

广佛手 UDP-鼠李糖合成酶基因的克隆及功能鉴定

周良云, 蔡启忠, 刘长征, 刘露, 张春荣, 杨全*

广东药科大学中药学院 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室 国家中药材产业技术体系 广州综合试验站, 广东 广州 510006

摘要:目的 对广佛手 *Citrus medica* var. *sarcodactylis* 中参与合成 UDP-鼠李糖的 UDP-鼠李糖合成酶(UDP-rhamnose synthase, RHM) 基因进行全长 cDNA 克隆、功能鉴定及差异表达分析。方法 基于广佛手转录组数据, 筛选和克隆广佛手鼠李糖合成酶基因 (*CmRHM1*) 的全长 cDNA, 并对其进行生物信息学分析; 构建原核表达载体, 通过体外酶促反应鉴定 *CmRHM1* 的功能; 利用实时荧光定量 PCR 分析广佛手不同器官中 *CmRHM1* 基因的表达特性。结果 *CmRHM1* 基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 2007 bp, 编码 668 个氨基酸。该基因编码蛋白的相对分子质量为 75 330、理论等电点是 6.97, 为亲水蛋白, 无信号肽。多重序列比对显示 *CmRHM1* 在序列的 N-端和 C-端均含有高度保守的 2 个结构域 (GxxGxxG/A 和 YxxxK)。体外酶促反应结果表明 *CmRHM1* 蛋白具有催化 UDP-Glc 合成 UDP-Rha 的功能。实时荧光定量结果显示该基因在广佛手的茎、叶和果实中的表达水平依次为叶>果实>茎。结论 *CmRHM1* 基因的功能鉴定为 UDP-鼠李糖及鼠李糖糖苷的生物合成奠定了物质基础。

关键词: 佛手; UDP-鼠李糖合成酶; UDP-鼠李糖; 基因克隆; 功能鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-5005-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.025

Cloning and characterization of a UDP-rhamnose synthase gene from *Citrus medica*

ZHOU Liang-yun, CAI Qi-zhong, LIU Chang-zheng, LIU Lu, ZHANG Chun-rong, YANG Quan

School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University/ Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Production & Development of Cantonese Medicinal Materials/ Comprehensive Experimental Station of Guang zhou, Chinese Materia Medica, China Agriculture Research System, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To clone and characterize a UDP-rhamnose synthase gene involved in the biosynthetic mechanism of UDP-rhamnose for the medicinal plant *Citrus medica*. **Methods** Based on the transcriptome data, the full-length cDNA of UDP-rhamnose synthase gene (*CmRHM1*) was screened and cloned, and then the bioinformatics analysis was carried out. The prokaryotic expression vector was constructed and the function of *CmRHM1* was identified by enzymatic reaction *in vitro*. Additionally, Real-time PCR was performed to analyze the expressive characteristics of *CmRHM1* gene in different plant organs. **Results** The ORF length of *CmRHM1* was 2007 bp, encoding 668 aa. Bioinformatic analysis of the amino acid sequence showed that the molecular weight of encoded protein was 75 330, and theoretical isoelectric point was 6.97. This protein was proved to be a hydrophilic protein without signal peptide sequence. Multiple sequence alignment showed that *CmRHM1* contained two highly conserved domains (GxxGxxG/A and YxxxK) at the N-terminal and C-terminal regions. The enzymatic reaction *in vitro* revealed that *CmRHM1* has indeed been shown to have catalytic activities for converting UDP-glucose into UDP-rhamnose. The results of qPCR showed that the ranking of the expressive level of the *CmRHM1* in the stem, leaf and fruit was leaf > fruit > stem. **Conclusion** The functional identification of *CmRHM1* gene reported here provides the basic foundation for the biosynthesis of UDP-rhamnose and rhamnosides.

Key words: *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle; UDP rhamnose synthase; UDP-rhamnose; cloning; characterization

收稿日期: 2021-02-13

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700704); 2017 年广东省岭南中药材保护资金专项 (粤财社[2017]60 号); 广东省普通高校青年创新人才类项目 (2018KQNCX133)

作者简介: 周良云 (1986—), 男, 讲师。Tel: 18810599924 E-mail: 503712735@qq.com

*通信作者: 杨全, 教授。Tel: (020)39252353 E-mail: yangquan7208@vip.163.com

UDP-鼠李糖 (UDP-Rha) 是合成植物细胞壁主要成分鼠李半乳糖醛酸聚糖-I (rhamnogalacturonan-I, RG-I)、鼠李半乳糖醛酸聚糖-II (rhamnogalacturonan-II, RG-II) 以及各种鼠李糖糖苷类次生代谢产物所必需的重要组成部分之一^[1]。RG-I、RG-II 和半乳糖醛酸聚糖 (homogalacturonan, HG) 是植物细胞壁中主要的 3 种果胶多糖, 它们在维管植物的生长和发育过程中承担着重要的作用。UDP-Rha 常作为糖基供体参与黄酮、三萜、酚类等受体分子的糖基化反应, 最终形成鼠李糖糖苷类次生代谢产物。研究显示, 鼠李糖糖苷类化合物具有抗炎^[2]、抗病毒^[3]、抗氧化^[4]和抗癌^[5]等广泛的生理活性。在自然界中, 鼠李糖至少有 2 种活化形式: dTDP-Rha 和 UDP-Rha^[6-7]。dTDP-Rha 主要分布在细菌中, 而 UDP-Rha 则分布在真菌和植物中。在细菌中, dTDP-葡萄糖 (dTDP-Glc) 经 dTDP-葡萄糖-4, 6-脱水酶 (RmlB)、dTDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖-3, 5-差向异构酶 (RmlC) 和 dTDP-4-酮-L-鼠李糖-4-酮-还原酶 (RmlD) 3 种酶连续催化生成 dTDP-Rha^[8-10]。在真菌中, 由 UDP-葡萄糖-4, 6-脱水酶 (UG4, 6-Dh) 和 UDP-4-酮-6-脱氧-葡萄糖 (UDP-4K6DG) -3, 5-差向异构酶/4-还原酶 2 种酶通过连续 2 步催化反应将 UDP-葡萄糖 (UDP-Glc) 转化生成 UDP-Rha^[11]。在植物中, 胞浆中的 UDP-Glc 在 UDP-鼠李糖合成酶 (RHM) 的作用下进一步生成 UDP-Rha, 该酶具备 UG4, 6-Dh、UDP-4K6DG-3, 5-差向异构酶和 UDP-4KR-4-酮-还原酶 3 种酶的功能^[12]。目前, 已从拟南芥^[12]、杨树^[13]、玉米^[14]等植物中克隆鉴定出相应的 RHM 基因, 而对药用植物中的 RHM 基因研究相对较少^[15]。

佛手为芸香科柑橘属植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实, 具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰之功效, 用于治疗肝胃气滞、胸胁胀痛、胃脘痞满、食少呕吐、咳嗽痰多等病症^[16]。佛手主产于广东、广西、四川、福建、浙江等省, 产于广东和广西的佛手称为“广佛手”。一般认为产于广东肇庆的广佛手质量最优, 为道地药材^[17]。本研究基于广佛手转录组数据, 首先克隆得到 1 条广佛手 RHM 基因 (*CmRHM*) 的全长 cDNA 序列, 并通过原核表达获得重组蛋白。以槲皮素为底物、UDP-Glc 为糖供体, *CmRHM* 和拟南芥 UGT78D1 2 种粗酶混合液为催化反应的酶进行体外酶促反应, 通过检测槲皮素-3-O-鼠李糖苷的生成, 以鉴定

CmRHM 的体外功能。其次, 利用 qRT-PCR 检测 *CmRHM* 在广佛手不同器官的表达水平。*CmRHM* 基因的功能鉴定为 UDP-Rha 及鼠李糖糖苷的生物合成奠定了基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采自于肇庆市德庆县武垄镇云楼村 (N23°20'2", E112°14'16", 海拔 60 m), 经广东药科大学杨全教授鉴定为芸香科植物佛手 *C. medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle, 剪取茎、叶和果实 3 个器官用液氮速冻后置 -80 °C 保存备用。

1.2 仪器

高通量冷冻研磨仪, PowerPac™ Basic 型电泳仪, Tocan240 型凝胶成像仪, Nano-100 型微量分光光度计, C1000 Touch™ Thermal Cycler 型 PCR 仪, CFX96™ Optics Module 型 Real-time PCR 仪, Waters 高效液相色谱仪。

2 方法

2.1 *CmRHM* 的克隆

从 -80 °C 冰箱中取出广佛手样品置入 EP 管中并加入磁珠, 用高通量冷冻研磨仪低温粉碎。总 RNA 的提取参照 RNeasy Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441) 说明操作。使用 Takara 公司的反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser) 进行反转录, 生成单链 cDNA。根据从广佛手转录组数据中筛选的 *CmRHM* 基因序列, 设计 cDNA 全长克隆引物 (引物序列见表 1)。根据 KOD-Plus-Neo 高保真酶说明书配制 PCR 体系: 10×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L MgSO₄ 3 μL, 正反向引物各 2.5 μL, cDNA 1 μL, KOD-Plus-Neo 1 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。反应程序: 94 °C、2 min; 94 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、1 min, 重复 35 个循环; 72 °C、10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 利用 TaKaRa 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。采用无缝克隆试剂盒 (TransGen Biotech, 中国), 将 PCR 产物与经 BamH I 酶切后的 pET-28a 载体连接, 并转化至大肠杆菌 *Trans1-T1* 克隆感受态细胞中, 涂布在含有 50 mg/L Kan 的 LB 固体培养基上过夜培养, 选取单克隆进行菌液 PCR 验证, 并将阳性结果送擎科公司测序验证。

表1 引物名称及序列

Table 1 Name and sequence of primers

名称	引物 (5'-3')	用途
CmRHM1-F1	CAGCAAATGGGTCGCGGAATGGCTACGTATACCCCGAAGAAC	克隆
CmRHM1-R1	ACGGAGCTCGAATTCGACTAGGTTTTCTTGTGGGCTCAAA	克隆
CmRHM1-F2	CCTAATACCCTCCAAAGCATCC	qRT-PCR
CmRHM1-R2	GGACTCGGTGATGAGAAGAAAG	qRT-PCR
CmActin-F	GGTATGGAGTCTGCTGGTATTC	qRT-PCR
CmActin-R	GGAACCGCCACTAAGTACAA	qRT-PCR

2.2 生物信息学分析

将测序得到序列通过 ExPASy ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白相对分子质量和理论等电点; InterPro 在线软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan>) 进行结构域分析, PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 进行二级结构预测和二级结构分析; SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析; TRMHMM server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜域分析; 根据 NCBI BLAST 结果下载同源序列, 分别使用 DNAMAN 软件和 MEGA 5.0 软件进行多重序列比对和系统进化树的构建。

2.3 CmRHM 蛋白体外诱导表达

挑选测序验证后的菌液, 过夜培养, 提取 pET-28a-CmRHM 重组质粒, 转化到 Transetta (DE3) 感受态大肠杆菌中培养。挑取阳性克隆进行 PCR 检测, 并送测序验证表达系统正确性。挑选序列正确菌株扩大培养于 100 mL 含有 50 mg/L Kan 的 LB 液体培养基中, 37 °C 250 r/min 振荡培养至 600 nm 处吸光度 (A_{600}) 值达 0.6~1.0, 加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L, 16 °C、200 r/min 诱导培养过夜。将诱导完的菌液 4 °C、5000×g 离心 10 min, 收集菌体。用预冷的 ddH₂O 清洗菌液 2 次, 菌体悬浮于缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、10%甘油、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟) 中, 超声波细胞破碎机超声破碎 (30%功率, 超声 5 s, 间隔 5 s, 持续 5 min)。破碎后 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 上清即为蛋白粗提物。取蛋白粗提物加入 6×loading buffer 混匀, 沸水浴 5~10 min、12 000×g 离心 5 min, 上样 10 μL 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后将胶置于考马斯亮蓝染色 1 h, 用脱色液进行背景脱色, 检测蛋白表达情况。

2.4 AtUGT78D1 表达载体的构建及原核表达

从 NCBI 网站下载拟南芥 *AtUGT78D1* 基因序列, 提交给苏州泓迅生物科技有限公司合成并连接到 pET-28a 载体上, 构建重组表达载体。将克隆菌株扩大培养, 提取重组质粒, 转化到 Transetta (DE3) 中培养, 挑选阳性克隆菌, 按“2.3”项下的操作进行 *AtUGT78D1* 重组蛋白的体外表达及蛋白提取。

2.5 体外酶促反应与检测

2.5.1 阴性对照品溶液的制备 酶促反应体系总体积为 400 μL: 含 0.5 mmol/L UDP-Glc、0.1 mmol/L 槲皮素、0.5 mmol/L NADPH、0.5 mmol/L NAD⁺ 以及 *AtUGT78D1* 和 CmRHM 粗酶液各 193 μL。以空载表达菌在同等条件下诱导的蛋白粗提物替代 CmRHM 粗酶液进行酶促反应为阴性对照。

2.5.2 供试品溶液的制备 将酶促反应体系在 30 °C 水浴锅中反应过夜, 加入 400 μL 甲醇终止反应, 振摇混匀, 14000×g 离心 20 min, 取上清过 0.22 μm 滤膜, 得到供试品溶液。

2.5.3 对照品溶液的制备 精密称取 12.09 mg 槲皮素, 18.58 mg 槲皮素-3-*O*-葡萄糖, 17.93 mg 槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷分别加入 1 mL DMSO 溶解, 制得各对照品浓度为 40 mmol/L 的母液。吸取母液各 2 μL, 并补足甲醇至 800 μL, 过 0.22 μm 滤膜, 得到浓度为 0.1 mol/mL 的槲皮素、槲皮素 3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素 3-*O*-鼠李糖苷混合对照品溶液。

2.5.4 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ Column (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司), 柱温 30 °C。流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液 (55:45), 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长为 366 nm。

2.6 不同器官 CmRHM 基因的差异表达分析

利用实时荧光定量检测 *CmRHM* 基因在不同组织中的表达水平。冰上配制反应体系 20 μL; 包含 10 μL TBGreen Premix Ex Taq II (2×)、上下游引物

(10 μmol/L) 各 0.8 μL、2 μL cDNA、6.4 μL ddH₂O, 在 CFX96 Touch (Bio-Rad, 美国) 仪上进行扩增。PCR 反应条件: 预变性 (95 °C、30 s); 变性 (95 °C、5 s), 退火和延伸 (60 °C、30 s) 40 个循环; 最后添加熔解曲线设置。相对定量分析采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行计算, 结果采用 GraphPadPrism 7.0 进行数据分析与绘图。

3 结果与分析

3.1 CmRHM 基因全长克隆

以广佛手 cDNA 为模板进行全长克隆, 获得 1 条基因的 PCR 产物约为 2000 bp, 与预期大小相近, 如图 1 所示。将 PCR 产物经纯化后连接到 pET-28a 载体上并转化到大肠杆菌中, 选择阳性克隆菌株送测序公司进行测序。测序结果显示克隆获得的序列长度为 2007 bp, 与转录组数据中的序列一致。该基因编码 668 个氨基酸, 命名为 CmRHM1。

3.2 CmRHM1 基因序列的生物信息学分析

CmRHM1 蛋白的相对分子质量为 75 330、理论等电点为 6.97, 为亲水蛋白。信号肽分析显示无信号肽; 跨膜域分析结果表明 CmRHM1 蛋白为非跨膜蛋白。结构域分析表明: CmRHM1 在 10~315 aa 处含有 NADP (H) 结合位点; 在 384~557 aa 处含有类似 RmlD 酶结构的活性中心。二级结构预测结果显示: CmRHM1 基因编码蛋白的二级结构中无规

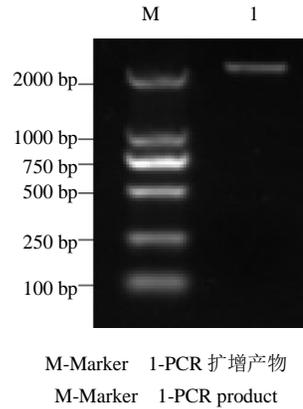


图 1 广佛手 CmRHM 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Cloning of a full length CmRHM gene from *C. medica*

则卷曲占 58.08%, α-螺旋结构占 29.19%, 其中无规则卷曲和 α-螺旋结构是其主要的结构原件。

3.3 CmRHM1 氨基酸序列和系统进化树分析

BLAST 结果显示, CmRHM1 氨基酸序列与甜橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 阿月浑子 *Pistacia vera* L.、川桑 *Morus notabilis* Schneid.、木槿 *Hibiscus syriacus* L. 等 7 种植物的相似度均达到 80% 以上。利用 DNAMAN 软件将其与同源性较高的植物进行氨基酸序列多重比对 (图 2), 结果显示 CmRHM1 氨基酸序列存在 NADP(H) 结合位点 (GXXGXXG/A)

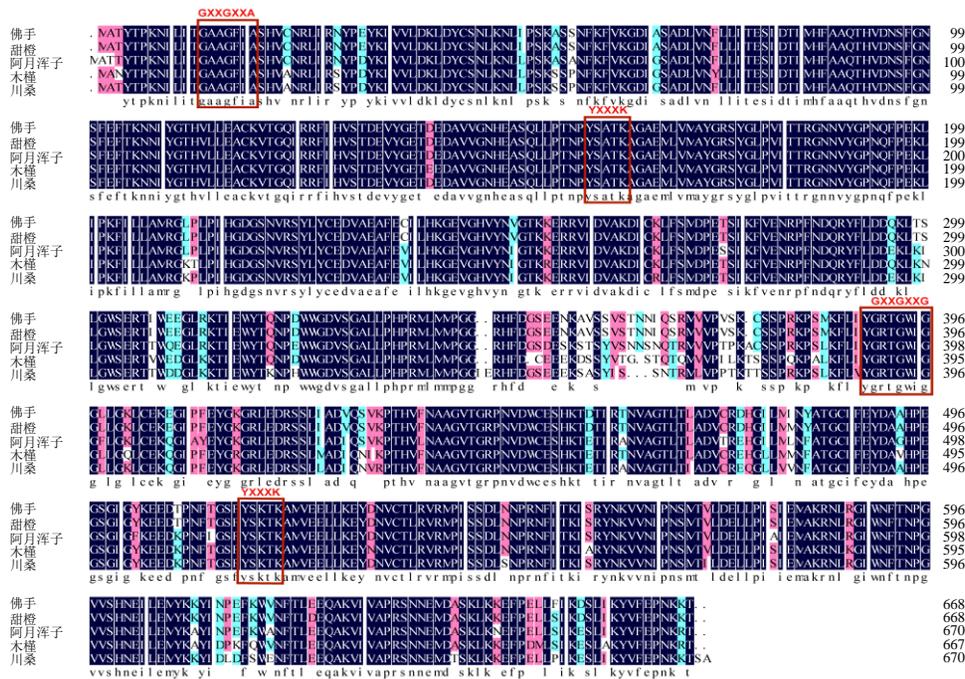


图 2 CmRHM1 序列与其他植物多重序列比对

Fig. 2 Multiple sequences alignment of CmRHM1 and RHM proteins from other plants

和类似 RmlD 酶结构的活性中心 (YXXXX)。结合 InterProScan 结构域分析, CmRHM1 蛋白具有 2 个功能不同的结构域: 具有 UG4,6-Dh 活性的 N 末端域和具有 UDP-4K6DG-3,5-差向异构酶和 UDP-4KR 4-酮-还原酶双功能活性的 C-端区域^[18] (UERs)。为了进一步研究 CmRHM1 蛋白的功能, 在 NCBI 中下载完整 RHM 酶的氨基酸序列和 UDP-4K6DG 3,5-差向异构酶和 UDP-4KR 4-酮-还原酶双功能的酶, 利用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树 (图 3)。结果发现 CmRHM1 与甜橙的亲缘关系最近, 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、陆地棉 *Gossypium hirsutum* L. 等植物的亲缘关系较远。

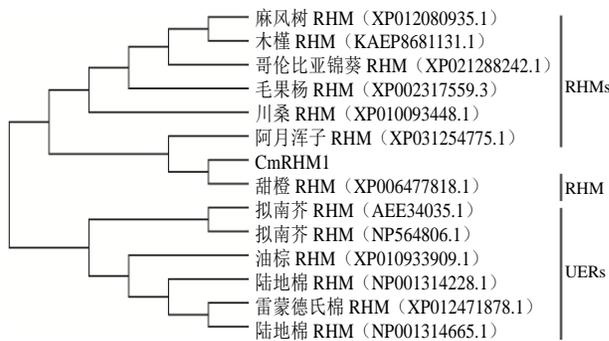
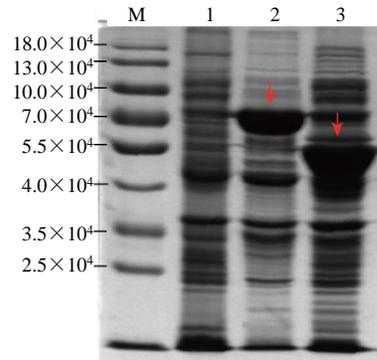


图 3 CmRHM1 系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of CmRHM1

3.4 CmRHM1 与 AtUGT78D1 的原核表达分析

分别构建 pET-28a-CmRHM1 和 pET-28a-AtUGT78D1 重组表达载体, 并转化到 *Transetta* (DE3) 感受态中进行异源表达。SDS-PAGE 电泳结果显示: 与空载相比, pET-28a-CmRHM1 和 pET-28a-AtUGT78D1 在近 70 000 和 55 000 处出现目的蛋白条带, 分别与 CmRHM1 和 AtUGT78D1 预测的蛋白大小基本一致 (图 4)。所以这 2 个蛋白



M-Marker 1-空载 2-CmRHM1 重组蛋白 3-AtUGT78D1 重组蛋白

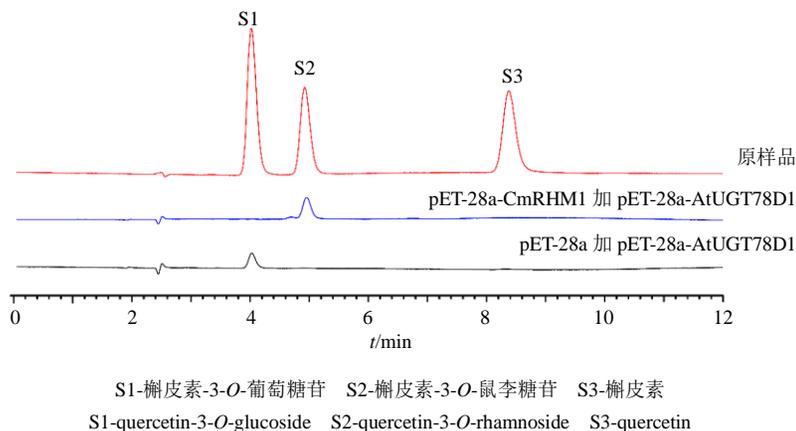
M-Marker 1-empty vector protein 2-recombinant protein of CmRHM1 3-recombinant protein of AtUGT78D1

图 4 CmRHM1 和 AtUGT78D1 重组蛋白 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein of CmRHM1 and AtUGT78D1

条带为诱导表达的 CmRHM1 重组蛋白和 AtUGT78D1 重组蛋白。

3.5 CmRHM1 的体外催化功能

AtUGT78D1 蛋白既能将 UDP-Glc 作为供体对槲皮素进行糖基化生成槲皮素-3-O-葡萄糖苷, 又能将 UDP-Rha 作为供体对槲皮素进行鼠糖基化生成槲皮素-3-O-鼠李糖苷。利用 AtUGT78D1 蛋白的双重糖基化功能, 对 CmRHM1 的生物活性进行体外验证。以槲皮素为底物, UDP-Glc 为糖供体, 在酶促反应体系中加入重组糖苷产物类型来考察 CmRHM1 的功能。其中不添 CmRHM1 的为对照组, 添加重组蛋白 CmRHM1 的为实验组。结果显示 (图 5), 对照组的酶促反应体系在保留时间 4.03 min 处出现明显的色谱峰, 这与标准品槲皮素-3-O-葡萄糖苷 (S1) 的出峰时间相近, 说明体系中有槲皮素-



S1-槲皮素-3-O-葡萄糖苷 S2-槲皮素-3-O-鼠李糖苷 S3-槲皮素
S1-quercetin-3-O-glucoside S2-quercetin-3-O-rhamnoside S3-quercetin

图 5 体外酶促产物的 HPLC 分析

Fig. 5 HPLC analyses of CmRHM1 and AtUGT78D1 enzymatic reaction products

3-*O*-葡萄糖苷的生成；实验组的酶促反应体系仅在 4.95 min 处出现明显的色谱峰，这与槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷（S₂）的出峰时间一致，说明加入重组 CmRHM1 蛋白的酶促反应体系中有 UDP-Rha 的生成，AtUGT78D1 利用体系生成的 UDP-Rha 作为供体对槲皮素鼠李糖基化生成槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷。在本实验中，2 组酶促反应体系均未在 8.38 min(S₃) 处出现色谱峰，说明底物槲皮素均被转化成相应的糖苷。实验结果证明，CmRHM1 在体外具有将 UDP-Glc 转化成 UDP-Rha 的功能。

3.6 不同器官 CmRHM1 基因差异表达分析

利用 qRT-PCR 对广佛手不同器官（茎、叶、果实）中的 CmRHM1 基因进行差异表达分析，结果显示（图 6），CmRHM1 基因在叶中的表达量最高，而在茎中的表达量最低。相对于茎而言，叶中 CmRHM1 基因的相对表达水平为 4.03（ $P < 0.001$ ），果实中 CmRHM1 基因的相对表达水平为 1.36。

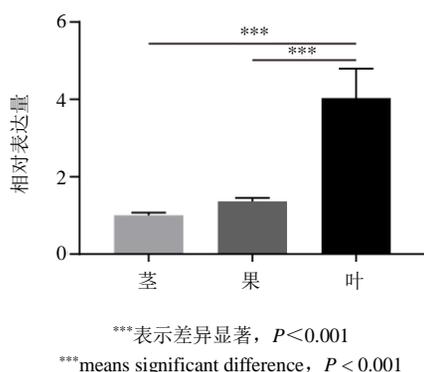


图 6 不同器官 CmRHM1 的差异表达分析

Fig. 6 Differential expression analysis of CmRHM1 gene in different organs

4 讨论

UDP-Rha 是生物合成多糖和鼠李糖糖苷类天然产物的必要组分之一。然而，在植物中，分离并鉴定出与 UDP-Rha 合成相关的基因依然很少。目前，尚未有广佛手中关于 RHM 基因的相关报道，本实验基于转录组数据首次从广佛手中扩增得到 1 条 RHM 基因全长序列，并对其进行了生物信息学的分析。多重序列比对分析显示 CmRHM1 在序列的 N-端和 C-端均含有植物 RHM 中高度保守的 2 个结构域（GxxGxxG/A 和 YxxxK），GxxGxxG/A 是酶促反应辅因子 NADP(H) 结合位点，而辅因子 NAD⁺ 则结合 YxxxK 结构，暗示着 CmRHM1 具有

将 UDP-Glc 转化成 UDP-Rha 的能力。进化分析显示 CmRHM1 与同属植物甜橙的亲缘关系最近，而与拟南芥等植物的亲缘关系相对较远。此外，本研究通过构建表达载体 pET-28a-CmRHM1 并诱导其重组蛋白的表达，并结合拟南芥 AtUGT78D1 具有鼠李糖基化槲皮素生成槲皮素 3-*O*-鼠李糖苷的功能对广佛手的 CmRHM1 功能进行鉴定，进一步证实了 CmRHM1 蛋白具有催化 UDP-Glc 合成 UDP-Rha 的功能。为了考察不同器官中 CmRHM1 基因的表达情况，本研究利用 qRT-PCR 的方法对 CmRHM1 基因在广佛手的茎、叶和果实进行了差异表达分析，结果显示 CmRHM1 基因在茎、叶和果实中的表达水平依次为叶 > 果实 > 茎。

迄今为止，在代谢工程或合成生物学中用于微生物合成 UDP-Rha 的 RHM 基因主要为拟南芥的 RHM2 和 RHM1^[1,19]。本实验从药用植物广佛手中获得了 1 条能一步将 UDP-Glc 转化成 UDP-Rha 的鼠李糖合成酶基因，以期为微生物合成 UDP-Rha 提供候选基因，也为鼠李糖糖苷类次生代谢产物的合成提供物质基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kim B G, Kim H J, Ahn J H. Production of bioactive flavonol rhamnosides by expression of plant genes in *Escherichia coli* [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(44): 11143-11148.
- [2] Rho H S, Ghimeray A K, Yoo D S, et al. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties [J]. *Molecules*, 2011, 16(4): 3338-3344.
- [3] Choi H J, Kim J H, Lee C H, et al. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Antivir Res*, 2009, 81(1): 77-81.
- [4] Hayder N, Bouhleb I, Skandrani I, et al. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-*O*-galactoside and myricetin-3-*O*-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray [J]. *Toxicol in Vitro*, 2008, 22(3): 567-581.
- [5] Diantini A, Subarnas A, Lestari K, et al. Kaempferol-3-*O*-rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth. inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(5): 1069-1072.

- [6] Kamsteeg J, Van Brederode J, Van Nigtevecht G. The formation of UDP-*L*-rhamnose from UDP-*D*-glucose by an enzyme preparation of red campion (*Silene dioica* (L) Clairv) leaves [J]. *FEBS Lett*, 1978, 91(2): 281-284.
- [7] Jiang X M, Neal B, Santiago F, et al. Structure and sequence of the rfb (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2) [J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5(3): 695-713.
- [8] Yoo H G, Kwon S Y, Karki S, et al. A new route to dTDP-6-deoxy-1-talose and dTDP-*L*-rhamnose: DTDP-*L*-rhamnose 4-epimerase in *Burkholderia thailandensis* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(13): 3914-3917.
- [9] Giraud M F, Leonard G A, Field R A, et al. RmlC, the third enzyme of dTDP-*L*-rhamnose pathway, is a new class of epimerase [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(5): 398-402.
- [10] Blankenfeldt W, Kerr I D, Giraud M F, et al. Variation on a theme of SDR. dTDP-6-deoxy-*L*-lyxo-4-hexulose reductase (RmlD) shows a new Mg²⁺-dependent dimerization mode [J]. *Structure*, 2002, 10(6): 773-786.
- [11] Martinez V, Ingwers M, Smith J, et al. Biosynthesis of UDP-4-keto-6-deoxyglucose and UDP-rhamnose in pathogenic fungi *Magnaporthe grisea* and *Botryotinia fuckeliana* [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 879-892.
- [12] Oka T, Nemoto T, Jigami Y. Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* RHM2/MUM4, a multidomain protein involved in UDP-*D*-glucose to UDP-*L*-rhamnose conversion [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5389-5403.
- [13] Kim B G, Jung W D, Ahn J H. Cloning and characterization of a putative UDP-rhamnose synthase 1 from *Populus euramericana* Guinier [J]. *J Plant Biol*, 2013, 56(1): 7-12.
- [14] Casas M I, Falcone-Ferreira M L, Jiang N, et al. Identification and characterization of maize salmon silks genes involved in insecticidal maysin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(6): 1297-1309.
- [15] 刘露, 周良云, 张春荣, 等. 何首乌中 UDP-鼠李糖合成酶基因 FmRHM1/2 的克隆与鉴定 [J]. *药学学报*, 2019, 54(8): 1515-1523.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 178.
- [17] 袁旭江, 林励. 中药佛手不同品种间的研究及其存在问题 [J]. *广州中医药大学学报*, 2002, 19(1): 73-76.
- [18] Yin S, Liu M, Kong J Q. Functional analyses of OcRhS₁ and OcUER1 involved in UDP-*L*-rhamnose biosynthesis in *Ornithogalum caudatum* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 109: 536-548.
- [19] Roepke J, Bozzo G G. Biocatalytic synthesis of quercetin 3-*O*-glucoside-7-*O*-rhamnoside by metabolic engineering of *Escherichia coli* [J]. *Chem Biol Chem*, 2013, 14(18): 2418-2422.

[责任编辑 时圣明]