

• 药材与资源 •

金银花糖基转移酶基因的原核表达及其编码蛋白纯化

蔡芷辰, 赵君谊, 陈海杰, 刘训红, 王 进*

南京中医药大学, 江苏 南京 210023

摘要:目的 以金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 中糖基转移酶为研究对象, 进行糖基转移酶 *LjUGT73C1* 基因的生物信息学分析、基因合成与亚克隆、表达分析和纯化。方法 利用前期盐胁迫金银花组学研究构建的金银花转录组数据库注释信息, 筛选得到金银花中关键糖基转移酶 *LjUGT73C1*, 进行基因合成和亚克隆; 利用基因重组技术构建了原核表达载体 *Pet-30a-LjUGT73C1*, 遗传转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态; 应用 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blotting 检测蛋白的表达量、检测不同诱导条件下基因的表达情况, 最后经亲和色谱进行纯化。结果 通过基因合成与亚克隆得到糖基转移酶 *LjUGT73C1* 的全长序列, 理论编码氨基酸数目为 493, 等电点 (PI) 预测为 6.27, 理论相对分子质量为 55 530。构建了 *LjUGT73C1* 基因的原核表达载体并且在大肠杆菌中诱导表达得到重组蛋白, 应用 His 亲和色谱柱进行蛋白纯化并经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 确定为金银花 *LjUGT73C1* 蛋白。结论 首次报道了盐胁迫金银花中糖基转移酶基因 *LjUGT73C1*, 并进行表达分析和纯化, 为进一步研究金银花中苯丙素的生物合成及表达调控研究奠定了基础。

关键词: 金银花; *LjUGT73C1* 基因; 生物信息分析; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)04-1338-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.04.021

Prokaryotic expressions and encode protein purification of glycosyltransferase in *Lonicerae Japonicae Flos*

CAI Zhichen, ZHAO Junyi, CHEN Haijie, LIU Xunhong, WANG Jin

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective The *LjUGT73C1* gene, which was a glycosyltransferase gene from Jinyinhua (*Lonicerae Japonicae Flos*, LJF), was performed bioinformatics analysis, gene synthesis with subcloning, expression analysis and purification. **Methods** Based on the transcriptome database annotation information of LJF constructed in the previous salt stress omics study, the key glycosyltransferase *LjUGT73C1* was screened, then gene synthesis and subcloning were performed. The prokaryotic expression vector *Pet-30a-LjUGT73C1* was constructed by gene recombination technology, and transformed into competent *Escherichia coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE gel electrophoresis and Western blot were used to detect the expression of proteins, and the expression of gene under different induction conditions was detected. Finally, the protein was purified by affinity chromatography. **Results** The full-length sequence of glycosyltransferase *LjUGT73C1* was obtained by gene synthesis and subcloning. The theoretical number of amino acids encoded was 493, the predicted isoelectric point (PI) was 6.27, and the theoretical molecular weight was 55 530. The prokaryotic expression vector of gene *LjUGT73C1* was constructed and the recombinant protein was induced and expressed in *E. coli*. The protein was purified by His affinity chromatography and identified as *LjUGT73C1* by SDS-PAGE. **Conclusion** The *LjUGT73C1* glucosyltransferase gene in LJF under salt stress was first reported, and its expression analysis and purification were carried out. This study laid a foundation for further study on the biosynthesis and expression regulation of phenylpropanoids in LJF.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; *LjUGT73C1* gene; bioinformatics analysis; prokaryotic expression; protein purification

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 江苏省基础研究计划自然科学基金资助项目 (BK20220479); 江苏省普通高校自然科学研究项目 (22KJB360007); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (国中医药人教函 [2023] 85 号)

作者简介: 蔡芷辰, 博士, 研究方向为中药品质评价。E-mail: caizhichen2008@126.com

*通信作者: 王 进, 副教授, 硕士生导师, 主要从事本草文献与中药药性诠释研究。E-mail: tulipeden@126.com

随着全球环境条件的变化,据统计,土壤盐渍化将影响世界上大约 20%的灌溉土地,使其成为影响几乎所有作物生长和产量的主要非生物胁迫之一^[1-2]。盐胁迫不仅影响了金银花的代谢途径,而且诱导了次生代谢产物的积累^[3-4]。金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花^[5],是一种经典常用的大宗类中药材;目前全国各地均有广泛种植,适应性很强。其味甘,性寒,归肺、心、胃经;具有清热解毒、疏散风热的功效,常用于风热感冒、痈肿疮疖、丹毒、喉痹及温病发热等的治疗;现代药理研究亦表明其具有抗炎、抗病毒、抗菌、抗氧化、保肝利胆、降血糖等多种作用^[6]。同时,临床实践也表明其对严重呼吸系统综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)、甲型 H1N1 流感[influenza A (H1N1), H1N1]、新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)具有良好的预防和治疗作用^[7-8]。金银花的质量研究是其发展中的重要问题,也是研究的热点之一^[9];其中,主要药效成分苯丙素类的含量与金银花的质量密切相关。目前,越来越多的证据表明,苯丙素类代谢在协调植物发育、植物-环境相互作用、不同代谢途径间代谢通量重定向等方面发挥重要作用^[10];且调控苯丙素类代谢物生物合成和调节苯丙素类途径的复杂机制也逐渐被揭示^[11-12]。

中药品质的形成是其基因和环境共同作用的结果。盐胁迫可诱导金银花中苯丙素类活性成分生物合成途径中关键酶基因过表达,从而促进绿原酸及苯丙素类活性成分的合成和积累;在植物抵抗盐胁迫中发挥了抗氧化作用,并能提高植物对盐胁迫的耐性^[13-14]。近年来的研究发现,植物分子糖基化与植物抗逆性能力关系密切;糖基转移酶(glycosyl transferases, GT)是植物糖基化过程的关键酶,不仅参与植物的发育与成长过程,且可参与植物防御反应和次生代谢^[15-18],在提高药材品质与增强药用植物抗逆反应上有重要作用。然而,糖基转移酶的生物学功能复杂,不同的尿苷二磷酸糖基转移酶(uridine diphosphate glycosyltransferase, UGT)有不同的底物,从而具有不同的功能;且它们在植物中的生物学功能尚不清楚。因此,开展 UGT 参与药用植物抗盐胁迫以提高药效成分积累的分子机制研究具有重要意义。目前,宋经元团队^[19]成功组装了染色体级别的金银花基因组图谱,以及 Xiao 等^[20]通过整合公共平台金银花基因组数据信

息、转录组数据信息,成功搭建了金银花功能基因组数据库,为后续运用该数据库开展金银花基因功能分析提供了重要参考。但针对金银花中糖基转移酶的研究仍较少。报道的文献资料有徐道华等^[21]从金银花中克隆得到一个在幼蕾期表达量最高的糖基转移酶编码基因 *LjUGT71E1*, C 端具有催化植物次生代谢产物糖基化的糖基转移酶所具有的保守 PSPG-box 基序。以及元希武^[22]对金银花中木犀草素糖基化的糖基转移酶进行了鉴定和功能研究。

基于前期研究基础,本研究经生物信息学分析筛选得到影响金银花中苯丙素类生物合成和响应盐胁迫的关键糖基转移酶,然后进行基因合成和亚克隆得到全长序列,其理论可编码氨基酸数目为 493,等电点(PI)预测为 6.27,理论相对分子质量为 55 530。构建了 *LjUGT73C1* 基因的原核表达载体并且在大肠杆菌中诱导表达得到重组蛋白,应用 His 亲和层析柱进行蛋白纯化并经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测,确定为金银花 *LjUGT73C1* 蛋白。本实验首次报道了盐胁迫金银花中糖基转移酶基因 *LjUGT73C1*,并对其进行表达分析和纯化,为后续的进行基因功能研究提供了基础,也为利用生物技术提高药效成分的含量提供参考和支撑。

1 材料

将在河南省收集的 2 年生忍冬主根,经南京中医药大学刘训红教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb., 选择直径和芽数相近的主根幼苗,种植于南京中医药大学药用植物园(北纬 118°57'1", 东经 32°6'5")。每株幼苗分别种植在含有约 25 kg 的干沙土的塑料桶中(高 50 cm、上径 34 cm、下径 26 cm),正常生长后,进行盐胁迫处理,整个胁迫持续 35 d。于正常采收期采集金银花样品。取其花蕾组织样品,液氮速冻后置-80 °C 保存备用。

大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)、表达载体 pET-30a(+),牛血清蛋白(BSA)及质粒均由金斯瑞生物科技有限公司(南京)提供。

2 方法

2.1 生物信息学分析

应用前期金银花盐胁迫实验数据构建的组学数据库信息,结合金银花中主要活性成分含量的变化,筛选出目的糖基转移酶,以 *LjUGT73C1* 基因编码的蛋白为检索序列,应用 TBools 软件进行序列同源性比对和相似性搜索;应用 ProtParam 软件预测编码蛋白的理化性质;通过 SOPMA 和 SWISS-

MODEL 网站进行 *LjUGT73C1* 编码蛋白的二级结构和三级结构的预测;应用 ProtScale 在线软件预测编码蛋白氨基酸序列的亲/疏水性;以及 CellPLoc 2.0 在线软件预测基因的亚细胞定位;最后选择金银花和拟南芥中编码蛋白的高度同源序列,通过 MEGA 11 构建系统进化树。

2.2 基因合成、亚克隆和原核表达载体的构建

在前期盐胁迫金银花 RNA-seq 测序数据的基础上^[14],得到 *LjUGT73C1* 基因编码序列。根据序列信息,设计全基因序列,将其复制到大肠杆菌表达的目标载体上。

将 *LjUGT73C1* 基因插入含有限制性酶切位点 *NdeI* 和 *HindIII* 的 pET-30a (+) 表达载体,碱裂解法提取质粒,*NdeI*/*HindIII* 酶切后用琼脂糖凝胶电泳检测,并将构建的质粒进行测序。测序结果正确后,利用热激法转入到大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中,将菌液混匀后,涂至卡那霉素抗性平板上,将平板倒置,37 °C 培养,过夜。

2.3 重组蛋白的诱导表达

选取 3 个分离良好的单个菌落,分别接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 4 mL LB 培养基中,在摇床中 37 °C、200 r/min 振荡培养;当 600 nm 吸光度 (*A*) 值达到 0.6~0.8 时,在其中 2 支试管中分别加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG),分别在 15 °C 诱导 16 h 和 37 °C 诱导 4 h,第 3 支试管为阴性对照;然后应用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测蛋白的表达和可溶性。

2.4 重组蛋白的表达形式鉴定

取 450 μL 培养基离心后的沉淀,重悬于 300 μL 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 5% 甘油, pH 8.0),并超声裂解 1 min。将 50 μL 5 倍上样缓冲液混合到 100 μL 细胞裂解液中作为全细胞裂解液的样品;在 100 °C 下加热 10 min,以 15 000 r/min 离心 5 min。将剩余的 200 μL 细胞裂解液以 15 000 r/min 离心 10 min 后,分别收集上清液和沉淀。将 90 μL 5 倍上清液与 180 μL 上清液混合,作为细胞裂解液上清液的样品。然后用 150 μL 5 倍上样缓冲液重悬所有沉淀,作为包涵体的样品;并加热至 100 °C,10 min 后,在装入凝胶前以 15 000 r/min,离心 5 min。用 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测全菌、上清、包涵体样品。

2.5 重组蛋白的纯化与鉴定

取培养后的菌体,加入裂解缓冲液 (50 mmol/L

Tris, 0.5 mol/L NaCl) 重悬后,进行超声破碎;然后将超声破碎后的菌液以 12 000 r/min 于低温离心机内离心 30 min,保留沉淀;再用缓冲液 (50 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 复溶后用 0.45 μmol/L 滤膜滤过,应用 His 亲和层析柱进行蛋白纯化。具体步骤和条件如下: (1) 用 5 倍柱体积的去离子水洗涤,去除空气和 20% 乙醇; (2) 5~10 倍柱体积缓冲液 (50 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 平衡柱子;将样品以 0.25 mL/min 的速度流穿 His 色谱柱; (3) 应用缓冲液 (50 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 平衡柱子; (4) 分别依次应用浓度为 50、200、500 mmol/L 咪唑洗脱; (5) 将洗脱下来的样品分别进行 SDS-PAGE 检测,并分析是否有目的蛋白。

2.6 重组蛋白的 SDS-PAGE 胶检测分析

收集洗脱的蛋白,先将 8 mol/L 尿素稀释到 6 mol/L [50 μmol/L Tris, 150 μmol/L NaCl, 0.4 mol/L Arg, 2 μmol/L 谷胱甘肽还原型, 0.2 μmol/L 谷胱甘肽氧化型, 1 μmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT), pH 8.0], 静置 30 min, 再依次稀释到 4 mol/L 和 2 mol/L 尿素,最后透析到缓冲液 (50 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0), 4 °C 过夜,并用 SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度。

3 结果与分析

3.1 生物信息学分析

3.1.1 蛋白质基本理化性质 基因编码的蛋白质理化性质预测表明,*LjUGT73C1* 基因编码蛋白由 20 种氨基酸组成 (表 1),该蛋白的原子总数为 7 714,蛋白分子式 C₂₄₃₉H₃₈₇₉N₆₆₅O₇₀₀S₃₁,相对分子质量为 55 530,PI 为 6.27;无信号肽,说明此类蛋白质合成后于合成处发挥作用;无跨膜,说明不是定位与生物膜的膜蛋白;该蛋白不稳定指数为 48.47,属于不稳定蛋白。

3.1.2 蛋白质结构 通过 SPOMA 在线软件预测 *LjUGT73C1* 基因编码蛋白的二级结构,发现该蛋白中:α-螺旋最多,包含 220 个氨基酸,占比 44.62%;其次无规则卷曲,有 156 氨基酸,占比 31.64%,再次是延伸链,有 80 个氨基酸,占比 16.23%;最后是 β-折叠,有 37 个氨基酸,占比 7.51% (图 1-A)。利用 SWISS-MODEL 网站预测该基因编码蛋白质三级结构 (图 1-B),结果表明三级结构模型 GMQE 值为 0.92。

表 1 金银花 *LjUGT73C1* 编码蛋白质氨基酸组成

Table 1 *LjUGT73C1* encoding protein amino acid composition of *Lonicerae Japonicae Flos* (LJF)

氨基酸种类	数量	质量分数/%
Ala (A)	33	6.7
Arg (R)	27	5.5
Asn (N)	18	3.7
Asp (D)	14	2.8
Cys (C)	13	2.6
Gln (Q)	16	3.2
Glu (E)	46	9.3
Gly (G)	44	8.9
His (H)	10	2.0
Ile (I)	31	6.3
Leu (L)	49	9.9
Lys (K)	29	5.9
Met (M)	18	3.7
Phe (F)	25	5.1
Pro (P)	25	5.1
Ser (S)	32	6.5
Thr (T)	16	3.2
Trp (W)	8	1.6
Tyr (Y)	4	0.8
Val (V)	35	7.1
Pyl (O)	0	0
Sec (U)	0	0

3.1.3 蛋白质疏水性分析和亚细胞定位 利用 Protscal 网站对 *LjUGT73C1* 的亲水性/疏水性进行预测,图形的正值区域代表的是疏水区域,反之则为亲水区域。结果如图所示,亲水性最强分值为-2.9,疏水性最强分值为 2.367;总平均亲水性 (grand average of hydropathicity) 为-0.068。该结果表明 *LjUGT73C1* 是一种亲水性易降解的蛋白 (图 2)。为进一步证明 *LjUGT73C1* 基因的功能,利用 Cell-PLoc 2.0 在线工具预测,结果显示该基因主要在叶绿体中表达。

3.1.4 进化树分析和同源性分析 为阐明 *LjUGT73C1* 基因与同源基因的进化关系,本研究以其基因编码的蛋白为检索序列,选择与其高度同源的 UGTs 家族成员序列,利用 MEGA 11 软件中的 Clustal W 多序列比对方法与邻接法 (neighbor-joining, NJ) 方法构建系统进化树。通过对 UGTs 基因家族中各基因的亲缘关系进行分析 (图 3),结果显示 *LjUGT73C1* 与 *UGT73C3* 亲缘关系最近,推测两者具有相似的生物学功能,后续试验选择拟南芥基因突变体进行该基因的抗盐性鉴定。

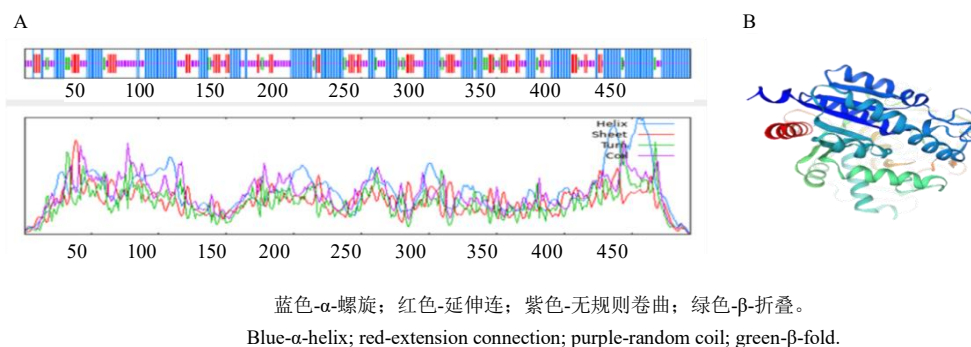


图 1 *LjUGT73C1* 基因编码蛋白的二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig. 1 Prediction of secondary (A) and tertiary (B) structure of protein encoded by *LjUGT73C1* gene

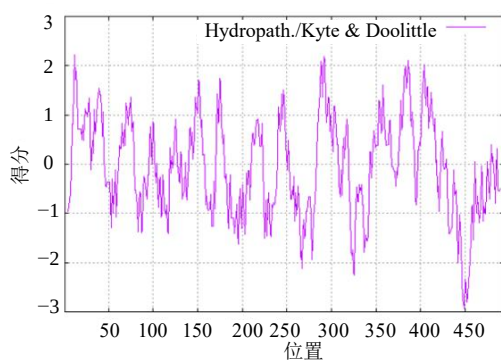


图 2 金银花 *LjUGT73C1* 编码蛋白质亲/疏水性分析

Fig. 2 Hydrophilic/hydrophobic analysis of *LjUGT73C1*-encoded protein

3.2 基因克隆和原核表达载体的构建

从金银花中克隆得到全长 cDNA 序列,编码蛋白序列见图 4;用限制性酶切位点 *Nde*I 和 *Hind*III 重组克隆载体,将目标片段连接到 pET-30a(+)后构建原核表达载体,应用 SnapGene 软件绘制质粒图谱 (图 5)。

3.3 *LjUGT73C1* 重组蛋白的表达与鉴定

在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 的条件下,通过不同的诱导温度 (15、37 $^{\circ}$ C) 对含有目标载体的菌体进行诱导表达;在诱导温度为 15、37 $^{\circ}$ C,分别诱导 16、4 h;经 SDS-PAGE (图 6-A) 和 Western blotting (图 6-B) 检测,获得 1 条相对分子质量为 55 530 的特异性蛋白条带,蛋白大小与目标蛋白基本相符,

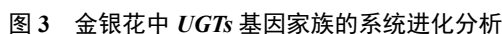


Fig. 3 Phylogenetic analysis of *UGTs* gene family in LJF

M HHHHHH ASQPNQLHFVLIPLMSPGHLIPMIDMAKLLAQHGVTIVTIVTPVNTLRFKSTVDRSIESGLRIKLELEFPALAAGL
PEGCENMDSLPSRHLIKNFFTASGMLKQPFEEVFEELEPRPSCIVSGKNLAWTVETARKFGIPRLFFDGMGCFACSHNL
QMSKVHEHLSKSVSFVVPGLPHRIELTSQLPENLNPGSPDLTEIRDKMVAAESITDGLVNTFKELEPEYVKMYKKVKGLNV
WCIGPVSA CNKLELDKAVRGRAGPGDENQCLKWLDSEQEPNSVIYACLSICGLVARQLVEFGLGLEASNRPFIWVIRGGEK
SQELERWIVEEGFEERIRGRLLIRGWAPQVLILSHPSIGSFLTHCGWNSMLEGACAGVQIIACPLFAEQFINERMVVDVLG
MGVSAGAKAAVTWGMEEKFGLVIKREDVKAIEKAMGEDEEGMERRKRAREFGEMAKRAIEEGSSFGDTRSLIQYVMKQ
NFGCFQAN 

氨基酸编码同表 1。

The amino acid codes are same as in table 1.

图 4 编码蛋白序列

Fig. 4 Encoded protein sequence

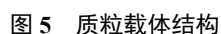


Fig. 5 Plasmid vector structure

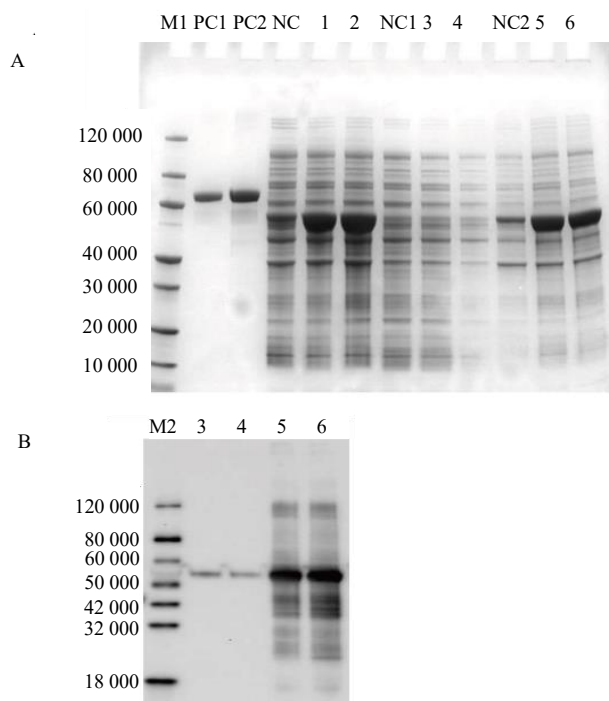


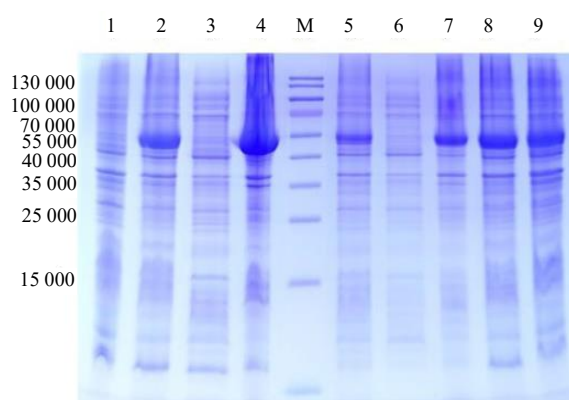
图 6 在 pET-30a (+) 中克隆并在 BL21 (DE3) 菌株中表达的 UGT 的 SDS-PAGE 分析 (A) 和 Western blotting (B) 分析

A: M1-SDS-PAGE Marker; PC1-BSA (1 μ g); PC2-BSA (2 μ g); NC-未经诱导的细胞裂解液; 1-细胞裂解液 15 $^{\circ}$ C 诱导 16 h; 2-37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h; NC1-未经诱导的细胞裂解上清液; 3-上清液 15 $^{\circ}$ C 诱导 16 h; 4-上清液 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h; NC2-未经诱导的细胞裂解液; 5-15 $^{\circ}$ C 诱导 16 h 的细胞裂解颗粒; 6-37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h 的细胞裂解颗粒; B: M2-Western blotting Marker; 3-15 $^{\circ}$ C 诱导 16 h 的上清液; 4-37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h 的上清液; 5-15 $^{\circ}$ C 诱导 16 h 的细胞裂解液; 6-37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h 的细胞裂解液。

A: M1-SDS-PAGE Marker; PC1-BSA(1 μ g); PC2-BSA(2 μ g); NC-Cell lysate without induction; 1-Cell lysate with induction for 16 h at 15 $^{\circ}$ C; 2-Cell lysate with induction for 4 h at 37 $^{\circ}$ C; NC1-Supernatant of cell lysate without induction; 3-Supernatant of cell lysate with induction for 16 h at 15 $^{\circ}$ C; 4-Supernatant of cell lysate with induction for 4 h at 37 $^{\circ}$ C; NC2-Cell lysate without induction; 5-Pellet of cell lysate with induction for 16 h at 15 $^{\circ}$ C; 6-Pellet of cell lysate with induction for 4 h at 37 $^{\circ}$ C; B: M2-Western blot Marker; 3-Supernatant of cell lysate with induction for 16 h at 15 $^{\circ}$ C; 4-Supernatant of cell lysate with induction for 4 h at 37 $^{\circ}$ C; 5-Cell lysate with induction for 16 h at 15 $^{\circ}$ C; 6-Cell lysate with induction for 4 h at 37 $^{\circ}$ C.

图 6 在 pET-30a (+) 中克隆并在 BL21 (DE3) 菌株中表达的 UGT 的 SDS-PAGE 分析 (A) 和 Western blotting (B) 分析

初步判断为表达的 LjUGT73C1 重组蛋白。但由于多为包涵体表达,所以在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 的条件下,选择在温度为 18 $^{\circ}$ C 时,诱导了 18 h;然后补加 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L,在 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h。用 SDS-PAGE 胶进行蛋白分析,结果见图 7。



M-Marker; 1-诱导前; 2-总蛋白 (18 $^{\circ}$ C); 3-上清 (18 $^{\circ}$ C); 4-沉淀 (18 $^{\circ}$ C); 5-总蛋白 (37 $^{\circ}$ C); 6-上清 (37 $^{\circ}$ C); 7-沉淀 (37 $^{\circ}$ C); 8-克隆总蛋白 (18 $^{\circ}$ C); 9-克隆总蛋白 (37 $^{\circ}$ C)。

M-Marker; 1-Before induction; 2-Total protein (18 $^{\circ}$ C); 3-Supernatant (18 $^{\circ}$ C); 4-Precipitate (18 $^{\circ}$ C); 5-Total protein (37 $^{\circ}$ C); 6- Supernatant (37 $^{\circ}$ C); 7-Precipitate (37 $^{\circ}$ C); 8-Clonal total protein (18 $^{\circ}$ C); 9-Clonal total protein (37 $^{\circ}$ C).

图 7 包涵体纯化分析

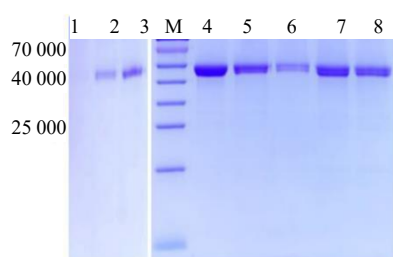
Fig. 7 Purification analysis of inclusion bodies

3.4 LjUGT73C1 重组蛋白的纯化

通过前期诱导性的实验结果,确定 IPTG 在浓度为 1.0 mmol/L,温度为 37 $^{\circ}$ C,诱导时间为 4 h 为最佳诱导条件;并对目标蛋白进行大量表达。因 LjUGT73C1 重组蛋白主要以包涵体的形式存在,因此需对目标蛋白进行复性及纯化。应用 His 亲和色谱柱进行蛋白纯化,依次分别收集浓度为 50、200 和 500 mmol/L 咪唑洗脱组分,并进行 SDS-PAGE 检测 (图 8)。因为 50 mmol/L 咪唑洗脱第 1 管洗脱基本无组分,故没有进行 SDS-PAGE 检测。纯化分析结果表明,用 200 mmol/L 浓度的咪唑洗脱,获得的 LjUGT73C1 浓度最大,可获得纯度较高的可溶性的 LjUGT73C1 重组蛋白,并进行 SDS-PAGE 检测 (图 9)。

4 讨论

糖基转移酶是植物进行糖基化的关键酶,主要参与植物的此生代谢过程,可参与植物防御反应和生物代谢,在提高药材品质与增强药用植物抗逆反应上有重要作用^[23]。植物 UGT 属于糖基转移酶一号家族,是植物中最大的糖基转移酶家族,通过糖基化可以将糖基转移到多种小分子上,调控多种代谢;如 UGT76B1 在 N-羟基吡啶啉糖基化中具有关键作用,并可调控 NPH 代谢在维持植物生长和防御反应平衡间发挥关键作用^[24];拟南芥中 UDP-糖基转移酶 (UGT76F1) 可通过 IAA 的前体吲哚-

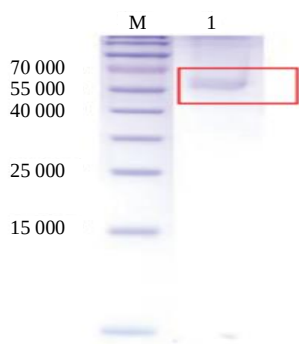


M-Marker; 1-50 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-2; 2-50 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-3; 3-200 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-1; 4-200 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-2; 5-200 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-3; 6-500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-1; 7-500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-2; 8-500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱-3。

M-Marker; 1-50 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-2; 2-50 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-3; 3-200 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-1; 4-200 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-2; 5-200 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-3; 6-500 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-1; 7-500 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-2; 8-500 mmol·L⁻¹ Imidazole elution-3。

图 8 LjUGT73C1 蛋白纯化分析

Fig. 8 Purification analysis of LjUGT73C1 protein



M-Marker; 1-最终样品。

M-Marker; 1-final sample.

图 9 LjUGT73C1 重组蛋白的检测和获得

Fig. 9 Detection and acquisition of LjUGT73C1 recombinant protein

3-丙酮酸 (IPyA) 的糖基化以光和温度依赖的方式参与生长素的调节, 揭示了通过 IPyA 糖基化来调节植物生长适应环境变化的机制^[25]。研究还发现, 胁迫可诱导水稻中 UDP-葡萄糖基转移酶基因 GSA 1 的表达, 促进黄酮苷的积累, 也可减轻盐胁迫造成的氧化损伤^[26]。可见, 糖基转移酶候选基因在响应非生物胁迫过程中具有不同的分子机制。同时, UDP-糖基转移酶还可参与糖苷类成分的生物合成, 并为其生物合成途径中的重要调控基因, 具有催化或转移葡萄糖形成糖苷类成分的功能^[27-29]。因此, 开展 UGT 参与药用植物抗盐胁迫和提高药效成分积累的分子机制研究具有重要意义。然而, 糖基转移酶的生物学功能复杂, 不同的 UGT 有不同的底

物, 从而具有不同的功能; 在黄芩、甘草等 7 种植物中 CGTa、CGTb 2 个碳糖基转移酶可依次催化 Glu-糖基化、Ara-糖基化生成重要的活性成分夏佛塔昔^[30-31]; 这为设计高效的糖基化生物催化剂提供了基础。

本研究成功构建了盐胁迫下金银花中一个目的糖基转移酶基因 *LjUGT73C1* 的原核表达载体, 并进行大肠杆菌超感受态 BL21 (DE3) 转化, 诱导其成功表达, 经复性, 纯化获得蛋白。由于蛋白的可溶性、稳定性和表达量因蛋白不同而异, 故须依据实际情况摸索和实验不同的诱导表达条件。培养时间、温度以及合适的 IPTG 浓度等因素也均为影响蛋白表达量的重要因素。因此, 本研究在保证其他 2 个因素相同的条件下, 分别对温度、时间及浓度 3 个因素进行了考察; 结果表明, 在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 时表达量较高, 同时温度为 37 °C 诱导 4 h 为最佳工作条件。且由于 *LjUGT73C1* 重组蛋白主要以包涵体的形式存在; 因此, 对目标蛋白进行了复性及纯化; 并用 200 mmol/L 浓度的咪唑洗脱, 获得的蛋白浓度较大。最终经透析复性并去除高浓度尿素后, 可恢复其蛋白空间构象, 得到具有生物活性的蛋白。本研究可为后续应用忍冬 *VIGS* 基因沉默体系^[32]验证其功能奠定基础以及深入研究金银花糖基转移酶的生物学功能奠定了实验基础, 也可利用生物技术提高功效物质的含量提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Munns R. Genes and salt tolerance: Bringing them together [J]. *New Phytol*, 2005, 167(3): 645-663.
- [2] van Zelm E, Zhang Y X, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 403-433.
- [3] Yan K, Cui M X, Zhao S J, *et al*. Salinity stress is beneficial to the accumulation of chlorogenic acids in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1563.
- [4] Yan K, Zhao S J, Bian L X, *et al*. Saline stress enhanced accumulation of leaf phenolics in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) without induction of oxidative stress [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 112: 326-334.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 230.
- [6] Shang X F, Pan H, Li M X, *et al*. *Lonicera japonica* Thunb.: Ethnopharmacology, phytochemistry and

- pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1): 1-21.
- [7] Zhou L K, Zhou Z, Jiang X M, *et al*. Absorbed plant MIR2911 in honeysuckle decoction inhibits SARS-CoV-2 replication and accelerates the negative conversion of infected patients [J]. *Cell Discov*, 2020, 6(1): 54.
- [8] Zhou Z, Li X H, Liu J X, *et al*. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 39-49.
- [9] 马涵玉, 钱琪, 牛丽颖. 基于文献计量学的金银花研究现状与热点分析 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(7): 1426-1434.
- [10] Dong N Q, Lin H X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions [J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(1): 180-209.
- [11] Li Y Q, Kong D X, Bai M, *et al*. Correlation of the temporal and spatial expression patterns of HQT with the biosynthesis and accumulation of chlorogenic acid in *Lonicera japonica* flowers [J]. *Hortic Res*, 2019, 6: 73.
- [12] Niggeweg R, Michael A J, Martin C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6): 746-754.
- [13] Cai Z C, Liu X H, Chen H, *et al*. Variations in morphology, physiology, and multiple bioactive constituents of *Lonicerae Japonicae Flos* under salt stress [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3939.
- [14] Cai Z C, Wang C C, Chen C H, *et al*. Comparative transcriptome analysis reveals variations of bioactive constituents in *Lonicera japonica* flowers under salt stress [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2022, 173: 87-96.
- [15] Zhu T T, Liu H, Wang P Y, *et al*. Functional characterization of UDP-glycosyltransferases from the liverwort *Plagiochasma appendiculatum* and their potential for biosynthesizing flavonoid 7-O-glucosides [J]. *Plant Sci*, 2020, 299: 110577.
- [16] Chen T T, Liu F F, Xiao D W, *et al*. The *Arabidopsis* UDP-glycosyltransferase75B1, conjugates abscisic acid and affects plant response to abiotic stresses [J]. *Plant Mol Biol*, 2020, 102(4/5): 389-401.
- [17] 郭淑, 罗红梅, 宋经元, 等. 糖基转移酶在植物次生代谢途径中的研究进展 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2012, 14(6): 2126-2130.
- [18] Huang X X, Wang Y, Lin J S, *et al*. The novel pathogen-responsive glycosyltransferase UGT73C7 mediates the redirection of phenylpropanoid metabolism and promotes SNC1-dependent *Arabidopsis* immunity [J]. *Plant J*, 2021, 107(1): 149-165.
- [19] Pu X D, Li Z, Tian Y, *et al*. The honeysuckle genome provides insight into the molecular mechanism of carotenoid metabolism underlying dynamic flower coloration [J]. *New Phytol*, 2020, 227(3): 930-943.
- [20] Xiao Q Q, Li Z Q, Qu M M, *et al*. LjaFGD: *Lonicera japonica* functional genomics database [J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(8): 1422-1436.
- [21] 徐道华, 亓希武, 陈吟, 等. 金银花糖基转移酶基因 LjUGT71E1 的克隆及原核表达 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(5): 1409-1416.
- [22] 亓希武. 催化金银花木犀草素糖基化的糖基转移酶的鉴定及功能研究 [R]. 2019: 42.
- [23] 于安东, 刘琳, 龙瑞才, 等. 植物 UDP-糖基转移酶 (UGT) 的功能及应用前景 [J]. *植物生理学报*, 2022, 58(4): 631-642.
- [24] Mohnike L, Rekhter D, Huang W J, *et al*. The glycosyltransferase UGT76B1 modulates *N*-hydroxy-pipecolic acid homeostasis and plant immunity [J]. *Plant Cell*, 2021, 33(3): 735-749.
- [25] Chen L, Huang X X, Zhao S M, *et al*. IPyA glucosylation mediates light and temperature signaling to regulate auxin-dependent hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(12): 6910-6917.
- [26] Dong N Q, Sun Y W, Guo T, *et al*. UDP-glycosyltransferase regulates grain size and abiotic stress tolerance associated with metabolic flux redirection in rice [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2629.
- [27] 赖成霞, 玛依拉·玉素音, 高燕, 等. 藏红花酸糖基转移酶 UGTcs4 基因的克隆、生物信息学及表达分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 1044-1051.
- [28] 龚伟伟, 赵懿琛. 杜仲 EuGT4 基因原核表达及其编码蛋白纯化 [J]. *贵州农业科学*, 2020, 48(4): 127-130.
- [29] 蔡启忠, 周良云, 刘露, 等. 何首乌糖基转移酶基因的克隆、生物信息学及表达分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(19): 6013-6022.
- [30] He J B, Zhao P, Hu Z M, *et al*. Molecular and structural characterization of a promiscuous C-glycosyltransferase from *Trollius chinensis* [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58(33): 11513-11520.
- [31] Wang Z L, Gao H M, Wang S, *et al*. Dissection of the general two-step di-C-glycosylation pathway for the biosynthesis of (iso)schaftosides in higher plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(48): 30816-30823.
- [32] 褚洪月, 刘振华, 李佳, 等. 忍冬 VIGS 基因沉默体系构建 [J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1309-1315.

[责任编辑 时圣明]