

• 药材与资源 •

同源建模和分子对接揭示甜菊糖苷糖基化关键酶 SrUGT76G1 的构效关系

张绍山^{1,2,3}, 杨云舒², 吕承承², 陈靳松², 庄艺², 刘圆^{1,3}, 吴卫^{2*}

1. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川 成都 610041

2. 四川农业大学农学院, 四川 成都 611130

3. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225

摘要: 目的 揭示甜菊糖苷糖基化关键酶 SrUGT76G1 的构效关系。方法 采用 RT-PCR 法克隆各甜叶菊 *Stevia rebaudiana* 材料中的 *SrUGT76G1* 变异序列; 采用原核表达系统—大肠杆菌和体外催化反应验证各变异序列功能; 采用 Modeller 9.17 软件对 SrUGT76G1 各变异序列蛋白进行同源建模, 利用 AutoDock Vina 工具进行对接分析。结果 除变异序列 N02 序列和 N03 序列外, 还分别从 110 和 B1188 材料中获取了 2 个变异序列 110-3 序列和 B1188 序列。各变异序列蛋白体外催化反应和催化效率比较分析结果表明, N02 蛋白相较于 UGT76G1 (N01-1, AY345974.1) 活性显著下降, 特别是以甜茶苷、甜菊糖苷 (stevioside, ST) 和莱鲍迪苷 D (rebaudioside D, RD) 为糖基受体底物时, B1188、N03 和 110-3 蛋白对糖苷的糖基化功能已丧失; 同源建模和分子对接分析发现由于各变异序列蛋白中氨基酸残基的改变, 导致翻译形成的蛋白三维空间结构改变, 导致无法完全包裹催化底物。结论 SrUGT76G1 形成的活性口袋能否较好地包裹糖基受体底物是其活性强弱和有无的关键。关键词: 甜叶菊; 甜菊糖苷; SrUGT76G1; 同源建模; 分子对接

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7606-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.023

Characterizing structure-activity relationship of key glycosyltransferase SrUGT76G1 by homologous modeling and molecular docking

ZHANG Shao-shan^{1,2,3}, YANG Yun-shu², LYU Cheng-cheng², CHEN Jin-song², ZHUANG Yi², LIU Yuan^{1,3}, WU Wei²

1. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

3. Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory, Chengdu 610225, China

Abstract: Objective To reveal the structure-activity relationship of SrUGT76G1, which was a key glycosyltransferase involving the glucosylation of steviol glycosides. **Methods** RT-PCR was used to clone the *SrUGT76G1* from different *Stevia rebaudiana* materials. The prokaryotic expression system *Escherichia coli* and *in vitro* catalytic reaction were used to verify the function of the SrUGT76G1 variants. Modeller 9.17 software was used to model the homology of SrUGT76G1 variants, and the docking analysis was performed with AutoDock Vina tool. **Results** In addition to N02 and N03, two variants 110-3 and B1188 were obtained from 110 and B1188 materials respectively. Compared with UGT76G1 (N01-1, AY345974.1), the activity of N02 protein was significantly lower than that of SrUGT76G1, especially using rubusoside, stevioside (ST) and rebaudioside D (RD) as receptor substrates. And the enzyme activities of B1188, N03 and 110-3 variants were lost. Homology modeling and molecular docking analysis showed that the change of amino acid residues in each variant resulted in the change of the three-dimensional structure of the SrUGT76G1 protein, resulting in the failure to completely wrap the substrates. **Conclusion** Whether the active pocket formed by SrUGT76G1 can wrap the receptor substrate well is the key to its activity.

Key words: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.; steviol glycoside; SrUGT76G1; homologous modeling; molecular docking

收稿日期: 2021-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31671757); 西南民族大学人才类 (自科)-引进人才科研启动金资助项目 (16011211073)

作者简介: 张绍山 (1990—), 博士, 助理研究员, 主要从事药用植物栽培、质量评价和次生代谢产物调控研究。E-mail:

1007354550@qq.com

*通信作者: 吴卫, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药用植物次生代谢产物调控研究。E-mail: ewuwei@sicau.edu.cn

甜叶菊 *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. 为菊科 (Asteraceae) 甜叶菊属 *Stevia* L. 多年生草本植物, 为药食两用植物, 主要药食部位为干燥叶片, 是继甘蔗、甜菜之后的第 3 种天然甜味剂^[1-2]。我国目前已成为世界第一大甜叶菊种植国、生产国和出口国, 约占世界市场的 90%^[3]。甜叶菊叶片的甜味主要来源于甜菊糖苷 (stevia glycosides, SGs), 其混合物甜度相当于蔗糖的 250~300 倍, 但所含热量仅为蔗糖的 1/300, 故具有高甜度、低热量等优点^[4-7]。目前, 甜菊糖苷的安全性已得到联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 和世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 等国际组织的认可, 是饮料、食品、医药及日用化工等领域的理想甜味替代剂^[8-11]。我国卫生部于 1985 年和 1990 年分别批准甜菊糖苷作为不限量使用的天然甜味剂和医药用甜味剂辅料^[12]。

甜菊糖苷代谢的糖基化途径中, 糖基转移酶 SrUGT76G1 被鉴定能催化甜菊糖苷形成 1,3- β -D-葡萄糖苷键, 参与包括甜茶苷、甜叶菊苷 B (rebaudioside B, RB)、甜叶菊苷 A (rebaudioside A, RA) 和甜叶菊苷 M (rebaudioside M, RM) 的形成^[13-14]。通过 RNA 干扰、碱基突变、体外酶活性分析、同源建模和分子对接等方法研究 SrUGT76G1 的功能和分子机制, 充分证明了 SrUGT76G1 在甜菊糖苷糖基化步骤中的重要作用。农杆菌介导的瞬时基因沉默降低了 SrUGT76G1 基因的表达, 导致总糖苷含量显著下降, 表明该酶的功能对糖苷含量有很大的作用^[15]。根据氨基酸列相似性对目的蛋白进行同源建模, 并将蛋白和底物进行分子对接, 是一种被证明可以有效识别位于蛋白活性口袋 (底物结合位点) 中目标氨基酸残基的方法^[16-17]。

课题组利用逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 的方法从糖苷含量有差异的不同基因型甜叶菊材料中克隆分析了 SrUGT76G1 基因, 最终获得了该基因的 5 个变异序列 NO1~NO5 序列, 其中 NO1~NO3 序列可形成完整的蛋白结构, 且其功能存在显著差异^[18]。在一定程度上揭示了该基因序列变异导致其蛋白空间构象的改变, 进而导致其催化功能的差异, 但受限于模板蛋白同源性较低 (ID=30%), 无法获取各 SrUGT76G1 变异序列蛋白的高

质量三维构象^[18]。幸运的是, 2019 年底 Yang 等^[19]解析了 SrUGT76G1 (AY345974.1) 蛋白的三维结构, 这为通过同源建模构建各 SrUGT76G1 变异序列的高质量蛋白三维结构提供了保障。因此, 本研究利用已发表的 SrUGT76G1 的 2 个变异序列 NO2 序列和 NO3 序列^[18], 以及利用 RT-PCR 方法从其他甜菊糖苷含量不同的甜叶菊材料中克隆 SrUGT76G1 基因, 分析其序列差异并筛选变异序列; 通过在大肠杆菌系统中表达重组蛋白, 鉴定不同变异序列的功能。在此基础上, 以 SrUGT76G1 (AY345974.1) 为模板蛋白, 采用同源建模和分子对接的方法探究 SrUGT76G1 的构效关系, 以期进一步揭示 SrUGT76G1 基因催化糖苷糖基化的机制并为获取更加高效的 SrUGT76G1 变异序列提供支撑。

1 材料与试剂

1.1 材料

课题组前期研究 SrUGT76G1 基因的 2 个变异序列 NO2 序列和 NO3 序列^[18]。甜叶菊材料经四川农业大学吴卫教授鉴定为甜叶菊 *S. rebaudiana* (Bertoni) Hemsl., 命名为“110”和“B1188”, 材料种植于四川农业大学成都校区实验圃。

1.2 试剂

大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21 (DE3) (TsingKe 公司, 北京); 克隆载体 Pclone007 blunt vector (TsingKe 公司, 北京); 原核表达载体 pET-28a (+) 由本实验室保存; 总 RNA 提取试剂盒-E.Z.N.A.[®] Plant RNA Kit (OMEGA Bio-Tek, 美国); 反转录试剂盒-HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) Kit (Vazyme 公司, 南京); 基因克隆试剂盒-Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme 公司, 南京); 酶切所用酶-BamHI 和 HindIII (Takara 公司, 日本); DNA 胶回收试剂盒-Gel Extraction Kit (100) (OMEGA 公司, 美国); 同源重组试剂盒-ClonExpress[™] II One Step Cloning Kit (Vazyme 公司, 南京); 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒-10%聚丙烯酰胺凝胶电泳预混液试剂盒 (新赛美公司); 50 mg/mL 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 溶液 (Solarbio 公司, 北京)。

2 方法

2.1 RT-PCR 克隆甜叶菊材料中 SrUGT76G1 变异序列

RT-PCR 克隆 SrUGT76G1 及其变异序列筛选参照 Zhang 等^[18]报道相关方法。

2.2 各变异序列功能验证及其催化效率比较

由于 SrUGT76G1 参与糖苷 1,3-β-D-葡萄糖苷键的形成，因此选择双糖苷甜菊双糖苷 (steviolbioside) 和甜茶苷、3 糖苷甜菊糖苷 (stevioside, ST) 以及 5 糖苷莱鲍迪苷 D (rebaudioside D, RD) 分别作为底物，其中甜菊双糖苷理论上可在其 C₁₃ 位的第 1 个和第 2 个葡萄糖基上形成 1,3-β-D-葡萄糖苷键，甜茶苷和 ST 理论上可在其 C₁₃ 和 C₁₉ 位的第 1 个葡萄糖基上形成 1,3-β-D-葡萄糖苷键，RD 理论上可在其 C₁₉ 位的第 1 个葡萄糖基上形成 1,3-β-D-葡萄糖苷键 (图 1)。这 4 种糖苷底物可实现 SrUGT76G1 的各变异序列对糖苷 C₁₃ 和 C₁₉ 催化偏好以及糖基数量对其催化效率影响的考察。

参照 Wang 等 [20] 在比较其克隆到的 3 个 *SrUGT91D2* 变异序列催化效率时所用的方法，即将收集的各 *SrUGT76G1* 变异序列的诱导菌体经 PBS 缓冲液重悬，并经 PBS 稀释至菌体质量浓度为 50 mg/mL，然后准确吸取一定体积的重悬菌液进行破碎，破碎方法一致，以保证获取的重组目的蛋白量一致，破碎液离心后，取 350 μL 上清液，6.25 μL、40 mmol/L 的尿苷二磷酸葡萄糖 (uridine 5'-diphosphoglucose-[glucose-1-3H], UDPG)、75 μL 2.5

mmol/L 的 SGs 于 1.5 mL 离心管中，30 °C、200 r/min 下诱导 1 h，然后立即加入等体积水饱和的正丁醇终止反应并萃取产物，萃取液减压旋干后加入等体积的色谱甲醇溶解，经 0.22 μm 滤膜过滤后按以下高效液相色谱 (HPLC) 法检测：色谱柱 TSKgel Amide-80 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm, TOSOH, 日本)；柱温 40 °C；检测波长 210 nm；流动相体积流量 1.0 mL/min；进样量 10 μL；流动相为二元洗脱体系乙腈 (A)-0.1% 磷酸水 (B)，洗脱梯度：0~5.0 min, 10%~15% B；5.0~16.0 min, 15%~25% B；16.0~22.0 min, 25%~30% B；22.0~40.0 min, 30% B [18]。产物与糖苷标准品进行比较确认，以产物的相对峰面积代表产物的产量，以 SrUGT76G1 (AY345974.1) 催化的产物峰面积为分母，其余变异序列对应的催化产物峰面积为分子，计算各变异序列较 SrUGT76G1 (AY345974.1) 的催化效率。

2.3 变异序列的同源建模及其与甜菊糖苷对接

利用 Yang 等 [19] 解析的 SrUGT76G1 (AY345974.1) 蛋白三维结构，在 PDB 蛋白数据库 (https://www.rcsb.org/) 中下载 PDB 号为“6inh”的 SrUGT76G1，该蛋白复合体包括了底物 (甜茶苷) 和二磷酸尿苷 (uridine diphosphate, UDP)，以该蛋

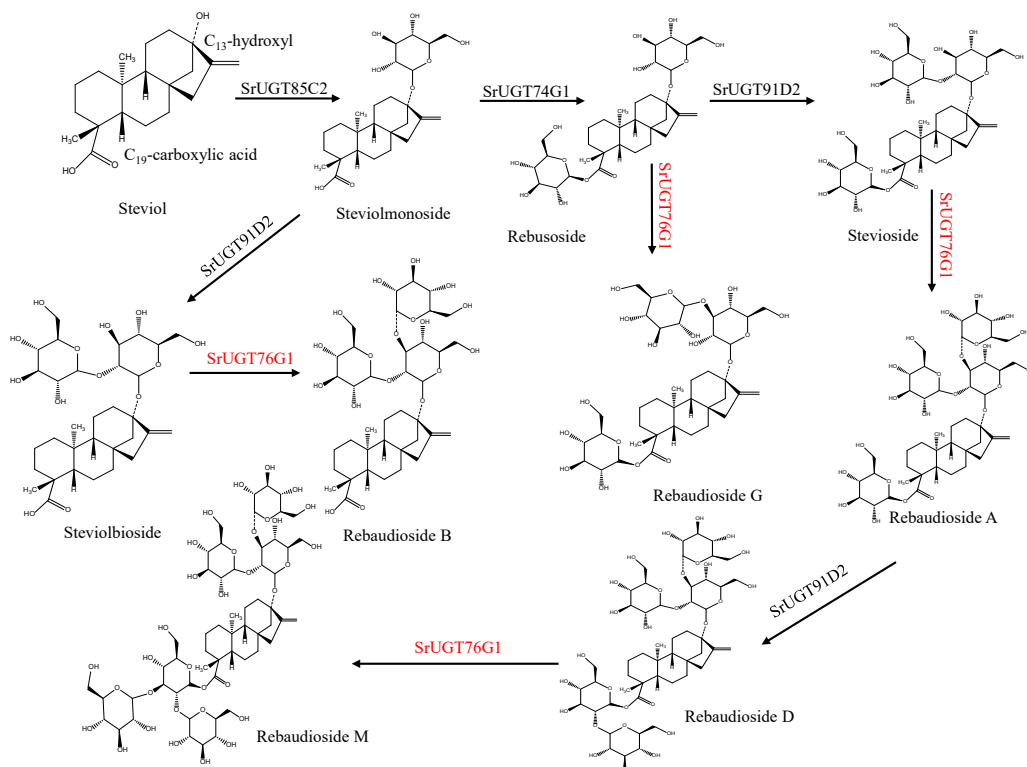


图 1 SrUGT76G1 在甜菊醇糖基化代谢网络中的合成路线

Fig. 1 Steviol and metabolic grid of glucosylated by SrUGT76G1

白的结构为模型，采用 Modeller 9.17 软件对 SrUGT76G1 各变异序列进行同源建模。根据 molpdf、DOPE 和 GA341 potential 评分选择最好的模型。通过在线 (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>) 检查模型的几何形状和质量。甜菊双糖苷、甜茶苷、ST 和 RD 均是 SrUGT76G1 的糖基化底物，其中催化 ST 生成 RA 是最重要的反应，因此分子对接中采用 ST 为糖基受体，利用 Chem3D 软件生成 ST，并优化其三维结构。利用 AutoDock Vina 工具进行对接分析，对接时根据“6inh”中配体的坐标位置来确定配体坐标^[9]。使用 PyMOL 软件对结果进行分析。

3 结果与分析

3.1 SrUGT76G1 基因在 110 和 B1188 材料中序列比较分析

利用特异性引物，通过 RT-PCR 从 110 和 B1188 材料中克隆了 SrUGT76G1 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)。通过构建到 pclone007 blunt vector 后测序，成功获得了 2 份不同基因型材料叶片组织中的 SrUGT76G1，扩增产物大小约为 1.4 kb，与预期一致。

将 2 份材料中获得的 SrUGT76G1 碱基序列与

已研究报道的 SrUGT76G1 (AY345974.1) 的比对分析发现：送测序的 B1188 材料中获得的单克隆，分析发现其中 3 个单克隆序列一致，但较 AY345974.1 序列发生了 109 个碱基的替换，以及在 346 位缺失了“AAGAGG”6 个碱基，在这 115 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)中，没有引起氨基酸翻译的提前终止，用 B1188 序列代表该差异序列；从 110 材料中获得的单克隆测序后发现 1 个单克隆序列较 AY345974.1 序列观察到了 121 个 SNPs，包括在 346 位缺失了“AAGAGG”6 个碱基，但没有导致蛋白翻译提前终止，用 110-3 序列代表该差异序列。

包括课题组前期发表文章中的 2 个变异序列 NO2 序列和 NO3 序列在内，共获得了 4 个能形成完整蛋白的 SrUGT76G1 变异序列，分别是 B1188、110-3、NO2 和 NO3 序列，碱基序列经 NCBI 的 ORFfinder(www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)翻译，进一步确定各变异序列均能形成包括 C 端和 N 端在内的完整蛋白(图 2)。利用 DNAMAN 软件进行序列分析，确定以上各变异序列与 UGT76G1 (AY345974.1) 的核苷酸相似度在 92%~98% (图 3)。

NO1-1(AY345974.1)	R	I	ILQ	K	D	E	L	GM	PII	H	100										
B1188	S	L	MLH	S	N	E	A	SI	PEF	Y	100										
110-3	S	L	MFQ	S	D	E	A	SI	PEF	Y	100										
NO2	R	I	ILQ	K	D	E	L	GM	PII	H	100										
NO3	R	I	MLQ	K	D	V	L	VM	LII	H	100										
NO1-1(AY345974.1)	L	E	EE	T	AL	Y	A	L	M	S	NFH	HV	Q	E	L	P	AS	SAY	N	QIL	200
B1188	V	D	..	T	AL	H	T	I	M	N	TIL	YD	L	D	F	L	VI	SAY	N	QVA	198
110-3	V	D	..	T	AL	H	T	I	M	N	TIL	YD	L	D	F	L	VI	SAY	N	QVA	198
NO2	L	E	EE	T	AL	Y	A	L	M	S	NFH	HV	Q	E	L	P	AS	SAY	N	QIL	200
NO3	L	E	GE	A	QI	Y	T	L	V	S	NFH	HV	Q	E	L	P	AS	CSF	M	KKY	200
NO1-1(AY345974.1)	ILGRMI	V	E	S	L	VI	EI.	A	H	Q	PS	VL	S	.	SEV	R	298				
B1188	IFGRMI	I	Q	P	V	IT	DF.	T	E	T	PN	IV	C	.	SEV	H	296				
110-3	RFGRMI	I	Q	P	V	IT	DFL	T	E	T	PN	IV	C	.	SEV	H	297				
NO2	ILGRMI	V	E	S	L	VI	EI.	A	H	P	SR	VL	S	G	EVL	R	299				
NO3	YFENIT	V	E	S	L	VI	EI.	A	H	P	SR	VL	S	G	EVL	R	299				
NO1-1(AY345974.1)			W	LG	L	W	H	Q	V	398											
B1188			W	VA	I	C	Q	Q	A	396											
110-3			G	VA	I	C	Q	L	A	397											
NO2			W	LG	L	W	H	Q	V	399											
NO3			W	LG	L	W	H	Q	V	399											
NO1-1(AY345974.1)	R	M	E	Q	K	E	L	V	S	Y	I	S	457								
B1188	I	I	K	E	N	E	L	S	Y	I	S	455									
110-3	I	I	K	E	N	V	S	F	L	H	F	I	456								
NO2	R	M	E	Q	K	E	L	V	S	Y	I	S	458								
NO3	R	M	E	Q	K	E	L	V	S	Y	I	S	458								

彩色背景的为各变异序列间的差异残基

The color background is the difference residue between the variants

图 2 各 SrUGT76G1 变异序列的氨基酸序列比较

Fig. 2 Multiple sequence alignment of SrUGT76G1 variants

NO1-I(AY345974.1)					C C	A A	A	C	T	TC	G		T	120		
B1188					A T	T G	G	T	A	GC	T		C	120		
I10-3					A T	T G	G	T	A	GT	G		C	120		
NO2					C C	A A	A	C	T	TC	G		T	120		
NO3					C C	A A	A	T	A	GC	G		C	120		
NO1-I(AY345974.1)						AA					G	A	C	240		
B1188						TC					A	A	T	240		
I10-3						TC					G	A	T	240		
NO2						AA					G	A	C	240		
NO3						AA					G	T	C	240		
NO1-I(AY345974.1)	T	CTC	GG	G	C A A	C	T			T		A	ANGAGG	360		
B1188	A	GCG	AG	C	C T T	T	A			G		T	354		
I10-3	A	GCG	AG	C	C T T	T	A			G		T	354		
NO2	T	CTC	GG	G	C A A	C	T			T		A	ANGAGG	360		
NO3	T	CTC	GT	G	T A A	C	T			T		A	GAGAGG	360		
NO1-I(AY345974.1)	A G	GCTC	T C	G				C	A	G	ATT	A	AC	T	A	480
B1188	A G	GCTC	C T	A				A	A	A	CCA	T	TT	A	T	474
I10-3	A G	GCTC	C T	A				A	A	A	CCA	T	TT	A	T	474
NO2	A G	GCTC	T C	G				C	A	G	ATT	A	AC	T	A	480
NO3	G C	CAGA	T C	A				C	G	G	ATT	A	AC	T	A	480
NO1-I(AY345974.1)		G	C	C			C G		A	C	C	GCG A	AC	C	AT CT	600
B1188		T	T	T			T T		A	C	C	GCG A	AC	C	GT GC	594
I10-3		T	T	T			T T		A	C	C	GCG A	AC	C	GT GC	594
NO2		G	C	C			C G		A	C	C	GCG A	AC	C	AT CT	600
NO3		G	C	C			C G		G	T	G	AGT T	TG	A	AA TA	600
NO1-I(AY345974.1)	ATA	A G	G G	TA			G C	A	G	T T	C	TG	T	GA	... G T	717
B1188	ATA	C G	G G	TA			A A	G	C	C C	G	GA	C	CT	... A A	711
I10-3	AGA	C G	G G	TA			A A	G	C	C C	G	GA	C	CT	TCC A A	714
NO2	ATA	A G	G G	TA			G C	A	G	T T	C	TG	T	GA	... G T	717
NO3	TAT	C A	C T	CG			G C	A	G	T T	C	TG	T	GA	... G T	717
NO1-I(AY345974.1)		T	C C	G		T C		C C		CA		C	ANG	GG	C G	837
B1188		C	T A	A		A A		GA		AC		C	GRA	TA	G T	831
I10-3		C	T A	A		A A		GA		AC		C	GRA	TA	G T	834
NO2		T	C C	G		T C		C C		CC		T	ACG	GG	C G	837
NO3		T	C C	G		T C		C C		CC		T	ACG	GG	C G	837
NO1-I(AY345974.1)	A	TAC	G	...			G		C							954
B1188	T	CAC	G	...			A		T							948
I10-3	T	CAC	G	...			A		T							951
NO2	A	TGG	C	TAC			G		C							957
NO3	A	TGG	C	TAC			G		C							957
NO1-I(AY345974.1)	GT		A	T	GT	A		A G A	C			A C	C G	T C		1074
B1188	AT		T	G	CC	G		G A G	A			C T	C C	G C		1068
I10-3	AG		T	G	CC	G		G A G	A			C T	T C	G T		1071
NO2	GT		A	T	GT	A		A G A	C			A C	C G	T C		1077
NO3	GT		A	T	GT	A		G G A	C			A C	C G	T C		1077
NO1-I(AY345974.1)		G							A				T			1194
B1188		A							A				C			1188
I10-3		A							T				C			1191
NO2		G							A				T			1197
NO3		G							A				T			1197
NO1-I(AY345974.1)						G	G	T	G	C						1314
B1188						T	T	C	A	G						1308
I10-3						T	T	C	A	G						1311
NO2						G	G	T	G	C						1317
NO3						G	G	T	G	C						1317
NO1-I(AY345974.1)																1376
B1188	G	T G	C		GA	AG										1370
I10-3	T	C A	T		GA	TA										1371
NO2	T	C A	T		..	AG										1379
NO3	G	T G	C		GA	AG										1379
NO3	G	T A	C		GA	AG										1379

彩色背景的为各变异序列间差异碱基

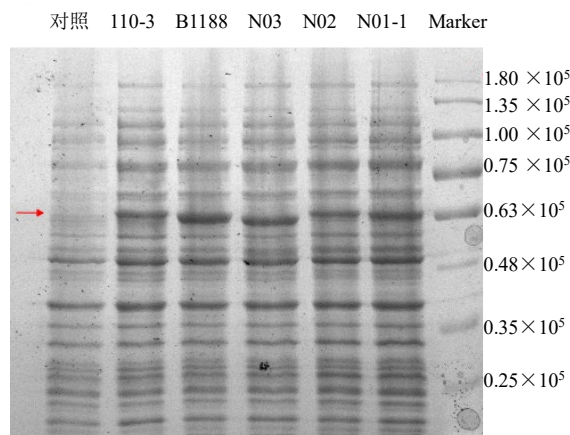
The color background is the difference base between the variants

图 3 各 *SrUGT76G1* 变异序列的核苷酸序列比较

Fig. 3 Multiple sequence alignment of *SrUGT76G1* variants

3.2 SrUGT76G1 变异序列的功能及催化效率比较分析

各 SrUGT76G1 变异序列菌体破碎离心后上清液的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测重组目的蛋白表达情况结果见图4, 由图可得各变异序列均成功诱导表达出重组目的蛋白。具有催化活性的变异序列破碎液催化双糖苷 steviobioside 和甜茶苷、3 糖苷 ST 和 5 糖苷 RD 的 HPLC 色谱图见图 5, 由于无法购得瑞鲍迪苷 (rebaudioside G, RG), 参照其同分异构体 RB 苷的保留时间对其进行确认。由图可知, N01-1 蛋白和 N02 蛋白均可催化 steviobioside 形成 RB 苷和 ST 形成 RA, N01-1 蛋白可催化甜茶苷形成 RD 和催化 RD 形成少量的 RM, 而 N02 蛋白催化甜茶苷和 RD 的产物中没有检测到对应产物; N01-1 蛋白催化甜茶苷的产物中, 仅检测到了 C₁₃ 位



箭头指示重组目的蛋白

The arrow indicates the recombinant target protein

图4 各 SrUGT76G1 变异序列菌体破碎离心后的上清液中重组目的蛋白的 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 4 SDS-PAGE of supernatant of recombinant protein after fragmentation and centrifugation of SrUGT76G1 mutants

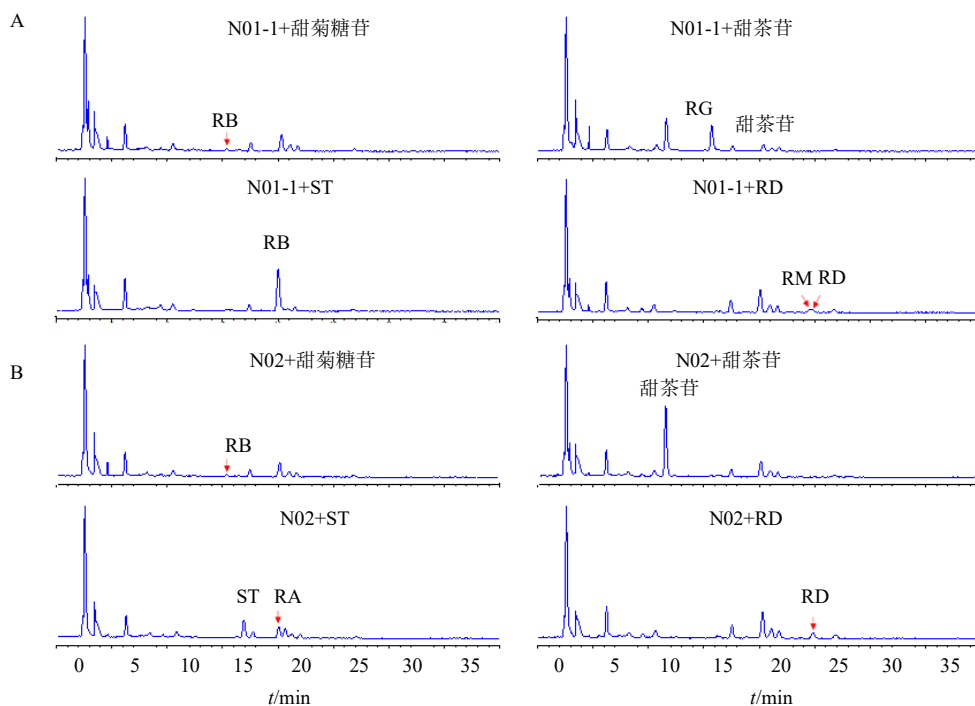


图5 N01-1 (A) 和 N02 (B) 重组蛋白分别与各糖苷底物催化反应的 HPLC 检测结果

Fig. 5 HPLC of reaction products from recombinant protein of N01-1 (A)+SGs and N02(B)+SGs

糖基化的 RD, 而 C₁₉ 位糖基化的产物没有检测到, 在催化 ST 的产物中也发现了同样的现象即没有检测到 C₁₉ 位进一步糖基化的产物; 而 N03、110-3 和 B1188 蛋白均没有检测到对所用糖苷底物的催化活性。具有催化功能的 N01-1 和 N02 蛋白催化 4 种底物的催化效率分析结果见表 1, 可以看出, N02 和 N01-1 蛋白催化 steviobioside 的效率无显著差异, 而 N02 蛋白催

化 ST 的效率显著低于 N01-1 蛋白。

3.3 同源建模及分子对接揭示 SrUGT76G1 变异序列功能差异

为了解这些氨基酸缺失、替换如何影响糖基化过程, 导致酶活性的差异, 对 SrUGT76G1 同拷贝进行了同源建模, 并将这些模型与糖基受体底物 ST 进一步对接分析。结果显示 SrUGT76G1 变异序列

表 1 SrUGT76G1 各变异序列重组蛋白催化各糖苷底物的相对催化效率

Table 1 Relative catalytic efficiency of the recombinant protein of SrUGT76G1 variants towards to SGs

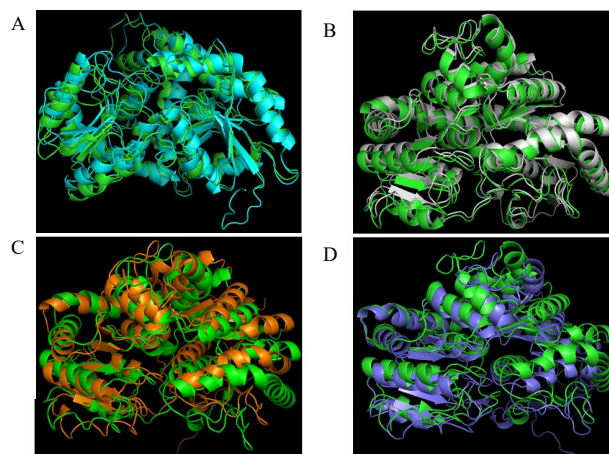
变异序列	双糖苷→RB		甜茶苷→RG		莱鲍迪苷→RA		RD→RM	
	产物相对峰面积	相对催化效率/%	产物相对峰面积	相对催化效率/%	产物相对峰面积	相对催化效率/%	产物相对峰面积	相对催化效率/%
N01-1	40.2	1	403.9	1	681.7	1	25	1
N02	38.1	95	-	-	213.3	32	-	-
N03	-	-	-	-	-	-	-	-
110-3	-	-	-	-	-	-	-	-
B1188	-	-	-	-	-	-	-	-

“-”表示没有检测到

“-” means no detection

蛋白的三级结构包括典型的由 β 折叠和 α 螺旋构成的面对面的 2 个 Rossmann 结构域，这是 GT-B 折叠型糖基转移酶的特征。将这 4 个 SrUGT76G1 变异序列的模型结构与建模模板进行叠加，表明 C-末端的三级结构高度保守；N-端区域变化更大，说明它负责结合多变的底物受体。此外，4 个变异序列的模型叠加后发现：N02 蛋白与模板蛋白 SrUGT76G1 (AY345974.1) 即 N01 蛋白叠加后二者除部分 β 折叠和 loop 区外，其余部分几乎能完全叠加，特别是在 C 端，这与二者均有催化活性一致；无催化活性的 N03 蛋白和 SrUGT76G1 (AY345974.1) 叠加后除少部分非活性口袋处有 loop 区外，其余部位亦能良好的重叠；110-3 蛋白和 SrUGT76G1 (AY345974.1) 叠加后可看出它们间重叠性较差，特别是在 N 端，且不能正确折叠的 loop 区更多，说明较 SrUGT76G1 (AY345974.1) 其蛋白构型发生了显著的变化，这与该变异序列的蛋白无糖苷催化活性一致；B1188 蛋白和 SrUGT76G1 (AY345974.1) 叠加后可看出它们间的重叠性也较差，同样的在 N 端的重叠性最差，以及不能正确折叠的 loop 区更多，说明较 SrUGT76G1 (AY345974.1) 其蛋白构型也发生了显著的变化，这与该变异序列的蛋白无糖苷催化活性一致（图 6）。

在 Yang 等^[20]的研究中，由于去质子化的甜菊糖苷对 UDPG 的亲核反应太快，只能结晶到含糖苷底物和 UDP 的 SrUGT76G1 晶体，但 UDP 的三维坐标仍然能反应出 UDPG 在该蛋白中的结合情况。因此，进一步将构建好的各变异序列的蛋白模型与 ST 和 UDP 对接分析，结果显示，各变异序列的活性口袋均有明显差异，且差异的大小与氨基酸序列相似性趋势一致，特别是结合 ST 的活性口袋差异巨大，具体差异和分析如下：N01-1 蛋白与 ST



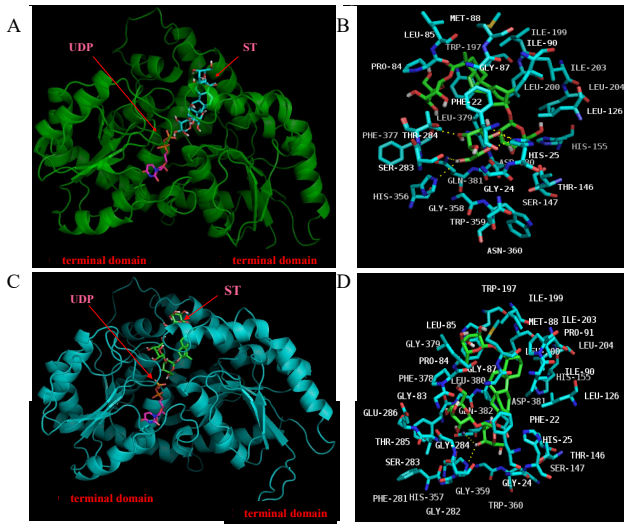
绿色为 SrUGT76G1 (6INH)、青色为 N02、灰色为 N03、菊红色为 110-3、天蓝色为 B1188

Green represents SrUGT76G1 (6INH), cyan represents N02, gray represents N03, chrysanthemum red represents 110-3 and sky blue represents B1188

图 6 同源建模构建的蛋白模型叠加

Fig. 6 Composition of protein models constructed by homologous modeling

和 UDP 对接后可以看到 N01-1 蛋白形成的活性口袋较好地包裹了配体和底物，且底物反应基团的位置在同一个方向（图 7-A），对识别 ST 底物的活性口袋分析，可以看到 F22、P84、L85、G87、M88、I90、L126、W197、I199、L200、I203 和 L204 构成的疏水口袋包裹着 ST 的甜菊醇母核和 C19 羧基上的葡萄糖基，而 S283、T284、H356 和 H25 与 C₁₃ 上的葡萄糖基形成了直接的相互作用，将 ST_{C13} 位上的反应基团锚定在于 UDPG 糖基供体中葡萄糖基相同的方向，从而让糖基化反应顺利进行（图 7-B）；N02 蛋白与 ST 和 UDP 对接后可以看到 N02 蛋白形成的活性口袋亦较好的包裹了配体和底物，且底物反应基团的位置也在同一个方向（图 7-C），对



A-N01-1 蛋白与 ST 和 UDP 对接后整体结构图 B-A 图中识别 ST 底物的活性口袋 C-N02 蛋白与 ST 和 UDP 对接后整体结构图 D-C 图中识别 ST 底物的活性口袋

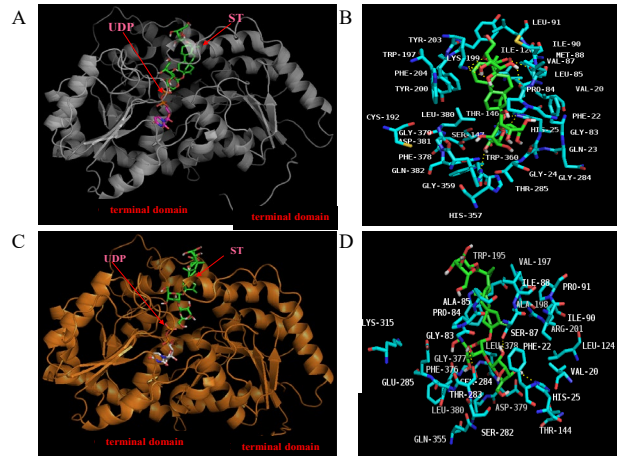
A-Overall structure of N01-1 protein after docking with ST and UDP B-active pocket of recognizing ST in A C-Overall structure of N02 protein after docking with ST and UDP D-The active pocket of recognizing ST in C

图 7 N01-1 蛋白和 N02 蛋白分子对接结果

Fig. 7 Molecular docking result of N01-1 protein and N02 protein

识别 ST 底物的活性口袋分析，可以看到 F22、P84、L85、G87、M88、I90、L126、W197、I199、L200、I203、L204 和 G379 构成的疏水口袋包裹着 ST 的甜菊醇母核和 C19 羧基上的葡萄糖基，这与 N01-1 蛋白的情况一致，而 H357 和 Q382 与 C₁₃ 上第 1 个葡萄糖基 C₄ 上的羟基形成了直接的相互作用，将 ST_{C₁₃} 位上的反应基团（第 1 个葡萄糖基 C₃ 上的羟基）锚定在于 UDPG 糖基供体中葡萄糖基相同的方向，从而让糖基化反应顺利进行（图 7-D）；N03 蛋白与 ST 和 UDP 对接后，可以看到 N03 蛋白形成的活性口袋仍然能较好的包裹配体和底物，且底物反应基团的位置也在同一个方向（图 8-A），对识别 ST 底物的活性口袋分析，可以看到相比具有催化活性的 N01-1 和 N02 蛋白，N03 蛋白由于氨基酸替换后不再构成疏水性的口袋，其中 K199 侧链上的氨基以及 L85 和 M88 中羧基上的羰基与 ST C₁₉ 位羧基上的葡萄糖基形成了氢键，这可能导致了 ST 不能转动，从而无法与 UDPG 完成糖基化反应（图 8-B）；110-3 蛋白与 ST 和 UDP 对接后，可以看到虽然 ST 和 UDPG 底物反应基团的位置仍然在同一个方向，但 110-3 蛋白形成的活性口袋已经不能完整的包裹底物，ST 中 C₁₉ 位上的葡萄糖已经裸露在

蛋白外面（图 8-C），对识别 ST 底物的活性口袋分析，可以看到 110-3 蛋白由于疏水性的口袋不能完整包裹 ST，导致了 ST 与 UDPG 的距离较具有催化活性的 N01-1 和 N02 蛋白的更远，这可能导致了 C₁₃ 位上的葡萄糖基无法与 UDPG 完成糖基化反应（图 8-D）；B1188 蛋白与 ST 和 UDP 对接后，可以看到 ST 的位置发生了显著的变化，ST 中 C₁₃ 位上的参与糖基化的葡萄糖基已经远离了 UDPG（图 9-A），对识别 ST 底物的活性口袋分析，可以看到构成疏水口袋的残基较之前的已经发生了显著变化，导致口袋的形状和大小也发生改变，最

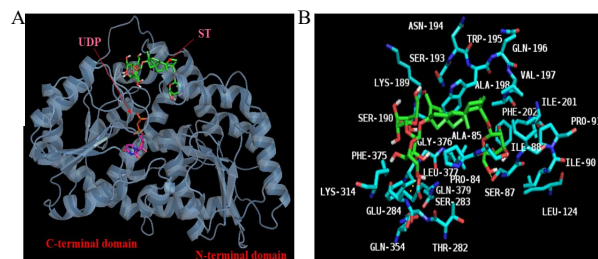


A-N03 蛋白与 ST 和 UDP 对接后整体结构图 B-A 图中识别 ST 底物的活性口袋 C-110-3 蛋白与 ST 和 UDP 对接后整体结构图 D-C 图中识别 ST 底物的活性口袋

A-Overall structure of N03 protein after docking with ST and UDP B-The active pocket of recognizing ST in A C-Overall structure of 110-3 protein after docking with ST and UDP; D-The active pocket of recognizing ST in C

图 8 N03 蛋白和 110-3 蛋白分子对接结果

Fig. 8 Molecular docking result of N03 protein and 110-3 protein



A-与 ST 和 UDP 对接后整体结构图 B-A 图中识别 ST 底物的活性口袋

A-Overall structure after docking with ST and UDP B-The active pocket of recognizing ST

图 9 B1188 蛋白分子对接结果

Fig. 9 Molecular docking result of B1188 protein

终导致 ST 仅能在 S87 和 E284 极性相互作用下固定在活性口袋口, 这可能导致了该变异序列的蛋白活性丧失 (图 9-B)。

4 讨论

各 SrUGT76G1 变异序列的体外糖苷催化结果说明, SrUGT76G1 是一个可识别多种糖苷底物的酶, 氨基酸序列的改变对其功能有重要影响, 其对各底物的催化偏好依赖于糖苷中糖基化基团的位置和糖苷上糖基的数量, 具体表现为更偏好糖基化 C13 位羟基上的第 1 个葡萄糖, 更偏好糖基化糖基数目相对较少的糖苷。N02 蛋白对已连有 1,2- β -D-葡萄糖基的糖苷 (甜菊双糖苷和 ST) 仍具有催化活性, 而对没有 1,2- β -D-葡萄糖基的糖苷 (甜茶苷和 RD) 则丧失了活性, 说明 SrUGT76G1 更偏好糖基化已连有 1,2- β -D-葡萄糖基的糖苷, 这与 Kishore 等^[14]和 Houghton-Larsen 等^[21]的研究结果一致。此外, 也说明甜叶菊中 SrUGT76G1 (AY345974.1) 是经长期进化和自然选择的具有高效催化效率的序列。

据前人对甜叶菊中 SrUGT76G1 基因的序列分析研究结果, 该基因在甜叶菊存在着广泛的序列变异, 且这些变异对该基因的功能有显著影响^[22], 这与本研究中由于序列的差异导致 N02、N03、110-3 和 B1188 等蛋白活性丧失一致。本研究中变异序列 N01-1、N02 和 N03 蛋白氨基酸序列相似度较高, 但功能差异较大, 其中 N01-1 (AY345974.1) 蛋白和 N02 蛋白对于 steviobioside 和 ST 具有相同的功能, 说明 N03、110-3 和 B1188 酶活性丧失的主要原因可能不是 N0-1 和 N02 序列中的 SNPs 引起。在分子对接分析中, 构成 SrUGT76G1 疏水口袋的残基是否有极性的变化, 残基的差异是否导致活性口袋的形状和大小改变, 活性口袋是否能较好的包裹糖基受体底物是该酶能否催化糖苷糖基化的关键; SrUGT76G1 酶活的有无与强弱受蛋白的整体结构影响更大, 可能单个残基的改变不会显著提高其催化效率, 但却可能导致其活性的丧失。2016 年 Olsson 等^[13]利用其他物种中已解析三维结构的糖基转移酶和 SrUGT76G1 的氨基酸序列, 构建了 SrUGT76G1 的蛋白模型, 与糖苷底物和 UDPG 对接分析后识别到了 49 个活性口袋的氨基酸残基, 进一步构建了一个包含 1748 个 SrUGT76G1 变异序列库, 酶活验证后鉴定出了一些关键残基。充分证明利用同源建模和分子对接技术能较好的预测和揭示甜叶菊

SrUGT76G1 蛋白的三维空间结构和构效关系。

综上所述, 本研究基于功能有差异的各 SrUGT76G1 变异序列, 采用同源建模和分子对接的方法揭示了其结构和功能之间的关系, 这为今后通过分子设计来改变其空间结构, 从而获取高效变异序列积累了一定的科学数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yadav A K, Singh S, Dhyani D, et al. A review on the improvement of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)] [J]. *Can J Plant Sci*, 2011, 91(1): 1-27.
- [2] 万会达, 李丹, 夏咏梅. 甜菊糖苷类物质的功能性研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(17): 264-269.
- [3] 王亚平, 李世光, 赵金庆, 等. 中国甜菊糖产业现状及其应对 [J]. *对外经贸*, 2013(10): 4-6.
- [4] Bondarev N I, Sukhanova M A, Reshetnyak O V, et al. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny [J]. *Biol Plant*, 2003, 47(2): 261-264.
- [5] 赵兴华, 张全香, 苑晓威, 等. 大孔吸附树脂纯化甜菊糖苷的工艺研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1971-1974.
- [6] Brahmachari G, Mandal L C, Roy R, et al. Stevioside and related compounds-molecules of pharmaceutical promise: A critical overview [J]. *Arch Pharm: Weinheim*, 2011, 344(1): 5-19.
- [7] Jeppesen P B, Gregersen S, Alstrup K K, et al. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: Studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(1): 9-14.
- [8] Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, et al. Analysis of anti-Rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana* [J]. *Antiviral Res*, 2001, 49(1): 15-24.
- [9] Hong J, Chen L, Jeppesen P B, et al. Stevioside counteracts the alpha-cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(3): E416-E422.
- [10] Shukla S, Mehta A, Mehta P, et al. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(7/8): 807-811.
- [11] Adebisi O E, Olayemi F O, Tan N H, et al. *In vitro* antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia* [J]. *Beni - Suef Univ J Basic Appl Sci*, 2017, 6(1): 10-14.
- [12] Jeppesen P B, Gregersen S, Alstrup K K, et al. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: Studies in the diabetic

- Goto-Kakizaki (GK) rats [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(1): 9-14.
- [13] Olsson K, Carlsen S, Semmler A, *et al.* Microbial production of next-generation *Stevia* sweeteners [J]. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 207.
- [14] Mao G H, Yu X D. Recombinant production of steviol glycosides: US, 10081826 [P]. 2018-09-25.
- [15] Guleria P, Yadav S K. *Agrobacterium* mediated transient gene silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: Insights into steviol glycoside biosynthesis pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74731.
- [16] Osmani S A, Bak S, Imberty A, *et al.* Catalytic key amino acids and UDP-sugar donor specificity of a plant glucuronosyltransferase, UGT94B1: Molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(3): 1295-1308.
- [17] Hans J, Brandt W, Vogt T. Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dortheanthus bellidiformis* [J]. *Plant J*, 2004, 39(3): 319-333.
- [18] Zhang S S, Chen H, Xiao J Y, *et al.* Mutations in the uridine diphosphate glucosyltransferase 76G1 gene result in different contents of the major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 162: 141-147.
- [19] Yang T, Zhang J Z, Ke D, *et al.* Hydrophobic recognition allows the glucosyltransferase UGT76G1 to catalyze its substrate in two orientations [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3214.
- [20] Wang J F, Li S Y, Xiong Z Q, *et al.* Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for de novo biosynthesis of steviolglycosides sweetener in *Escherichia coli* [J]. *Cell Res*, 2016, 26(2): 258-261.
- [21] Houghton-Larsen J, Hicks P M, Naesby M, *et al.* Recombinant production of steviol glycosides, US Patent WO 2013/022989 A2.
- [22] Yang Y H, Huang S Z, Han Y L, *et al.* Base substitution mutations in uridinediphosphate-dependent glycosyltransferase 76G1 gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A: Mutations in UGT76G1, a key gene of steviol glycosides synthesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 80: 220-225.

[责任编辑 时圣明]