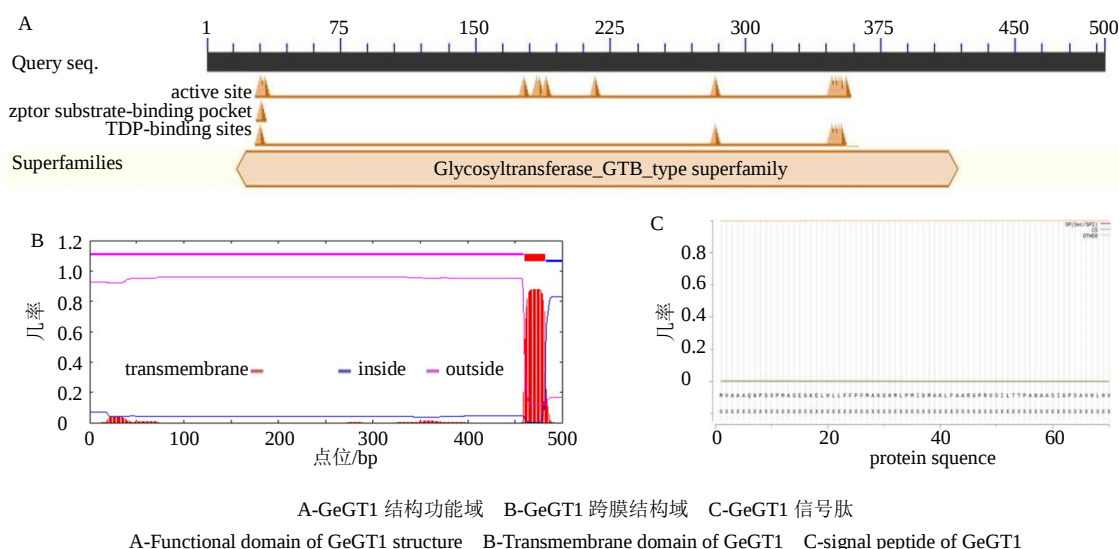


图 3 GeGT1 的结构功能域与跨膜结构域

Fig. 3 Structural functional domains and transmembrane domains of GeGT1

在线工具对 GeGT1 进行跨膜结构区域预测(图 3-B), 结果表明, GeGT1 蛋白含有一个显著的跨膜螺旋区, 460~482 aa 位于跨膜结构域, 1~459 aa 位于膜外侧, 483~500 aa 位于膜内侧, 说明 GeGT1 属于跨膜蛋白。利用 SinalP4.0 Server 预测分析 GeGT1 蛋白的信号肽(图 3-C), 结果显示存在信号肽的概率为 0.17%, 故推测 GeGT1 蛋白不存在信号肽, 是非分泌蛋白。

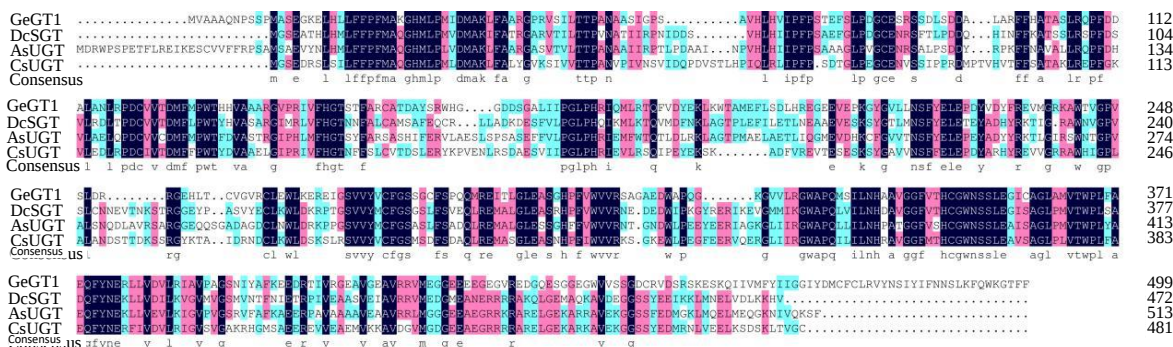
3.5 GeGT1 的氨基酸序列同源比对

利用 DNAMAN 软件对 GeGT1 氨基酸序列与其他植物基因进行氨基酸序列同源比对。将 GeGT1 序列与铁皮石斛糖基转移酶(DcSGT, XP_020677364.1)、深圳拟兰糖基转移酶(AsUGT,

PKA65321.1)、番红花糖基转移酶(CsUGT, AIF79773.1)进行多序列比对分析(图 4), 结果显示, 这 4 种植物的同源性为 60.25%, 其中 GeGT1 与 DcSGT 的同源性最高, 为 58.56%。

3.6 GeGT1 的系统进化树分析

选取 GenBank 中记载的 25 种植物的 GTs 基因的氨基酸序列: 用 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建 GTs 氨基酸序列的系统进化树(图 5)。结果显示, 来源于不同物种 GTs 基因的蛋白被聚成双子叶植物、单子叶植物、裸子植物、藻类和菌类, 其中 GeGT1 与铁皮石斛、深圳拟兰和小兰屿蝴蝶兰 GTs 序列位于同一分支点, 表明亲缘关系高, 进一步证实了兰科植物 GTs 基



不同颜色表示序列相似性: 深蓝色 100%, 粉色≥75%, 浅蓝色≥50%

Different colors indicate sequence similarity: dark blue 100%, pink≥75%, light blue≥50%

图 4 天麻、铁皮石斛、深圳拟兰和番红花 GTs 氨基酸序列同源性比对

Fig. 4 Amino acid sequence homology alignment of *Gastrodia elata* Bl, *Dendrobium catenatum*, *Apostasia shenzhenica* and *Crocus sativus* L.glycosyltransferase

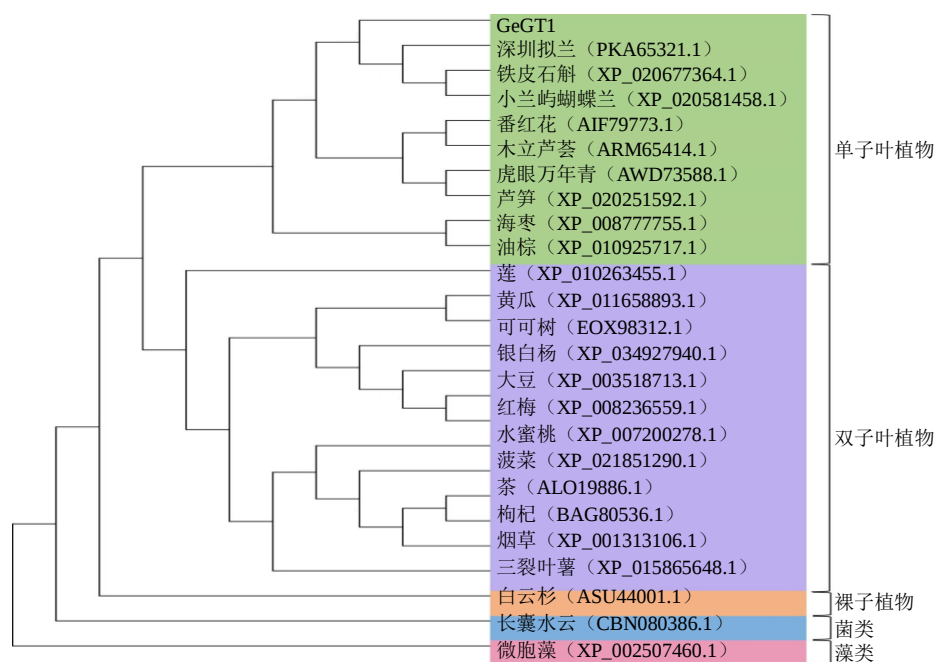


图 5 GeGT1 与其他物种 GTs 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of GeGT1 and other species glycosyltransferase amino acid sequences

因的同源性。

3.7 GeGT1 基因的原核表达

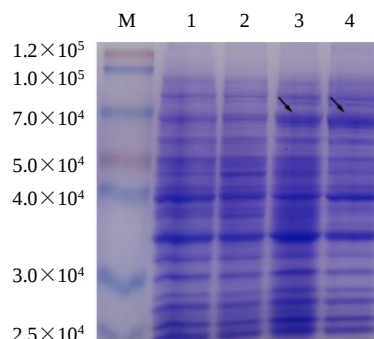
将重组质粒 pET-28a-GeGT1 转入大肠杆菌 *Transtetta* (DE3) 感受态细胞中, 菌液 PCR 检测阳性菌株。以 pET-28a 转入 *Transtetta* (DE3) 感受态细胞作为对照, 在 0.4 mmol/L IPTG、28 °C 诱导 12 h 条件下观察重组融合蛋白的表达。同时重组菌株表达后收集菌体并进行破碎裂解, 上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示 (图 6), 经 IPTG 诱导后的 pET-28a-GeGT1 菌株和上清液在 63 000 处出现明显的目的蛋白条带。

3.8 天麻不同器官的 GeGT1 基因表达差异分析

运用 qRT-PCR 检测了天麻块茎、茎、花的 GeGT1 基因表达差异 (图 7)。结果显示, GeGT1 基因在天麻各个器官中均有表达, GeGT1 基因在花中的表达水平最高, 其次是块茎, 在茎中的表达水平最低。

4 讨论

天麻是我国名贵的中药材, 以块茎入药, 含有酚酸类、有机酸类、脂类、多糖类等多种成分, 被誉为“治风之神药”, 是一种药食同源的中草药^[16], 目前已入选安徽十大皖药, 被卫建委列入药食同源试点品种。现代药理研究表明, 天麻具有镇静、抗惊厥、镇痛、祛风湿、明目增智及延缓衰老等功效^[17]。天麻中



M-Marker 1-空载 (pET-28a) 2-未诱导的 pET-28a-GeGT1 菌株 3-IPTG 诱导的 pET-28a-GeGT1 菌株 4-IPTG 诱导的 pET-28a-GeGT1 上清液
M-Marker 1-empty vector (pET-28a) 2-pET-28a-GeGT1 without IPTG induction 3-pET-28a-GeGT1 with IPTG induction 4-pET-28a-GeGT1 supernatant with IPTG induction

图 6 GeGT1 蛋白原核表达分析

Fig. 6 Prokaryotic expression of GeGT1 protein

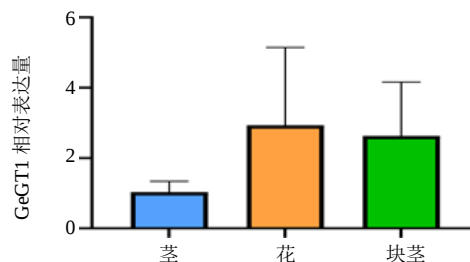


图 7 天麻不同部位的 GeGT1 基因表达水平

Fig. 7 Gene expression levels of GeGT1 in different organ

很多活性成分是以糖苷化的形式存在,包括天麻素、巴利森苷等主要活性成分。因此对天麻糖苷类化合物代谢途径酶基因的研究有利于提高天麻药用植物资源的应用价值。GTs在天麻糖苷类化合物合成过程中,起着至关重要的作用,目前在其他植物上已有广泛的报道,然而,天麻中关于该基因的研究较少。本研究成功克隆了1条 *GeGT1*, ORF 全长 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 55 494.33。通过生物信息学分析该蛋白具有 UDP-GTs 的保守结构域, 属于 GTB 型超家族。构建了重组质粒 pET-28a-*GeGT1*, 在大肠杆菌中诱导出可溶性蛋白, 为进一步研究 *GeGT1* 基因的体外功能奠定基础。

GTs 是一个功能多样化的多成员基因家族, 根据其氨基酸序列的相似性、底物特异性、反应机制、反应类型和三维结构, 将 GTs 分为 97 个家族 (GT1~GT97), 其中 GT1 是含有 GTs 数量最多的家族^[18]。GTs 主要包括 2 种空间结构: GT-A 和 GT-B, GT1 均采用 GT-B 折叠结构。在植物细胞中, GT1 主要对小相对分子质量的大量生物活性天然产物进行糖基化。通过研究发现, *GeGT1* 属于含有 GT-B 结构的 GT1 家族。*GeGT1* 能够催化天麻素、巴利森苷等多种次生代谢产物的糖基化反应, 并且其通常是生物合成中的最后一步。通过对天麻不同部位化学成分研究表明^[19], 天麻素及 17 种氨基酸和总氨基酸含量大小顺序为花序>茎>根茎, 与 *GeGT1* 在花和茎中的表达模式具有相似性。

在葡萄风信子中, 葡萄糖基转移酶基因在根、鳞茎、叶、花中均有表达, 在花中的表达量最高, 在根、鳞茎和叶中微量表达^[20]; 在地黄中, 地黄糖基转移酶基因主要在叶和根中表达, 在茎中的表达量偏低^[13], 这与本实验得到的 *GeGT1* 基因组织表达特异性结果一致。以上研究表明 *GeGT1* 蛋白在不同植物的不同器官中具有不同的表达模式。本研究中对 *GeGT1* 基因的克隆及生物信息学分析弥补了兰科药用植物天麻 *GeGT1* 基因的空缺, 建立了原核表达体系, 为其在分子水平上的进一步研究奠定物质基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 袁根良, 蒋丽, 殷光玲, 等. 天麻酸枣仁复合胶囊改善睡眠功能的研究 [J]. 食品科技, 2014, 39(1): 62-65.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 126.

- [3] 陈琛, 蔺蓓蓓, 徐尤美, 等. 天麻水提物活性成分分析及其抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 17-22.
- [4] 田孟华, 袁天军, 周瑞, 等. 不同产地及变型天麻有效成分差异性分析 [J]. 中成药, 2020, 42(7): 1824-1829.
- [5] 许廷生, 陆龙存, 黄子冬. 天麻有效成分的药理作用分析与临床应用研究进展 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(21): 133-135.
- [6] Cote J M, Taylor E A. The glycosyltransferases of LPS core: A review of four heptosyltransferase enzymes in context [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): E2256.
- [7] 叶静斯, 窦文芳, 王程. 葡萄柚中糖基转移酶对槲皮素及其类似物催化机制探讨 [J]. 生物技术通报, 2019, 35(7): 121-128.
- [8] Jia K Z, Zhu L W, Qu X D, et al. Enzymatic O-glycosylation of etoposide aglycone by exploration of the substrate promiscuity for glycosyltransferases [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(12): 2718-2725.
- [9] 唐铭袞, 杨燕, 王宇, 等. 杨梅糖基转移酶 UGT71AN1 的克隆与功能鉴定 [J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(5): 385-393.
- [10] 周佩娜, 李阳, 蒲天珍, 等. 霍山石斛 β -1,4-木糖基转移酶 (IRX9) 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1212-1219.
- [11] 张初梅, 何卓儒, 林爽, 等. 布渣叶糖基转移酶 MpUGT1 基因 cDNA 克隆及生物信息学和表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(5): 2137-2143.
- [12] 李媛. 穿心莲糖基转移酶的基因克隆及功能研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [13] 朱昀昊, 董诚明, 李璐, 等. 地黄糖基转移酶基因克隆表达及表达分析 [J]. 中药材, 2018, 41(6): 1297-1301.
- [14] Wen C, Huang W, He M M, et al. Cloning and characterization of a glycosyltransferase from *Catharanthus roseus* for glycosylation of cardiotonic steroids and phenolic compounds [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(1): 135-142.
- [15] 李佳兴, 莫歌, 周良云, 等. 欧洲花楸糖基转移酶基因的全长克隆与表达分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 167-172.
- [16] 童英, 张光云, 段小花, 等. 天麻抗衰老的研究概况 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(4): 42-46.
- [17] Zhan H D, Zhou H Y, Sui Y P, et al. The rhizome of *Gastrodia elata* Blume—An ethnopharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 361-385.
- [18] Tiwari P, Sangwan R S, Sangwan N S. Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: An update on expanding knowledge and Scopes [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5): 714-739.
- [19] 刘继永, 赵卉, 王玉方, 等. 乌美天麻与野生天麻不同部位化学成分对比研究 [J]. 特产研究, 2015, 37(2): 41-44.
- [20] 梁沛雯, 姜倩, 刘雅莉. 葡萄风信子 MaGT1 基因的克隆及其表达分析 [J]. 西北植物学报, 2019, 39(6): 1001-1008.

[责任编辑 时圣明]