

## 鸢尾糖基转移酶编码基因 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 克隆及特性研究

张李兵, 李 静, 陶无恙, 黄梓璐, 陈嘉杰, 段礼新, 季爱加\*

广州中医药大学 中药学院国际中医药转化医学研究所, 教育部中医药防治肿瘤转化医学研究国际合作联合实验室, 广东省中医药防治肿瘤转化药学研究重点实验室 广东 广州 510000

**摘要:** 目的 克隆获得鸢尾 *Iris tectorum* 糖基转移酶基因 *ItUGT349* 和 *ItUGT419*, 并对其生物信息学分析、基因差异表达检测和蛋白原核表达等特性分析。方法 以鸢尾转录组中筛选到的 *ItUGTs* 基因全长开放阅读框 (open reading frame, ORF) 设计特异性引物, 进行 PCR 扩增, 经测序后获得基因序列并进行生物信息学分析; 通过荧光定量 PCR (real-time PCR, qRT-PCR) 进行基因差异表达检测; 最后构建 pET-32a (+) 原核表达载体在大肠杆菌中表达蛋白。结果 PCR 扩增 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 的 ORF 长度分别为 1461、1488 bp, 编码蛋白相对分子质量大小分别为 53 830、54 910。荧光定量 PCR 显示, *ItUGT349* 的表达量在叶片中最高, 而 *ItUGT419* 在花器官中表达最高。进化树表明, *ItUGT419* 与三萜类糖基转移酶聚类在一起, *ItUGT349* 与三萜、黄酮和木质素等多种类型的糖基转移酶聚类到一支。*ItUGT349* 和 *ItUGT419* 在大肠杆菌中均成功的表达出可溶性蛋白。结论 通过 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 基因全长 ORF 克隆, 并对其序列分析, 基因差异表达检测及原核表达等研究, 为后续进一步鉴定其催化功能奠定基础。

**关键词:** 鸢尾; 糖基转移酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达; qRT-PCR

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)01-0254-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.027

## Genes clone and features analysis of glycosyltransferase genes *ItUGT349* and *ItUGT419* from *Iris tectorum*

ZHANG Li-bing, LI Jing, TAO Wu-yang, HUANG Zi-lu, CHEN Jia-jie, DUAN Li-xin, JI Ai-jia

Guangdong Provincial Key Laboratory of Translational Cancer Research of Chinese Medicines, Joint International Research Laboratory of Translational Cancer Research of Chinese Medicines, International Institute for Translational Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

**Abstract: Objective** To clone the glycosyltransferase genes *ItUGT349* and *ItUGT419* from *Iris tectorum* and conduct bioinformatics analysis, gene differential expression analysis and protein prokaryotic expression analysis. **Methods** Gene-specific primers were designed based on the open reading frame (ORF) of *ItUGTs*, which were screened from the transcriptome data; And the gene products were obtained by PCR amplification. After sequencing identification, bioinformatics analysis was performed. Moreover, the different expression of both genes among various tissues were detected by real-time qPCR. Finally, the target gene was constructed into the prokaryotic expression vector pET-32a (+) and the soluble proteins were obtained in *Escherichia coli*. **Results** The length of open reading frame (ORF) of *ItUGT349* and *ItUGT419* were 1461 bp and 1488 bp, respectively; And the molecular weight of the encoding proteins were 53 830 and 54 910. The fluorescence quantitative PCR results showed that the expression level of *ItUGT349* was highest in leaves, while *ItUGT419* was highly expressed in flowers. The phylogenetic tree showed that *ItUGT419* was clustered with the UGTs, which were related to triterpene biosynthesis; And *ItUGT349* was clustered with the UGTs, which were involved in the biosynthesis of triterpene, flavonoids and lignin. Finally, *ItUGT349* and *ItUGT419* were successfully expressed in *E. coli*. **Conclusion** The full-length ORF cloning, sequences analysis, differential gene expression detection and prokaryotic expression of *ItUGT349* and *ItUGT419* lay a foundation for the subsequent identification of their catalytic function in *I. tectorum*.

**Key words:** *Iris tectorum* Maxim.; glycosyltransferase; gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression; qRT-PCR

收稿日期: 2022-05-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82003895); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019A1515110594, 2020A1515010926); 广东省级大学生创新训练项目 (S202110572094, S202110572055)

作者简介: 张李兵, 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物功能基因组学。

\*通信作者: 季爱加, 女, 副研究员, 药用植物功能基因组学。E-mail: ajji@gzucm.edu.cn

鸢尾科植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 广泛分布于世界各地, 具有悠久的民间用药历史, 其主要化学成分黄酮类和三萜类化合物对多种疾病如癌症、炎症及病毒感染等均具有很好的疗效, 具有极高的药用价值, 《中国药典》2010年版正式将其收录<sup>[1]</sup>。目前已从鸢尾中分离出多种三萜及其皂苷类化合物, 特别是一系列结构新颖的鸢尾醛型三萜, 其结构特征在于一个多取代环己烷的 C-11 位上连有一个侧链, C-6 位连有一个羟丙基可被糖基化<sup>[2]</sup>; 在抗肿瘤和抗癌方面表现出良好活性<sup>[3]</sup>。

糖基化是植物次生代谢过程中十分重要的一类化学反应; 在尿苷二磷酸 (UDP) 依赖性糖基转移酶 (UGTs) 的作用下, 将 UDP 活化的糖作为主要的供体分子转移到特定的受体分子, 形成糖苷键, 产生多种多样的糖苷类化合物<sup>[4]</sup>。被糖基化的化合物可显著提高水溶性、化学稳态以及转运能力等, 也能促进其在某些特定的植物细胞或组织中进行储存和积累<sup>[5]</sup>。植物中的 UGTs 是一个基因超家族, 已在许多植物中被克隆和表征功能<sup>[6-8]</sup>。此外在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 中, 已经报道了 120 个 UGT 基因<sup>[9]</sup>; 双子叶植物大豆 *Glycine max* L. 中报道 182 个 UGT 基因<sup>[10]</sup>; 单子叶植物水稻 *Oryza sativa* L. 中有 180 个 UGT 基因被报道<sup>[11]</sup>。由于 UGTs 家族成员众多, 且催化底物复杂, 其基因功能仍有许多未知。有研究指出, UGTs 在 C 端均具有一个高度保守基序 PSPG box (putative secondary plant glycosyl-transferase), 该保守基序被认为是 UDP-糖供体结合的区域; 而在 N 端的序列变异则十分显著, 其可能具有对萜类、黄酮类和甾体类等不同的底物进行选择性的功能<sup>[12-14]</sup>。

目前植物中关于催化三萜类化合物糖基化的糖基转移酶基因已有不少报道; 如从王不留行中克隆的 *UGT74M1* 从燕麦中克隆的 *AsAAT1* 和从大豆中克隆的 *UGT73P2*、*UGT9IH4*、*UGT73F4* 等; 其编码糖基转移酶蛋白均可对三萜骨架或侧链进行糖基化修饰<sup>[15-17]</sup>。鸢尾中存在着众多结构新颖的三萜及皂苷类成分, 但相关糖基转移酶的研究却未见报道。本研究通过对鸢尾转录组数据进行分析, 筛选并克隆了 2 条糖基转移酶基因 (*ItUGT349* 和 *ItUGT419*), 并通过生物信息学分析、基因差异表达分析; 推测其可能具有催化三萜类底物糖基化的功能。最后在大肠杆菌中进行了蛋白体外表达研究, 为进一步鉴定其催化功能、解析鸢尾中三萜类成分生物合成途

径奠定基础。

## 1 材料

本研究所用植物材料于 2019 年 6 月取自中国科学院植物研究所, 经广州中医药大学中药学院季爱加副研究员鉴定为鸢尾 *I. tectorum* Maxim.。选取生长年限 2 年, 生长健壮, 处于盛花期的鸢尾植物, 各组织部位取材后立即置于液氮速冻, 置于 -80 °C 冰箱备用。

## 2 方法

### 2.1 RNA 提取及反转录

采用液氮研磨法, 使用植物总 RNA 提取试剂盒 (北京兴华越洋生物科技有限公司) 按试剂盒操作说明提取鸢尾各部位总 RNA。将提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并使用核酸定量仪检测 RNA 浓度。参照 TakaRa 公司的 PrimeScript™ II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit (TakaRa 公司, 6210A) 试剂盒中的操作说明合成 cDNA 链。

### 2.2 ItUGTs 基因克隆

从鸢尾转录组数据中筛选到 2 条潜在的糖基转移酶基因, 命名为 *ItUGT349* 和 *ItUGT419*。根据其全长开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列, 使用 Vector NTI 设计引物, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列信息见表 1。以高保真酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme, P505-d1) 对候选基因片段进行 PCR 扩增反应, 反应体系为 2 × Phanta Max Buffer 25 μL, dNTP Mix 1 μL, 高保真酶 1 μL, 正反向引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, 超纯水补足至 50 μL。反应程序为 95 °C 预变性 3 min; 然后 95 °C、15 s, 57 °C、15 s, 72 °C、90 s, 32 个循环; 终延伸 72 °C, 5 min。PCR 产物经电泳、切胶回收纯化后连接 pLB-T 载体并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 涂布含氨苄抗性的 LB 固体平板; 于 37 °C 恒温培养箱中, 暗培养 12~15 h。挑取单菌落小摇 5~6 h, 进行菌液 PCR 阳性鉴定, 将阳性菌液送至生工生物工程上海股份有限公司测序。

### 2.3 ItUGTs 生物信息学分析

使用 NCBI 在线工具 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) 搜索 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 糖基转移酶基因序列的开放阅读框; 经 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 网站获得预测蛋白的理化性质。通过 CELLO v 2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 获得蛋白亚细胞定位



### 3 结果与分析

#### 3.1 *ItUGTs* 基因克隆

以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 可见 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 均为 1 条清晰条带 (图 1), 片段大小在 1500 bp 左右, 与预期大小相符。阳性克隆测序结果与转录组序列比对, 结果一致。*ItUGT349* 基因的 ORF 长度为 1461 bp, 编码 486 个氨基酸, 命名为 UGT707D1; *ItUGT419* 基因的 ORF 长度为 1488 bp, 编码 495 个氨基酸, 命名为 UGT92N1。

#### 3.2 *ItUGTs* 的序列分析

##### 3.2.1 *ItUGTs* 蛋白理化性质

经 ProtParam 在线工具预测, *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 相对分子质量分

别为 53 830 和 54 910, 理论等电点分别为 4.94、4.92, 不稳定系数为 53.69、49.58, 表明 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 均属于不稳定酸性蛋白。

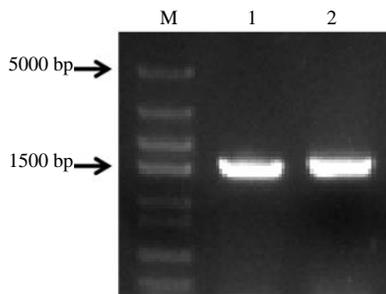
##### 3.2.2 *ItUGTs* 跨膜区及信号肽分析

亚细胞定位预测表明, 2 个 *ItUGTs* 均定位于细胞质。通过在线工具 TMHMM 预测蛋白跨膜区, 发现 2 个 *ItUGTs* 均不含有跨膜螺旋区 (图 2), 为膜外蛋白。利用在线工具 SignalP-5.0 对 *ItUGTs* 进行信号肽预测, 发现 *ItUGT349* 具有信号肽 (图 2), 为分泌蛋白; *ItUGT419* 不具有信号肽, 为非分泌蛋白, 二者可能具有不同的生物学功能。

##### 3.2.3 *ItUGTs* 蛋白二级结构及三维建模

二级结构分析表明, *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 均以  $\alpha$  螺旋和无规卷曲为主要组成元件, 其具体预测信息见表 2。

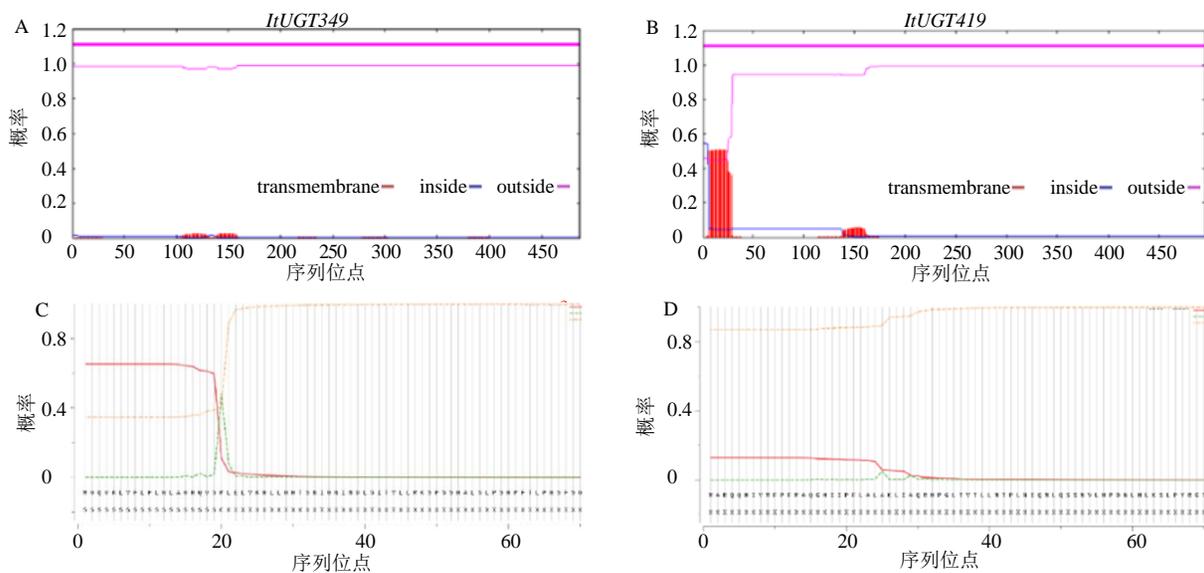
使用在线工具 SWISS-MODEL 预测 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 蛋白三维结构。*ItUGT349* 蛋白与蒺藜苜蓿三萜 UDP-葡萄糖基转移酶 (UGT71G1) 具有 42.70% 的序列相似性, 以该蛋白 (PDB ID: 2acw.1) A 链<sup>[19]</sup>为模板, 通过同源建模构建 *ItUGT349* 蛋白的三级结构, 建模范围为 2~485 位氨基酸, 全球性模型估测值 (GMQE 值) 为 0.68, 三维建模质量良好 (图 3)。*ItUGT419* 蛋白与美洲商陆糖基转移酶 (UGT3) 具有 32.83% 的序列相似性, 以该蛋白 (PDB ID:6lzx.1) A 链<sup>[20]</sup>为模板, 通过同源建模构



M-Marker 1-*ItUGT349* 2-*ItUGT419*

图 1 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretic diagram of PCR products



A、B-*ItUGTs* 跨膜区预测 C、D-*ItUGTs* 信号肽分析

A, B-*ItUGTs* transmembrane region prediction C, D-*ItUGTs* signal peptide analysis

图 2 鸢尾 *ItUGTs* 蛋白跨膜区与信号肽分析

Fig. 2 Analysis of transmembrane region and signal peptide of *ItUGT* proteins

表 2 ItUGTs 蛋白二级结构预测

Table 2 Secondary structure prediction of ItUGTs protein

预测蛋白	α螺旋/%	β桥/%	延伸链	转角	弯曲区	无规卷曲/%
			/%	/%	/%	
ItUGT349	41.15	0	13.99	5.14	0	39.71
ItUGT419	41.41	0	12.93	5.45	0	40.20

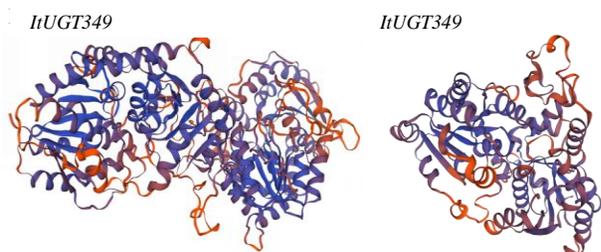


图 3 鸢尾 ItUGTs 蛋白三级结构预测

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of ItUGT proteins  
建 ItUGT419 蛋白的三级结构, 建模范围为 4~488 位氨基酸, GMQE 值为 0.67, 三维建模质量良好。

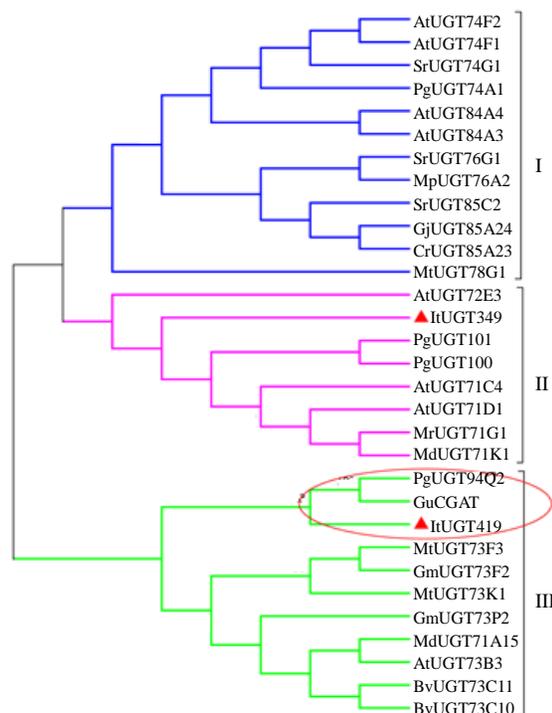
### 3.3 ItUGTs 的系统发育与结构域分析

根据糖基转移酶的底物催化特异性, 将拟南芥、大豆、人参、蒺藜苜蓿、栀子等植物中已表征功能的糖基转移酶与 ItUGT349 和 ItUGT419 进行系统发育分析 (图 4)。结果显示, ItUGT419 聚类在第 3 支 (Group III), 与人和麦蓝菜中的三萜类糖基转移酶聚类在一起; 而 ItUGT349 聚类在第 2 支 (Group II), 与已知功能的三萜类, 黄酮类等糖基转移酶聚类在一起。

使用 NCBI-CD-Search 和 Tbttools 工具对其结构域进行预测, 发现 ItUGT349 和 ItUGT419 与已知功能的三萜类糖基转移酶具有相同的结构域 (GTB-type superfamily)。进一步使用 pfam 在线软件对其结构域序列进行分析, 并使用 DNAMAN 进行多序列比对 (图 5), 发现 ItUGT349 和 ItUGT419 与三萜类糖基转移酶的氨基酸序列具有较高的一致性, 结构域全长约 150 个氨基酸。在与黄酮类糖基转移酶的序列比对中发现, 其结构域较三萜类的更长, 约 330 个氨基酸; ItUGT349 和 ItUGT419 在 C 端区域较为保守, 在 N 端存在大片段的缺失。

### 3.4 ItUGTs 的组织差异表达分析

以鸢尾 *eEF-1* 为内参基因, 通过 qRT-PCR 检测 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 基因在鸢尾根状茎、叶片和花中的差异表达情况, 结果见图 6, *ItUGT349* 在叶片中有最高表达; *ItUGT419* 在花中的表达量



AtUGT-拟南芥 SrUGT-甜叶菊 PgUGT-人参 MpUGT-蒺藜苜蓿  
GjUGT-栀子 GuCGAT-麦蓝菜 GmUGT-大豆 BvUGT-欧洲山芥  
AtUGT-*Arabidopsis thaliana* UGT SrUGT-*Stevia rebaudiana* UGT  
PgUGT-*Panax ginseng* UGT MpUGT-*Medicago truncatula* UGT  
GjUGT-*Gardenia jasminoides* UGT GuCGAT-*Gypsophila vaccaria* UGT  
GmUGT-*Glycine max* UGT BvUGT-*Barbarea vulgaris* UGT

图 4 鸢尾 ItUGTs 功能进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of ItUGTs and other functional proteins

最高。

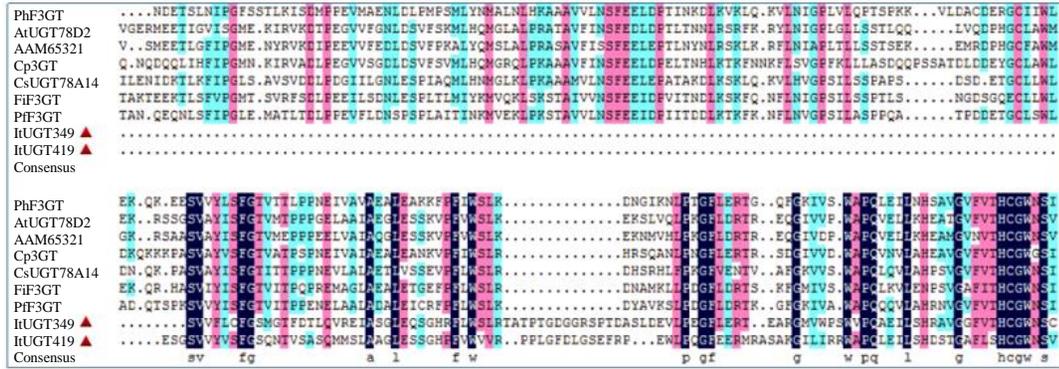
### 3.5 ItUGTs 的原核表达

将构建好的重组质粒 pET32a(+)-ItUGT349、pET32a(+)-ItUGT419 转入宿主菌 BL21(DE3), 通过菌液 PCR 筛选转化阳性菌液进行 IPTG 诱导表达。在 IPTG 的诱导作用下, *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 在大肠杆菌体系中进行异源表达, 经 SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况, 结果见图 7。ItUGT349 重组蛋白相对分子质量理论值为 74 230, 通过与空载表达情况对照, 发现成功表达出较大量的可溶性蛋白; ItUGT419 重组蛋白大小理论值为 75 310, 通过与空载表达情况对照, 发现可溶性蛋白达较少, 蛋白主要表达在沉淀中。

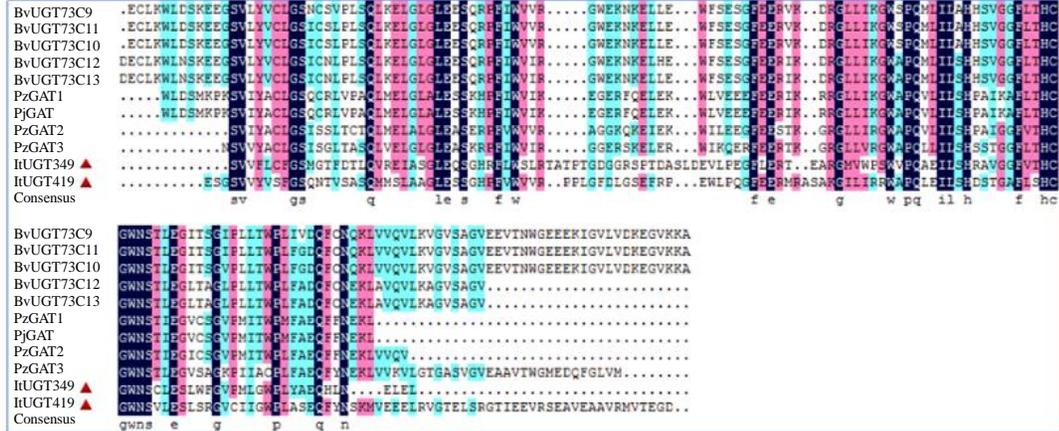
## 4 讨论

糖基转移酶是植物次生代谢产物的结构修饰

黄酮类



三萜类



PhF3GT-矮牵牛 F3GT Cp3GT-葡萄柚 3GT CsUGT-茶树 UGT FiF3GT-连翘 F3GT PfF3GT-紫苏 F3GT PjGAT-竹节参 GAT  
PhF3GT-Petunia F3GT Cp3GT-Citrus paradisi F3GT CsUGT-Camellia sinensis UGT FiF3GT-Forsythia suspensa F3GT PfF3GT-Perilla frutescens F3GT PjGAT-Panax japonicus GAT

图5 ItUGTs 结构域序列比对分析

Fig. 5 Sequences alignment of ItUGTs domains

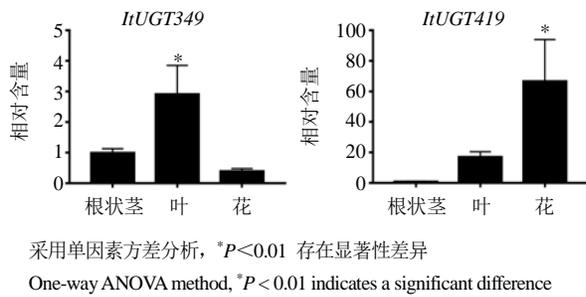
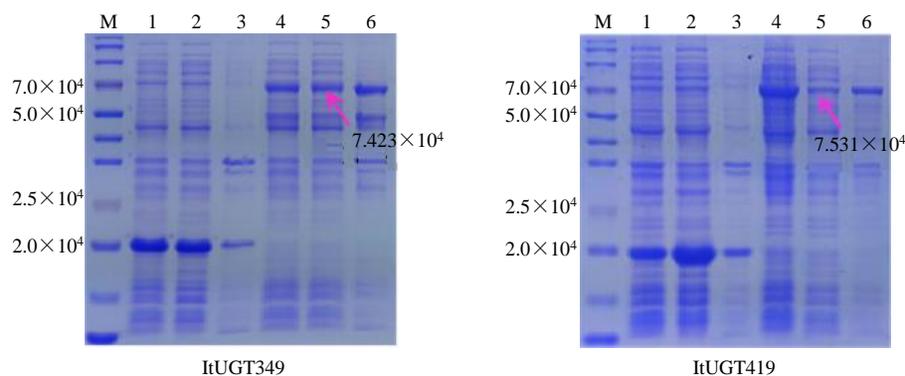


图6 ItUGTs 的组织差异表达分析

Fig. 6 Tissue expression analysis of ItUGTs

酶，可催化三萜、黄酮、甾体生物碱等众多化合物进行糖基化修饰。药用植物中的主要次生代谢产物通常为其药效物质基础，糖基化修饰对药效成分生化活性及药理作用具有显著的影响。如穿心莲中经糖基化修饰后生成的新穿心莲内酯，其水溶性增加了数倍<sup>[21]</sup>。人参中含有的多种人参皂苷，其糖基化修饰的差异会使得同种皂苷产生不同甚至截然相反

的药理作用<sup>[22]</sup>。当前对糖基转移酶的研究还有很多未知，一直是国内外研究热点。鸢尾作为一种传统的药用植物，其中含有多种三萜及其皂苷类成分，具有重要的药理活性<sup>[1-3]</sup>。本研究基于鸢尾转录组数据，筛选并克隆了2条糖基转移酶基因，经进化树分析，初步推测 ItUGT349 和 ItUGT419 可能以三萜类化合物作为底物进行糖基化反应，但 ItUGT349 可能具有更宽泛的底物选择性。有研究指出，糖基转移酶的底物选择性与N端结构域序列的差异高度相关<sup>[23-25]</sup>。如从茶树中分离得到的糖基转移酶 CsUGT78A14 可专一性的催化黄酮类化合物的糖基化反应；而另一个糖基转移酶 CsUGT72AM1 则可催化黄酮醇、花青素、木质素等多种底物进行糖基化反应，二者C端序列高度保守但在N端则存在显著差异<sup>[26-27]</sup>。进一步对鸢尾糖基转移酶 ItUGT349 和 ItUGT419 结构域序列进行分析发现 ItUGT349 和 ItUGT419 的N端结构域与三萜类的糖基转移酶相



M-Marker 1~3 依次为 BL21(DE3)-pET32a(+)全蛋白、可溶性蛋白、沉淀 4~6 依次为 ItUGTs 全蛋白、可溶性蛋白、沉淀  
M-Marker 1, 2 and 3 were BL21(DE3)-pET32a (+) total protein, soluble protein, precipitation; 4, 5 and 6 were ItUGTs total protein, soluble protein, precipitation

图7 鸢尾 ItUGTs 蛋白原核表达 SDS-PAGE 胶图

Fig. 7 SDS-PAGE of the prokaryotic expression of ItUGTs protein

似度更高，较黄酮类的糖基转移酶则存在大片段的缺失，其可能导致对黄酮类底物的选择性降低。

吴世丹<sup>[28]</sup>对鸢尾中的几种重要的三萜类成分进行了含量分析，发现其在叶片中含量非常高，而根状茎中的含量较低。通过荧光定量 PCR 检测 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 基因在鸢尾根状茎、叶片和花组织中的表达情况；*ItUGT349* 和 *ItUGT419* 基因差异表达与鸢尾各组织中三萜类化合物的积累趋势较为一致，故推测 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 糖基转移酶更可能参与鸢尾地上部分组织中的糖基化反应。进一步验证糖基转移酶基因功能，需要通过蛋白原核表达，获得相应的酶蛋白，并与各种类型的底物进行体外酶促反应；其中可溶性融合蛋白的成功表达对后续鉴定酶的功能至关重要。

本研究通过构建 *ItUGT349* 和 *ItUGT419* 原核表达载体，在大肠杆菌中进行蛋白表达，*ItUGT349* 和 *ItUGT419* 均表达出可溶性蛋白，但 *ItUGT419* 可溶性蛋白含量较低。有研究指出，融合蛋白可能会以包涵体的形式聚集在沉淀中，这与蛋白是否含有跨膜区及是否为分泌蛋白有关<sup>[29]</sup>；除此之外，蛋白的溶解性还与基因序列、蛋白空间结构、表达载体、菌株及诱导条件等有关<sup>[30]</sup>。本课题组在诱导表达过程中对诱导培养的温度和诱导剂 (IPTG) 的使用量等参数进行了摸索，依然不能很好的提高 *ItUGT419* 的可溶性蛋白含量；下一步将继续优化表达系统或使用发酵罐增大菌体的诱导量，来获得较大量的 *ItUGT419* 可溶性蛋白，为后续体外酶促反应鉴定酶功能提供足够的酶蛋白。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 雷启荣, 罗君, 赵琳珺, 等. 鸢尾的化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(12): 41-42.
- [2] Taillet L, *et al.* Isolation and structure determination of three epoxidized iridals from *Iris cristata* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(8): 1597-1600.
- [3] 顾卫卫, 谢国勇, 荆英姍, 等. 鸢尾醌型三萜的分布和生物活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(1): 122-130.
- [4] Vogt T, Jones P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: Characterization of a supergene family [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(9): 380-386.
- [5] Plaza M, Pozzo T, Liu J Y, *et al.* Substituent effects on *in vitro* antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(15): 3321-3333.
- [6] Gachon C M, Langlois-Meurinne M, Henry Y, *et al.* Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis*: Functional and evolutionary implications [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(2): 229-245.
- [7] Bowles D, Lim E K, Poppenberger B, *et al.* Glycosyltransferases of lipophilic small molecules [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 567-597.
- [8] Bowles D. A multigene family of glycosyltransferases in a model plant, *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30(2): 301-306.
- [9] Li Y, Baldauf S, Lim E K, *et al.* Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of

- Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(6): 4338-4343.
- [10] Shibuya M, Yan G J, WU X X, *et al.* Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max* [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(11): 2258-2264.
- [11] Caputi L, Malnoy M, Goremykin V, *et al.* A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land [J]. *Plant J*, 2012, 69(6): 1030-1042.
- [12] Paquette S, Møller B L, Bak S. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 399-413.
- [13] Ross J, Li Y, Lim E, *et al.* Higher plant glycosyltransferases [J]. *Genome Biol*, 2001, 2(2): REVIEWS3004.
- [14] 郭思远, 尹艳, 石颖慧, 等. 滇重楼糖基转移酶基因的克隆和原核表达 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(8): 126-134.
- [15] Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed D W, *et al.* Saponin biosynthesis in *Saponaria Vaccaria*. cDNAs encoding beta-amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glycosyltransferase [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(2): 959-969.
- [16] Louveau T, Orme A, Pfalzgraf H, *et al.* Analysis of two new Arabinosyltransferases belonging to the carbohydrate-active enzyme (CAZY) glycosyl transferase Family1 provides insights into disease resistance and sugar donor specificity [J]. *Plant Cell*, 2018, 30(12): 3038-3057.
- [17] Sayama T, Ono E, Takagi K, *et al.* The Sg-1 glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(5): 2123-2138.
- [18] 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.
- [19] Shao H, He X Z, Achnine L, *et al.* Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 3141-3154.
- [20] Maharjan R, Fukuda Y, Nakayama T, *et al.* Crown-ether-mediated crystal structures of the glycosyltransferase PaGT3 from *Phytolacca americana* [J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2020, 76(Pt 6): 521-530.
- [21] Li Y, Lin H X, Wang J, *et al.* Glucosyltransferase capable of catalyzing the last step in neoandrographolide biosynthesis [J]. *Org Lett*, 2018, 20(19): 5999-6002.
- [22] 梁会超, 王庆华, 巩婷, 等. 人参皂苷生物合成相关糖基转移酶研究基本策略及进展 [J]. 药学学报, 2015, 50(2): 148-153.
- [23] Lairson L L, Henrissat B, Davies G J, *et al.* Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms [J]. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77: 521-555.
- [24] Chang A, Singh S, Phillips G N Jr, *et al.* Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(6): 800-808.
- [25] 袁帅. 虎眼万年青属糖基转移酶的挖掘及其在糖苷多样性中的应用 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [26] Zhao X C, Dai X L, Gao L P, *et al.* Functional analysis of an uridine diphosphate glycosyltransferase involved in the biosynthesis of polyphenolic glucoside in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(50): 10993-11001.
- [27] Jiang X L. Four flavonoid glycosyltransferases present in tea overexpressed in model plants *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* for functional identification [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1100/1101: 148-157.
- [28] 吴世丹. 川射干三萜环化酶基因克隆和生化功能验证 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [29] Patnaik P R. Investigation of induction effect on the steady state performance of a continuous fermentation for recombinant  $\beta$ -galactosidase [J]. *Process Biochem*, 2001, 36(11): 1069-1074.
- [30] 靳保龙, 崔光红, 党伯岳, 等. 丹参二萜合酶基因 CPS4 的原核表达体系优化及活性蛋白纯化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 94-98.

[责任编辑 时圣明]