

## 桔梗中黄酮类糖基转移酶基因 *PgUGT72B21* 的克隆与功能验证

李 涛<sup>1</sup>, 郝志鹏<sup>1,2#</sup>, 任星榕<sup>1</sup>, 赵钰莹<sup>3</sup>, 王彩霞<sup>2</sup>, 薛 强<sup>2\*</sup>

1. 山西农业大学林学院, 山西 晋中 030801

2. 中国中医科学院中药研究所 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700

3. 山西卫生健康职业学院 基础部, 山西 晋中 030600

**摘要:** 目的 以桔梗 *Platycodon grandiflorus* 中糖基转移酶为研究对象, 进行糖基转移酶 *PgUGT72B21* 基因的生物信息学分析、基因克隆与重组质粒构建、蛋白表达与纯化、催化功能验证、酶学性质研究、底物宽泛性考察。方法 基于桔梗转录组数据筛选得到桔梗中关键糖基转移酶 *PgUGT72B21*, 进行基因克隆; 利用基因重组技术构建了原核表达载体 pET-28a-PgUGT72B21, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态; 根据 His 标签蛋白纯化试剂盒说明进行蛋白纯化, 应用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白的表达情况; 通过 HPLC 和 LC-MS 系统检测酶促反应产物。结果 通过克隆得到的桔梗糖基转移酶基因 *PgUGT72B21* 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度 1407 bp, 编码 468 个氨基酸残基, 相对分子质量约为 51 000, C 末端存在高度保守的植物次生产物糖基转移酶 (plant secondary product glycosyltransferase, PSPG) 基序。系统进化分析表明, 该糖基转移酶属于 UGT72 家族。体外酶促结果显示, *PgUGT72B21* 可催化槲皮素 C3 位羟基糖基化生成异槲皮苷。通过异源表达与纯化得到重组蛋白后对其酶学性质进行了分析, 表明 *PgUGT72B21* 催化反应的最适 pH 为 6.0, 最适温度为 60 °C, 反应 2 h 后的底物转化率达到最高。其催化槲皮素的酶动力学参数米氏常数 ( $K_m$ ) 为 390.10 μmol/L, 转化数 ( $k_{cat}$ ) 为 11.10/min。进一步的底物宽泛性研究显示 *PgUGT72B21* 不仅能够催化槲皮素等黄酮醇类化合物, 还能够催化芹菜素等黄酮类化合物。**结论** 发现的新糖基转移酶 *PgUGT72B21* 对于丰富糖基化工具酶库具有重要意义, 且能为进一步解析桔梗中黄酮糖苷的糖基化过程奠定基础。

**关键词:** 桔梗; 糖基转移酶; UDP-葡萄糖; 槲皮素; 功能验证; 酶动力学

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2026)01 - 0270 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.01.024

## Cloning and functional validation of flavonoid glycosyltransferase gene *PgUGT72B21* from *Platycodon grandiflorus*

LI Tao<sup>1</sup>, HAO Zhipeng<sup>1,2</sup>, REN Xingrong<sup>1</sup>, ZHAO Yuying<sup>3</sup>, WANG Caixia<sup>2</sup>, XUE Qiang<sup>2</sup>

1. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China

2. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Department of Basic Medical, Shanxi Health Vocational College, Jinzhong 030600, China

**Abstract: Objective** Taking the glycosyltransferase in *Platycodon grandiflorus* as the research object, the bioinformatics analysis, gene cloning and recombinant plasmid construction, protein expression and purification, catalytic function validation, enzymatic properties, and substrate promiscuity of the glycosyltransferase gene *PgUGT72B21* were investigated. **Methods** The key glycosyltransferase *PgUGT72B21* was screened from the transcriptome data of *P. grandiflorus* and subsequently cloned. A prokaryotic expression vector, pET-28a-PgUGT72B21, was constructed using gene recombination technology and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells. Protein purification was performed according to the instructions of the His-tagged protein purification kit, and protein expression was detected by SDS-PAGE electrophoresis. The enzymatic reaction products were analyzed using HPLC and LC-

收稿日期: 2025-10-02

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2023E002); 国家自然科学基金项目 (32200308); 中国中医科学院中药研究所自主创新课题 (ZXKT22048); 山西省基础研究计划 (自由探索类) 面上项目 (202403021211036)

作者简介: 李 涛, 副教授, 研究方向为植物分子生理学。E-mail: litao@sxau.edu.cn

#共同第一作者: 郝志鹏, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生药学。E-mail: haozhipeng5384@163.com

\*通信作者: 薛 强, 助理研究员, 研究方向为中药合成生物学。E-mail: qxue@icmm.ac.cn

MS systems. **Results** *P. grandiflorus* glycosyltransferase gene *PgUGT72B21* obtained through cloning had an open reading frame (ORF) of 1 407 bp, encoding 468 amino acid residues with a relative molecular mass of approximately 51 000. A highly conserved plant secondary product glycosyltransferase (PSPG) motif was identified at the C-terminus. Phylogenetic analysis indicated that this glycosyltransferase belongs to the UGT72 family. *In vitro* enzymatic assays demonstrated that *PgUGT72B21* could catalyze the glycosylation of the C3 hydroxyl group of quercetin to produce isoquercitrin. After heterologous expression and purification, the recombinant protein was obtained, and its enzymatic properties were analyzed. The optimal pH and temperature for the catalytic reaction were determined to be 6.0 and 60 °C, respectively, with the highest substrate conversion rate achieved after 2 h of reaction. The kinetic parameters for quercetin catalysis were  $K_m = 390.10 \mu\text{mol/L}$  and  $k_{cat} = 11.10/\text{min}$ . Further substrate promiscuity studies revealed that *PgUGT72B21* could not only catalyze flavonols such as quercetin but also flavonoids such as apigenin. **Conclusion** The newly discovered glycosyltransferase *PgUGT72B21* holds significant importance for enriching the glycosylation tool enzyme library and provides a foundation for further elucidating the glycosylation process of flavonoid glycosides in *P. grandiflorus*.

**Key words:** *Platycodon grandifloras* L.; glycosyltransferase; UDP-glucose; quercetin; functional verification; enzyme kinetics

桔梗 *Platycodon grandiflorus* L. 为桔梗科 (Campanulaceae) 桔梗属 *Platycodon* L. 植物, 是经典药食同源中药。桔梗干燥的根作为传统中药具有多种药用功能, 如宣肺、利咽、祛痰、排脓, 广泛用于咳嗽痰多、胸闷不畅、咽痛音哑、肺痈吐脓等<sup>[1]</sup>, 而且嫩叶与幼根还可作为菜蔬食用<sup>[2]</sup>。

桔梗的生物活性成分主要是皂苷类、黄酮类、酚酸、聚炔、多糖等, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗肥胖、抗糖尿病等药理作用<sup>[3]</sup>。黄酮类化合物尤为突出, 是有益于动植物和人类健康的一大类植物次生代谢物。黄酮作为一类具有较高药用价值的化合物, 一直是国内外生物类和医药类研究的热点。目前, 黄酮类化合物的药用价值及其构效关系正不断被发掘, 越来越多的黄酮类化合物药物制剂也相继投入临床应用<sup>[4]</sup>。黄酮类化合物包括黄酮、异黄酮、黄烷酮、黄酮醇、黄烷醇、花青素等类型, 而黄酮类在植物中通常以糖苷的形式存在。黄酮糖苷由类黄酮化合物与糖分子(如葡萄糖、半乳糖、鼠李糖)通过糖苷键连接而成。这种糖基化修饰不仅增强了其水溶性和稳定性, 还能衍生出新的生物活性, 使其具备重要的生物功能<sup>[5]</sup>。

糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)是参与黄酮糖苷合成的关键酶类, 能催化不同的黄酮底物与糖基结合而形成各类黄酮糖苷<sup>[6]</sup>。糖基转移酶是广泛存在于生物体内的一类重要酶, 其核心功能是催化活化的糖基供体, 最常见的是尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-glucose, UDPG)上的糖基转移到特定的受体分子上, 形成糖苷键。在植物次生代谢中, 糖基转移酶扮演着至关重要的角色, 是众多具有重要生理和药理活性的糖苷类化合物(如黄酮糖苷、皂

苷、生物碱糖苷等)生物合成的关键修饰酶。它们通过糖基化修饰, 能显著改变底物分子的理化性质(如水溶性、稳定性、细胞定位)和生物活性(如抗氧化、抗菌、抗癌活性), 甚至赋予其全新的功能<sup>[4-5]</sup>。事实上, *UGT* 基因已经在苦荞<sup>[7]</sup>、红花<sup>[8]</sup>、枸杞<sup>[9]</sup>、黄芩<sup>[10]</sup>、柑橘<sup>[11]</sup>和秦艽<sup>[12]</sup>等植物中被鉴定。因此, 糖基转移酶作为活性糖苷化合物生物合成的关键修饰酶, 具有重要的研究意义。但作为传统药用植物的桔梗, 有关催化黄酮糖苷形成的 UDP-糖基转移酶(*UGT*)尚未明晰。

本研究从桔梗基因组和转录组数据中筛选鉴定出1个参与黄酮糖基化的*UGT*基因。生物信息学分析后, 通过原核表达获得其重组蛋白。体外酶促反应明确显示, 该重组蛋白能特异性催化槲皮素3-O-羟基的葡萄糖基化反应, 高效生成异槲皮苷。在纯化该酶的基础上, 系统分析了其酶学特性。同时, 以多种结构不同的黄酮为底物进行测试, 证实了该酶具有显著的底物宽泛性。本实验不仅丰富了桔梗黄酮类化合物的糖基化工具酶库, 并为后续定向、高效催化生产黄酮类糖苷提供了新视野。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

样品采自北京, 经笔者采用常规DNA条形码技术鉴定为多年生的桔梗 *P. grandiflorus* L.. 操作步骤为采用高效植物基因组DNA提取试剂盒(DP350)提取植物材料DNA, 以ITS2为引物(F: 5'-ATGCGATACTGGTGTGAAT-3', R: 5'-GAC-GCTTCTCCAGACTACAAT-3'), 以提取的DNA为模板, 采用高保真酶进行PCR反应, PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳分析, 目标条带切胶送测, 送测

结果与数据库比对后确认为药用植物桔梗。分别收集叶、花、根、茎，经液氮速冻后，置于-80 °C冰箱保存。

## 1.2 药品与试剂

多糖多酚通用植物 RNA 提取试剂盒(Quick RNA isolation Kit) 购于北京兴华越洋生物科技有限公司；高效植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP350)，反转录试剂盒[FastKing RT Kit (With gDNase)] 购于天根生化科技(北京)有限公司；高保真酶 [2×KeyPo Master Mix (Dye Plus)]、质粒重组试剂盒 (ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit)、菌落 PCR 酶 (2×Rapid Taq Master Mix)、聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒 [One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (12%)] 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司；胶回收试剂盒 (EasyPure® Quick Gel Extraction Kit)、质粒提取试剂盒 (EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit) 购于北京全式金生物技术股份有限公司；pET-28a 载体为实验室保存，大肠杆菌克隆和表达感受态细胞[DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)] 购于上海唯地生物技术有限公司；His 标签蛋白纯化试剂盒（耐还原螯合型）(His-tag Protein Purification Kit) 购于上海碧云天生物技术有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (BCA Protein Assay Kit)、卡那霉素及异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 购于北京索莱宝科技有限公司；对照品槲皮素 (批号 117-39-5, 质量分数≥98%)、山柰酚 (批号 520-18-3, 质量分数≥98%)、杨梅素 (批号 529-44-2, 质量分数≥98%)、异鼠李素 (批号 480-19-3, 质量分数≥98%)、大豆素 (批号 486-66-8, 质量分数≥98%)、染料木素 (批号 446-72-0, 质量分数≥98%)、黄芩素 (批号 491-67-8, 质量分数≥98%)、芹菜素 (批号 520-36-5, 质量分数≥98%)、香橙素 (批号 480-20-6, 质量分数≥98%)、二氢杨梅素 (批号 27200-12-0, 质量分数≥98%)、山姜素 (批号 1090-65-9, 质量分数≥98%)、柚皮素 (批号 480-41-1, 质量分数≥98%) 均购于上海源叶生物科技有限公司；色谱甲酸和乙腈购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司；水为超纯水；其他试剂均为分析级；引物合成及测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

## 1.3 仪器

T20D 型双槽超级梯度 PCR 仪、伯乐 Gel DocTM EZ 全自动凝胶成像分析系统、佑科 UV759CRT 紫外可见分光光度计、JN-Mini pro 低温超高压连续流细胞破碎仪(广州聚能纳米生物科

技股份有限公司)、Agilent BioTek Synergy H1 多功能酶标仪、NanoDrop One 微量核酸蛋白浓度测定仪、赛得利斯电热恒温培养箱、Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS 系统、安捷伦 6470 Triple Quad LC-MS 液质联用仪 (Agilent Technologies 公司, 美国)。

## 2 方法

### 2.1 PgUGT72B21 基因的生物信息学分析

本研究基于桔梗的转录组注释数据，挖掘到糖基转移酶基因 PgUGT72B21。将 PgUGT72B21 与已鉴定的 26 个 UGT 基因编码的氨基酸序列通过 MEGA 构建系统进化树；用 DNAMAN 将 PgUGT72B21 与已鉴定的 8 个 UGT 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析；利用 Expasy Swiss bioinformatics resource portal (<https://www.expasy.org/>) 对 PgUGT72B21 基因编码蛋白的氨基酸组成、理论等电点、蛋白相对分子质量等理化性质进行分析；用 TMHMM2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行蛋白跨膜结构分析；用 SOPMA ([https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) 预测蛋白二级结构；通过 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 构建 PgUGT72B21 蛋白的三级结构模型。

### 2.2 PgUGT72B21 基因的克隆

将桔梗的各器官用液氮冷冻粉碎机彻底粉碎，然后按照植物 RNA 提取试剂盒的说明书提取桔梗的总 RNA，用 NanoDrop One 微量核酸蛋白浓度测定仪检测 RNA 的浓度，用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性，用反转录试剂盒将所提 RNA 反转录为 cDNA，用 NanoDrop One 微量核酸蛋白浓度测定仪测浓度，-20 °C 保存备用。使用 SnapGene 6.0.2 设计引物 UGT72B21-F 和 UGT72B21-R，用于扩增基因 PgUGT72B21(表 1)。以桔梗 cDNA 为模板，使用 2×KeyPo Master Mix (Dye Plus) 试剂盒和上述引物进行 PCR 扩增，反应体系和程序按照试剂盒说明书进行设置。PCR 产物经凝胶电泳检测，将大小正确的片段进行胶回收，-20 °C 保存。

### 2.3 蛋白表达载体的构建

用 SnapGene 6.0.2 设计基因 PgUGT72B21 和 pET-28a 载体的特异引物(表 1)，分别以 PgUGT72B21 片段和 pET-28a 空载为模板，使用 2×

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
UGT72B21-F	CTAAGAGTTCATCTTATTCTTCC
UGT72B21-R	ATGGAGAAAATACCTCATATACTG
UGT72B21-pET28a-F	CGGATCCGCGCTAACAGAGTTCATCTTATTCTTCC
UGT72B21-pET28a-R	GCAAATGGGTATGGAGAAAATACCTCATATAGTAATTG
pET28a-UGT72B21-F	GAACCTCTTAGCGCGGATCCGAATTGAGC
pET28a-UGT72B21-R	TTTTCTCCATACCCATTGCTGTCCACCAGTC

KeyPo Master Mix (Dye Plus) 试剂盒和上述引物进行 PCR 扩增, 反应体系和程序按照试剂盒说明书进行设置。PCR 产物经凝胶电泳检测, 将大小正确的片段进行胶回收, -20 ℃保存。

使用 (ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit) 质粒重组试剂盒, 将 PgUGT72B21 序列与 pET-28a 载体进行连接, 构建重组质粒。将 2 μL 重组质粒加入 100 μL DH5α 感受态细胞中, 均匀涂布在含 50 mg/mL 卡那霉素 (kanamycin, Kan) 的固体 LB 培养基平板上, 置于 37 ℃恒温培养箱中过夜培养。隔日进行阳性克隆筛选, 挑取单个菌落进行 PCR 验证, 将验证正确的菌落经 5 mL (含 50 mg/mL 卡那霉素) 液体 LB 培养基扩大培养, 按照 EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit 试剂盒说明书进行质粒提取并测序。测序正确的质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中 (步骤同上), 将 PCR 验证正确的菌株保存在 50%甘油中, 于-80 ℃保存。

#### 2.4 重组蛋白的诱导表达

将菌液扩大培养于含有 50 mg/mL 卡那霉素的 500 mL LB 液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 摆至 600 nm 吸光度 ( $A_{600}$ ) 为 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 16 ℃、110 r/min 诱导 20 h。将诱导完成的菌液 8 000 r/min 离心 4 min 收集菌体, 按照 1 g : 5 mL 的比例添加预冷的缓冲液 (50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠, pH 6.0) 重悬菌体。将菌液置于冰上, 用低温超高压细胞破碎仪对菌液进行破碎, 将破碎后的细胞液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min, 得到的上清液即为粗酶。

#### 2.5 重组蛋白的纯化

根据 His 标签蛋白纯化试剂盒说明书进行蛋白纯化。配制不同浓度的洗脱液: 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 50、70、100、400 mmol/L 咪唑; pH 8.0。用含不同浓度咪唑的洗脱液 (由低到高) 洗

脱目的蛋白, 置于冰上存放。然后用试剂盒制备聚丙烯酰胺凝胶并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。采用 BCA 蛋白浓度测定法测定洗脱的目的蛋白浓度。将纯酶添加少量甘油并于-20 ℃保存。

#### 2.6 PgUGT72B21 酶促功能验证

以槲皮素为底物, UDPG 为糖供体, 进行体外酶促反应验证重组蛋白 PgUGT72B21 的催化活性。反应体系: 5 μL 的 UDPG (10 mmol/L), 5 μL 槲皮素 (5 mmol/L), 10 μg 纯酶, 50 mmol/L 的柠檬酸及柠檬酸盐 (pH 6.0) 补足至 200 μL。对照组的反应体系与实验组相同, 但不含纯酶。反应在 60 ℃下进行 30 min 后, 加入等体积的甲醇终止反应, 超声 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清过膜, 通过 Waters 超高效液相色谱进行分析。HPLC 检测条件: C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Diamonsil Plus), 流动相为 0.1%甲酸水 (A) -乙腈 (B), 体积流量 1 mL/min, 梯度洗脱程序 (0~10 min, 20%~70% B; 10~11 min, 70%~95% B; 11~15 min, 95%~100% B; 15~16 min, 100%~20% B; 16~20 min, 20% B), 柱温 25 ℃, 进样量 10 μL, 检测波长 320 nm。

#### 2.7 酶学性质分析

取纯化蛋白 PgUGT72B21 进行酶学性质分析。酶促反应的体系: 2 μL UDP-G (100 mmol/L), 4 μL 槲皮素, 10 μg 纯化蛋白, 缓冲液补足至 200 μL。

**2.7.1 不同 pH 的影响** 配制不同 pH 的缓冲溶液: 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.0、4.0、5.0、6.0); 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 6.0、7.0); 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0)。37 ℃下反应 2 h, 每组反应平行重复 3 次。

**2.7.2 不同温度的影响** 采用 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 6.0), 在 9 个不同的温度条件 (4、16、25、30、37、45、60、65、75 ℃) 下进行酶促反应,

1 h 后终止，每组反应平行重复 3 次。

**2.7.3 不同反应时间的影响** 设置 7 个不同的反应时间，分别为 0.5、0.75、1、1.5、2、3、4 h，每个时间点进行 3 次平行重复。酶促反应条件：60 ℃，50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液（pH 6.0）。

**2.7.4 不同金属离子的影响** 选择 8 种化学药品（EDTA、CaCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>），配制为 100 mmol/L 水溶液，以终浓度为 5 mmol/L 加入到反应体系中，每种金属离子进行 3 次平行重复。酶促反应条件：60 ℃，1 h，50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液（pH 6.0）。

**2.7.5 动力学分析** 对 PgUGT72B21 进行酶促动力学分析，UDPG 终浓度为 2 mmol/L，设置槲皮素的浓度梯度依次为 0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.08、0.1、0.2、0.25、0.4 mmol/L，于 60 ℃ 反应 0.5 h 后加入等体积甲醇终止反应。每组反应平行重复 3 次。重组蛋白 PgUGT72B21 催化槲皮素反应的动力学参数米氏常数 ( $K_m$ )、转化数 ( $k_{cat}$ ) 及  $k_{cat}/K_m$  使用 GraphPad Prism (10.1.2 版本) 采用 Michaelis-Menten 模型进行非线性回归分析。

## 2.8 重组蛋白 PgUGT72B21 底物宽泛性考察

为进一步明确重组蛋白 PgUGT72B21 的催化活性，本研究选择以山柰酚、杨梅素、异鼠李素、大豆素染料木素、黄芩素、芹菜素、香橙素、二氢杨梅素、山姜素、柚皮素为底物进行酶促反应。反应体系：终浓度为 0.5 mmol/L 的 UDPG，0.1 mmol/L 的受体底物，30 μg 纯酶蛋白，使用浓度为 50 mmol/L 的柠檬酸及柠檬酸盐（pH 6.0）补足至 200 μL；37 ℃ 过夜反应，后续处理同“2.7”项。样品通过 UPLC-QTOF-MS/MS 检测，梯度洗脱条件同“2.6”项色谱条件，体积流量 1 mL/min，进样量 3 μL，柱温 25 ℃，采用电喷雾离子源（ESI），选择正离子模式，扫描范围  $m/z$  100~1 000，干燥气为氮气（N<sub>2</sub>），干燥气温度 300 ℃，干燥气体积流量 5 L/min，雾化器压力 310.275 kPa，鞘气温度 250 ℃，鞘气体积流量 11 L/min，毛细管电压 3 500 V。

## 3 结果与分析

### 3.1 PgUGT72B21 基因的生物信息学分析

桔梗中的代表性活性成分是黄酮苷，主要分布于桔梗的地上组织中。通过对桔梗根、茎、叶和花的转录组数据分析，从中发现 1 条在茎叶花中特异性表达的糖基转移酶基因 PgUGT72B21，其开放阅读框（open reading frame，ORF）为 1 407 bp，编码

468 个氨基酸。利用 ExPasy 的 ProtParam 预测 PgUGT72B21 蛋白的相对分子质量为 51 680，理论等电点为 5.63。TMHMM 2.0 显示 PgUGT72B21 蛋白无跨膜区域，表明 PgUGT72B21 为非膜蛋白（图 1）。

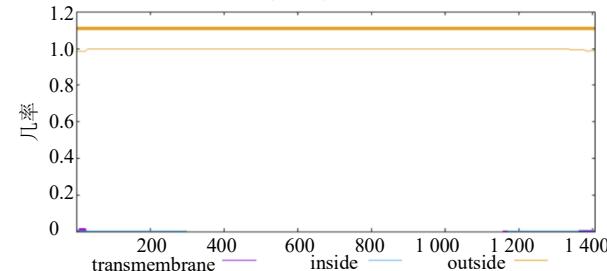


图 1 TMHMM 预测结果

Fig. 1 TMHMM prediction results

用 DNAMAN9 将 PgUGT72B21 与 8 条已报道的 UGT 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析，对比分析显示，PgUGT72B21 与莲的 NnUGT72G15 的氨基酸序列相似度最高，为 64.98%，与葡萄柚的 CpUGT73H13 相似度最低，仅为 25.20%。PgUGT72B21 结构中含有植物次生代谢糖基转移酶保守区（plant secondary product glycosyltransferase box，PSPG box）（图 2）。

选取 26 条具有不同催化位点的 UGT 氨基酸序列，利用 MEGA11 构建系统进化树，bootstrap 重复次数为 1 000 次。结果显示 PgUGT72B21 被聚类到多位点 UGT 一簇（图 3），推测 PgUGT72B21 也可能具有催化多个位点糖基化的功能。

SOPMA 二级结构预测结果表明，PgUGT72B21 基因编码蛋白的二级结构由 α-螺旋、β-折叠、延伸链和无规则卷曲组成（图 4）。

利用 SWISS-MODEL 对 PgUGT72B21 蛋白进行三级结构预测，结果显示 PgUGT72B21 与烟草 NtUGT1 的同源性高达 74.30%。因此，以 NtUGT1 (PDB: 8CHD) 蛋白三维结构为模板，构建 PgUGT72B21 蛋白三级结构。通过 SAVES v6.0 对 PgUGT72B21 同源建模进行评估，结果显示整体质量因子高达 95.18，表明此模型质量很好（图 5）。

### 3.2 PgUGT72B21 基因序列的克隆

以桔梗根 cDNA 为模板进行扩增，产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测，条带出现在 1 500 bp 附近，与预期条带大小一致（图 6-A）。将目的基因与载体连接后进行测序，测序结果显示 PgUGT72B21

UgUT72B21	NEKI PHI VPTPGNGLHLI LLEVEF SKRLSISNG EFSITFAPGCPRI TDAQAKLEYALPTC . . . . .	T S Y W P R V S L S L E D . . . . .	LP	
UGT71F1	NSSSTASLTVTAELAEVFLV PGPGLKSAVELLAI QCRHNR SI VI LI I NTTSLIS NDFEVS CCSRNPYHTPLTH TLPLPSLN . . . . .	T S Y W P R V S L S L E D . . . . .	LP	
UGT71K3a	NECPGCRPHI VPTPGNGLHLI LLEF AKRLLVHIE . . . . .	T N K I L E P L N P . . . . .	PI	
UGT72G15	MAKTHI AVAASSP SFLSHI VI EII TKLRSVHPNFETI TCII I PSLGSPSSKES LTYE TLSTQSSN . . . . .	I S S L E P P V N F D E D . . . . .	LP	
UGT72X5	MAETKETSCQLH I FFLPFVARGSHI BLTII KFLKHSHE . . . . .	I N S I L F P P V N K Q D . . . . .	LP	
UGT73Q17	NDTQANGLHFVLFVPLFLAGCNM PII MI ALLRQLRG . . . . .	E E L V I L I K V C F L C P E E A G L . . . . .	LP	
UGT73H13	MAETTPVKGKRVFVIL PVPVCGHLPNVCQAAVSKRK . . . . .	D G D F E I F I I G I PG . . . . .	FS	
UGT74B1	MAETTPVKGKRVFVIL PVPVCGHLPNVCQAAVSKRK . . . . .	D G D F E I F I I G I PG . . . . .	FS	
UGT74AE2	MAETTPVKGKRVFVIL PVPVCGHLPNVCQAAVSKRK . . . . .	D G D F E I F I I G I PG . . . . .	FS	
Consensus	MLSKTHI MFI P F P A C G H S I M A Q F A K R L A W K G . . . . .	V R I T I N L P A Q I R D S A Q I T N S L I N T E C . . . . .	S F D R E K D L G N P . . . . .	
PgUT72B21	NLARAETRNS VLS . . . . .	VARS L P S R L D F V K S . . . . .	L L E T K E F A L V A M . . . . .	
ERSSPD . . . . .	I E L E H E L P V K N C A V E E R I . . . . .	G I T G D A F E V S E E K P S V P I F F P B T A N A S L I F S L P L F P K L K D E T . . . . .	LP	
FARIL . . . . .	R A G S K S S K L A G F N . . . . .	T C T I M I I E T T N L N A P Y I T I F F T G S A M N L S F F F G S I C A N D E G V D . . . . .	LP	
KLDSSWCFKLTY . . . . .	I E T Y K H H K T C I N L C N V L P N S R I A G V I . . . . .	F C T I M I I E D E I K P V S F L F F T G S A G F I L L G L L P R K Y R D . . . . .	LP	
DCAKI ETR SLT . . . . .	V V R S L P S L R E A L K T . . . . .	L V S T R V P A L V A L F G D I F A F E V K E P K L F P D E R P T A T I L N F F L P E L D Q R . . . . .	LP	
UGT72G15	Q N A Y P Q L I L Q L T . . . . .	V T L S L P S I H E S L K S . . . . .	A S F A E L Y K E P F O N S L S Y L E P S A V N I S L E P K L D Q E . . . . .	LP
UGT72X5	Q C C E S A L I T T Q C N L G K F V K A T F L I E P H E K I L E E F R . . . . .	P C F L V A M . . . . .	P E F T W A T E V A K F R I P R L Y H E G T G F A F C A S L S V A N Y Q P . . . . .	LP
UGT73Q17	E G C E N L A L V S L A G L F D F I A A N L Q C P E V N F A Q L K P R P N C I S C P L Y P A F I K N E N P R I I L H G I C C V C V N Y C I S T S R V . . . . .	D I S P I I T C L V A M . . . . .	P G N G L E V R S E L S A A S F T I N N T L V C S U R N R E N S C N D P F . . . . .	LP
UGT73H13	V E T S Y E S F K R L N G . . . . .	S E T T I L L I E K P F S . . . . .	T N K L S D L E L E K C T . . . . .	LP
UGT74B1	N C A Y M G V R L K V . . . . .	N G V P V N L N . . . . .	N G V P V N L N C H C Q G V R G A P P F I I T H S C A V G A I Y N A F L G C L K . . . . .	LP
UGT74AE2	N C A Y M G V R L K V . . . . .	N G V P V N L N C H C Q G V R G A P P F I I T H S C A V G A I Y N A F L G C L K . . . . .	N G V P V N L N C H C Q G V R G A P P F I I T H S C A V G A I Y N A F L G C L K . . . . .	LP
Consensus	N C A Y M G V R L K V . . . . .	N G V P V N L N C H C Q G V R G A P P F I I T H S C A V G A I Y N A F L G C L K . . . . .	N G V P V N L N C H C Q G V R G A P P F I I T H S C A V G A I Y N A F L G C L K . . . . .	LP
PgUT72B21	V S C E Y E R P D P C I . . . . .	G C C I P V H G R D L L P N Q C R K D I A Y R L H E T H K R Y R T . . . . .	A E G I M S K E E K L E G A . . . . .	K A L Q E E P P . . . . .
UT71F1	L T K E H I S P N A E F V . . . . .	I P G V D E R P V N P E K V L A P I I E K S C V P N L I N V L R G L R . . . . .	I P G V D E R P V N P E K V L A P I I E K S C V P N L I N V L R G L R . . . . .	K P P V N P . . . . .
UGT71K3a	G V K F E V E S P L S T I P S V P S Y V N P V T N P L G V F V N . . . . .	C P C I P G R E L L V P Q C K K E A V L Y E V L H E T H K R Y L . . . . .	E I S I I F K V A E G Q S C D P W B A V P . . . . .	LP
UGT72G15	S Y C E R Y E R P Q V P V . . . . .	I P G V D E R P V N P E K V L A P I I E K S C V P N L I N V L R G L R . . . . .	L K A R L C D P I G Q C P D C P W B A V P . . . . .	LP
UGT72X5	S Y C E R Y E R P Q V P V . . . . .	I P G V D E R P V N P E K V L A P I I E K S C V P N L I N V L R G L R . . . . .	G C P D I G Q C P D C P W B A V P . . . . .	LP
UGT73Q17	I S H S N L S D S E F V I P N L P D E I K N T R S C L P V F D E E S M N K L A K I I E E R S V G V I . . . . .	H S N L S D S E F V I P N L P D E I K N T R S C L P V F D E E S M N K L A K I I E E R S V G V I . . . . .	A H N Y R K V F G R . K A W E I G P V S E C . . . . .	LP
UGT73H13	F E S V S S E Y E L V Y L P C L P K I E F T T G C V S S L G . . . . .	S R F V N F C K G N A D G T V G V I . . . . .	F E S S E L E P P A Y . . . . .	I K E V K K I R H . K W C V I G P V S L S . . . . .
UGT74B1	P A D P N S A P F R I R G L S P I S Y C E L P S T E E L P S R F V W L H T P E G R V L N L C N F P N E N . . . . .	A D T W F L E C L E T I D C E G E N C E S L A K A T I L I G P M P S A L . . . . .	A D W F L E C L E T I D C E G E N C E S L A K A T I L I G P M P S A L . . . . .	LP
UGT74AE2	P P E G L T S V L S P S L I . . . . .	P L L G R E D L P I P I R T G F P L P F E E R . . . . .	L G N C F S S L D E R . . . . .	A K W V S S Q P W I T S I G P L I P S M L . . . . .
Consensus	P P E G L T S V L S P S L I . . . . .	P L L G R E D L P I P I R T G F P L P F E E R . . . . .	L G N C F S S L D E R . . . . .	A K W V S S Q P W I T S I G P L I P S M L . . . . .
PgUT72B21	I G B L I Q N D S S . . . . .	A D P N G N S L K I M . . . . .	I L F I S F C G G I S . . . . .	I N S P D N K V A T V R N A C S E E A . . . . .
UGT71F1	N G B L I L E D S G S . . . . .	G G E F V S I L S I P S F S P S I F F C G G I S . . . . .	I L F I S F C G G I S . . . . .	I S L S A . . . . .
UGT71K3a	N G B L I L E D S G S . . . . .	G A R S D R S I N E I L E C G P H I V F N G L C G . . . . .	I L F I S F C G G I S . . . . .	V C A L L E Q T A E G G S . . . . .
UGT72G15	V G P L I R T S S S E . . . . .	A G A E A R P H K L I I U C C P G S V L F W P C S F G G I S . . . . .	I L F I S F C G G I S . . . . .	I P A I P I . . . . .
UGT72X5	M P I T Q I G S N N . . . . .	G A L D K N D C K L N L E N Q P S V L F W P C S F G G I S . . . . .	I L F I S F C G G I S . . . . .	V U R R P D C P D C P W B A V P . . . . .
UGT73Q17	N K A I E D E K A G R S I K S T A S K E H E K I C L L S K B P K R S V V Y S F G V S I V R A F I . . . . .	C R T G T N L B L G L E C S G R E P G . . . . .	I L F I S F C G G I S . . . . .	T H E C T E R E P C D C P W B A V P . . . . .
UGT73H13	N K E Y S T E K A C R G . . . . .	N K A I E D E K A G R S I K S T A S K E H E K I C L L S K B P K R S V V Y S F G V S I V R A F I . . . . .	P C S N R C L I B I T G I E S G C D G . . . . .	I L F I S F C G G I S . . . . .
UGT74B1	D E R N E D E K Y F G . . . . .	A S L K L P I S C K E N E I L E T K A Q S G V F S F G I S . . . . .	E K L U A E V I I A H C E S A N R K . . . . .	I V K K E E V E L P E G . . . . .
UGT74AE2	E K L Q P N K G N G . . . . .	E K L Q P N K G N G . . . . .	E K L U A E V I I A H C E S A N R K . . . . .	I V K K E E V E L P E G . . . . .
Consensus	E K L Q P N K G N G . . . . .	E K L Q P N K G N G . . . . .	E K L U A E V I I A H C E S A N R K . . . . .	I V K K E E V E L P E G . . . . .
PgUT72B21	P L D F L P K G K L E R T E G I G V P S V A H . . . . .	A C H I F E G T G I T G U P V A H . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT71F1	F V A E L P G E V C T E R A K I G J I S . . . . .	S T S V I I S E P S V C G E P C F C G G I S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT71K3a	F E D P L P K G K L E R T E G I G V P L V S S . . . . .	W A P T I E L L P K G K L E R T E G I G V P L V S S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT72G15	P F D F L P K G K L E R T E G I G V P L V S S . . . . .	W A P T I E L L P K G K L E R T E G I G V P L V S S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT72X5	P L K F L P K G K L E R T E G I G V P L V S S . . . . .	W A P T I E L L P K G K L E R T E G I G V P L V S S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT73Q17	E E K R E N G K G L I I R P V I I P V L I I E H E A I C A F T C G C G N S . . . . .	T Q K E S S V V G L S I F F C G C G N S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT73H13	E E E I R G K G L V I I M P V I I P V L I I E H E A I C A F T C G C G N S . . . . .	T Q K E S S V V G L S I F F C G C G N S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT74B1	F E S T E D R A L L S . . . . .	T Q K E S S V V G L S I F F C G C G N S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
UGT74AE2	F E S T E D R A L L S . . . . .	T Q K E S S V V G L S I F F C G C G N S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
Consensus	F E S T E D R A L L S . . . . .	T Q K E S S V V G L S I F F C G C G N S . . . . .	T S V A N G I F N A L V A E P A H . . . . .	I N V A N L T E D K Y I A L R P R F N E K G . . . . .
PgUT72B21	I N G Q L E I A E V Y R S I F . . . . .	E G E C K G L C N R A L R K N A I A N L S I D C S T K S L I S L E C A K V K N K N S . . . . .	W . . . . .	408
UGT71F1	W K T R K . . . . .	W E E T K R K V R C N D E R G R E L D G S S H I N S A L F R I C Q V L T . . . . .	h . . . . .	468
UGT71K3a	S G D . . . . .	S E E T K R K V R C N D E R G R E L D G S S H I N S A L F R I C Q V L T . . . . .	h . . . . .	492
UGT72G15	F S A S T E I R E A V G L N . . . . .	S E E T K R K V R C N D E R G R E L D G S S H I N S A L F R I C Q V L T . . . . .	h . . . . .	435
UGT72X5	L I N G R A E I A T V V R G L . . . . .	S E E G E F K R S S N K L R E A A R V L S E D . . . . .	h . . . . .	470
UGT73Q17	F S V L E V N A E T E G R N A E K I E A T V R I N . . . . .	S E E G E F K R S S N K L R E A A R V L S E D . . . . .	h . . . . .	487
UGT73H13	I V G E E I G K V L N K R E D A N R A E K V E D E K G E C E R R N A B V K L G M A N A V Q C G S S H I N T L V I M C K A I M E S S S Q A . . . . .	S E E G E F K R S S N K L R E A A R V L S E D . . . . .	h . . . . .	490
UGT74B1	V K S K F E E V R C L K G V A . . . . .	E G E S V V K I B E S K S K W K I L C A I K S E S D R S I F E S I F L S G K . . . . .	h . . . . .	460
UGT74AE2	V V L R G . . . . .	E G E I G D E L R G N A L K W K G L A V E A N E G K G S S D K N Y F E S I F L S G K . . . . .	h . . . . .	451
Consensus	V V L R G . . . . .	E G E I G D E L R G N A L K W K G L A V E A N E G K G S S D K N Y F E S I F L S G K . . . . .	h . . . . .	451

PSPG 为植物次生产物糖基转移酶保守区。  
PSPG: Plant secondary product glycosyltransferase conserved domain.

图 2 PgUGT72B21 蛋白的多序列比对

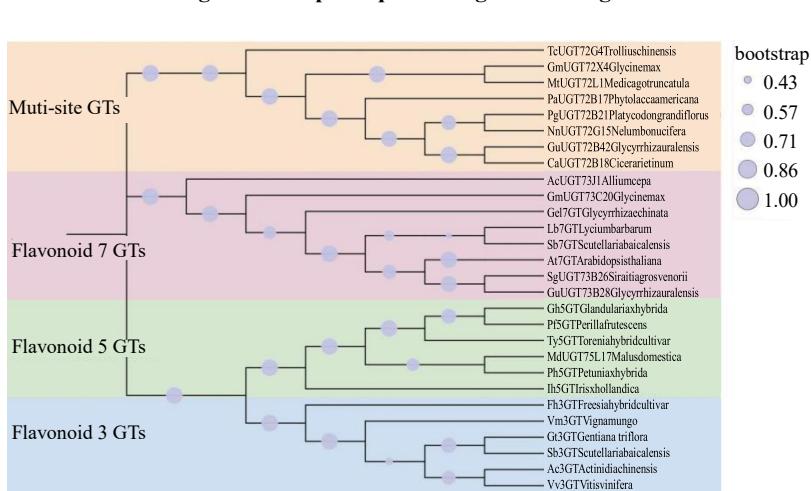


图 3 PgUGT72B21 蛋白系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of PgUGT72B21

的 CDS 序列大小为 1 407 bp，编码 468 个氨基酸。

### 3.3 PgUGT72B21 蛋白表达与纯化

本研究以 pET-28a 为载体，根据同源重组的原理，构建 pET-28a-UGT72B21 重组载体，

并转入 BL21 (DE3) 中诱导表达。菌破碎后得到的粗酶用 Ni-NTA 亲和色谱柱纯化, SDS-PAGE 电泳检测条带单一且大小与预期一致(图 6-B)。

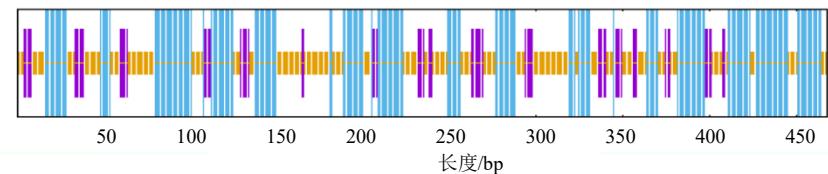


图 4 PgUGT72B21 蛋白预测的二级结构

Fig. 4 Predicted secondary structure of PgUGT72B21

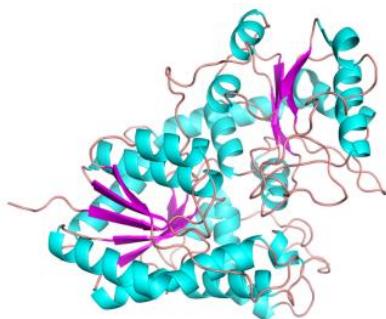


图 5 PgUGT72B21 蛋白预测的三维结构

Fig. 5 Deduced three-dimensional structure of PgUGT72B21

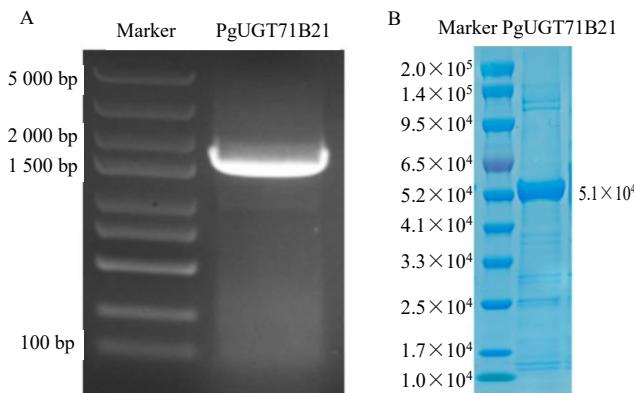


图 6 PgUGT72B21 基因 PCR 产物凝胶电泳图 (A) 和 SDS-PAGE 分析重组蛋白 PgUGT72B21 (B)

Fig. 6 Gel electrophoresis of PCR product for PgUGT72B21 gene (A) and SDS-PAGE analysis of recombinant protein PgUGT72B21 (B)

### 3.4 PgUGT72B21 酶促反应检测

酶促反应中加入 UDP-葡萄糖, PgUGT72B21 重组蛋白, 以及底物槲皮素, 共同反应后, HPLC 检测最终反应液中糖苷的生成。与对照组相比, 反应组的 HPLC 检测结果在 5.1 min 左右出现一个新峰, 且与异槲皮苷对照品出峰时间一致(图 7-A), 产物通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析, 发现离子碎片特征峰与异槲皮苷一致, 说明反应中生成了异槲皮苷(图 7-B、C)。酶促反应结果验证了所获得的

PgUGT72B21 重组蛋白具有生物学活性, 可在外催化槲皮素的 C-3 位羟基转化生成异槲皮苷(图 7-D)。

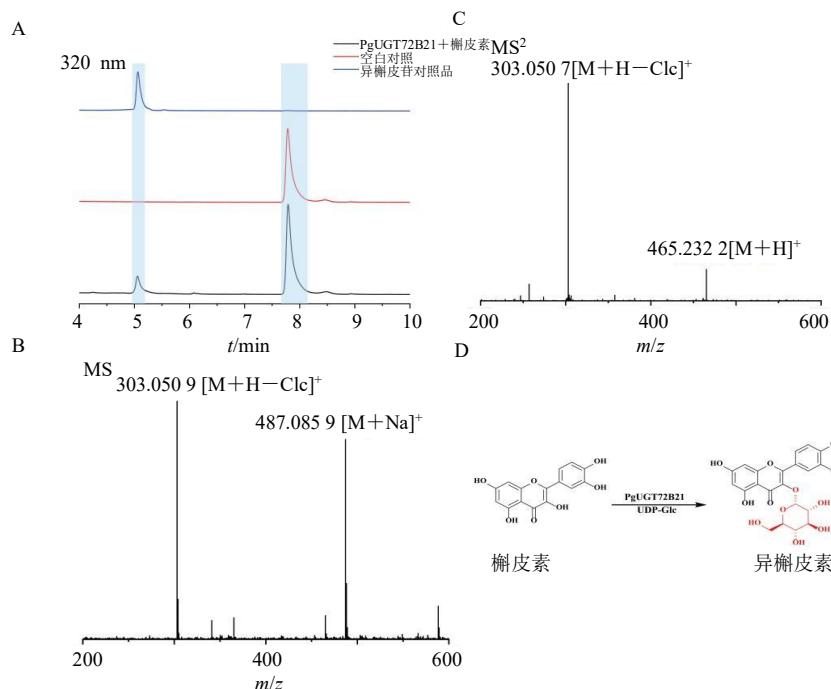
### 3.5 PgUGT72B21 的酶学性质分析

本实验选择槲皮素作为底物进行 PgUGT72B21 的酶学性质分析。首先, 作者选取了柠檬酸-柠檬酸钠、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、Tris-HCl3 种缓冲液, 测试了不同 pH 对酶催化活性的影响。笔者最初设置的 pH 值范围为 3~11, 但在实验过程中发现, 当  $\text{pH} > 7.0$  时, 液相检测过程中出现的底物峰消失, 且没有产物峰出现的情况, 排除人为和环境因素后重复实验, 结果仍然一致, 因此得知作为底物的槲皮素只能在  $\text{pH} \leq 7$  的环境中才能保持稳定, 超过此范围槲皮素便会分解, 无法参与酶促反应。调整 pH 值范围为 3~7 后重新进行实验, 证实 PgUGT72B21 进行酶促反应时的最适 pH 值为 6.0 左右,  $\text{pH}=7.0$  时底物转化率开始出现下降。此外, 不同类型的缓冲液类型对 PgUGT72B21 的催化活性也有一定的影响, 最适缓冲液为柠檬酸-柠檬酸钠(图 8-A)。

通过设置温度梯度, 考察重组蛋白 PgUGT72B21 进行酶促反应时的最适温度。随着反应温度的上升, 蛋白的催化活性逐渐增加, 至 60 °C 底物转化率达到最高; 继续增加温度, 在 75 °C 时, 催化活性开始出现明显下降, 其底物转化率降低了一半以上(图 8-B)。

设置不同的时间梯度: 0.5、0.75、1、1.5、2、3、4 h, 在最适温度(60 °C)及 pH(6.0)条件下测试酶的最佳反应时间, 在反应 2 h 后, 底物转化率达到最高(图 8-C)。因此, 纯化蛋白 PgUGT72B21 在 pH 6.0, 温度为 60 °C, 反应 2 h 时最有利于异槲皮苷的生成。

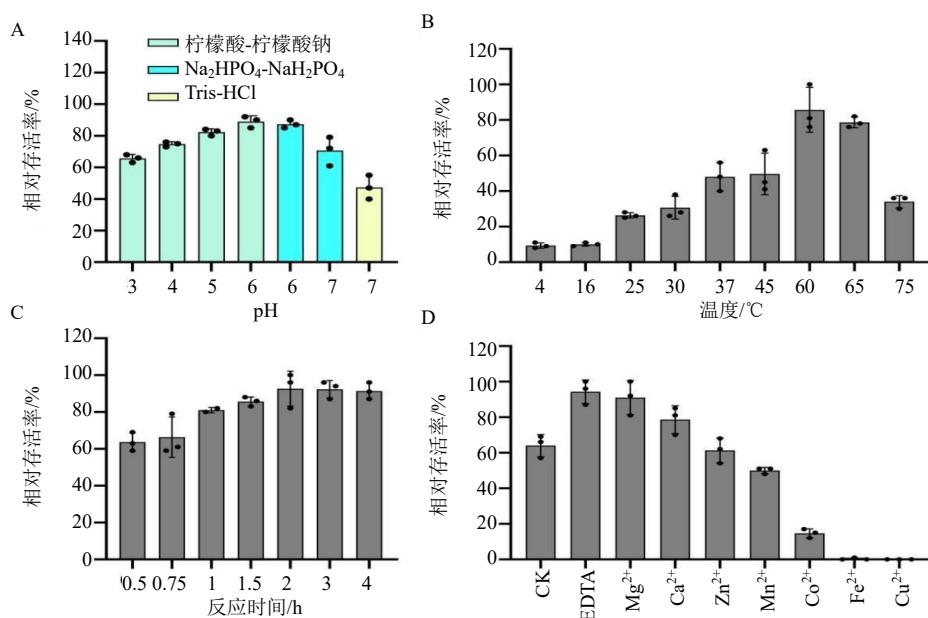
将 8 种不同的二价金属离子溶液分别加入到酶促反应体系中, 考察不同金属离子对酶催化活性的影响。结果显示, 和空白对照(CK)相比, 添加



A-HPLC 分析 PgUGT72B21 催化槲皮素的反应产物; B-产物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测一级 MS 图; C-产物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测二级 MS/MS 图; D-PgUGT72B21 催化槲皮素生成异槲皮苷的反应式。

A-analysis of the reaction products of PgUGT72B21-catalyzed quercetin by HPLC; B-primary MS spectrum of the product detected by UPLC-Q-TOF-MS/MS; C-secondary MS/MS spectrum of the product detected by UPLC-Q-TOF-MS/MS; D-reaction scheme for the conversion of quercetin to isoquercitrin catalyzed by PgUGT72B21.

图 7 PgUGT72B21 酶促反应  
Fig. 7 Enzymatic reaction of PgUGT72B21



A-pH; B-温度; C-反应时间; D-金属离子。  
A-pH; B-temperature; C-reaction time; D-metal ions.

图 8 PgUGT72B21 的酶学性质测定  
Fig. 8 Enzymatic characterization of PgUGT72B21

EDTA、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>对催化活性有一定提升，其中EDTA对酶催化活性提升最高（图8-D）。

在确定最适pH、温度、金属离子和反应时间后，测定纯化蛋白PgUGT72B21催化槲皮素形成异槲皮苷的酶学参数。采用米氏方程计算得出PgUGT72B21与不同浓度的槲皮素反应的酶活常数 $K_m=390.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ ,  $k_{cat}=11.1/\text{min}$ ,  $k_{cat}/K_m=0.028\text{ }\mu\text{mol}(\text{min}\cdot\text{L})$ ，并绘制出酶活曲线（图9）。

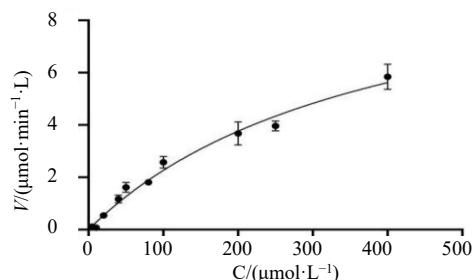
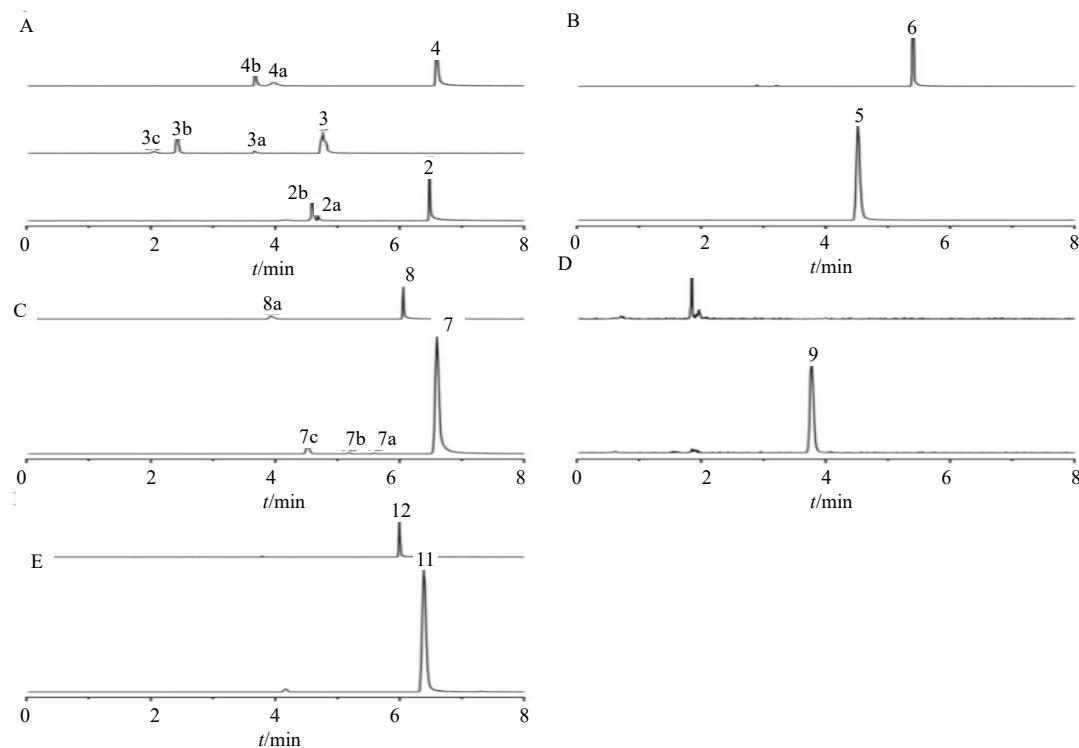


图9 重组蛋白PgUGT72B21的米氏方程( $n=3$ )

Fig. 9 Michaelis equation of recombinant protein PgUGT72B21 ( $n=3$ )

### 3.6 PgUGT72B21的底物宽泛性考察

以黄酮醇类的山柰酚、杨梅素、异鼠李素；异黄酮类的大豆素、染料木素；黄酮类的黄芩素、芹菜素；二氢黄酮醇类的香橙素、二氢杨梅素；二氢黄酮类的山姜素、柚皮素共5类11种黄酮类化合物为底物受体，UDPG为糖基供体，测定PgUGT72B21的底物宽泛性。在PgUGT72B21参与的酶催化反应液中，2、3、4、7、8号对照品的出峰位置之前均有新峰出现，而且以山柰酚、杨梅素、异鼠李素、黄芩素为底物时，反应结果中均出现了多个产物峰（图10-A、C）。根据相对分子质量、保留时间及一级质谱碎片信息推测（图11）：峰2a、2b、3a、3b、3c、4a、4b、7a、7b、7c、8a均为单糖苷产物。由此可见，PgUGT72B21可催化黄酮醇和黄酮糖基化，且对于同一底物具有不同的位点选择性，LC-MS检测结果与系统发育树（图3）中PgUGT72B21位于多功能位点一类的结论一致。



2-山柰酚；3-杨梅素；4-异鼠李素；5-大豆素；6-染料木素；7-黄芩素；8-芹菜素；9-香橙素；10-二氢杨梅素；11-山姜素；12-柚皮素。  
2-kaempferol; 3-myricetin; 4-isorhamnetin; 5-daidzein; 6 -genistein; 7-baicalein; 8-apigenin; 9-aromadendrin; 10-dihydromyricetin; 11-alpinetin; 12-naringenin.

图10 PgUGT72B21对黄酮醇类(A)、异黄酮类(B)、黄酮类(C)、二氢黄酮醇类(D)和二氢黄酮类(E)的催化活性HPLC结果

Fig. 10 HPLC results of catalytic activity of PgUGT72B21 towards flavonols (A), isoflavones (B), flavones (C), dihydroflavonols (D), and dihydroflavones (E)

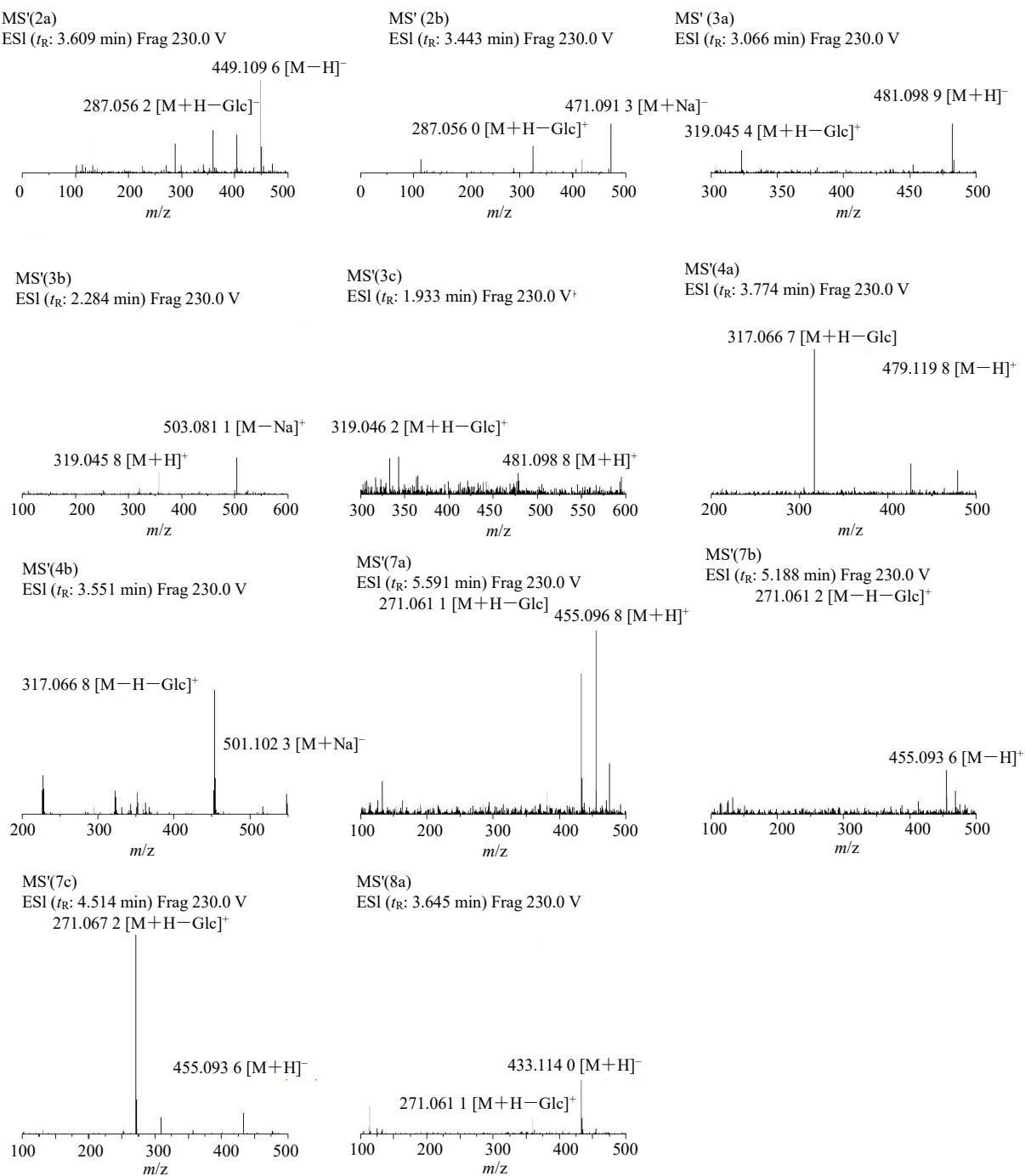


图 11 底物宽泛性考察产物 MS 提取结果

Fig. 11 MS extraction results of products from substrate promiscuity investigation

#### 4 讨论

黄酮类化合物是植物第2大次生代谢产物，分布在10万余种药用植物中，在无毒浓度下具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗肥胖、心肌保护和神经保护等多种药理活性<sup>[13-15]</sup>，广泛应用于食品、医药及化妆品行业中<sup>[16]</sup>。在结构上，黄酮类化合物以二苯

基丙烷骨架作为母核，随后经糖基化、羟基化、甲基化、酰化和异戊烯化等反应，进一步修饰黄酮骨架，产生了多达10 000多种黄酮类化合物<sup>[17-18]</sup>。虽然黄酮类化合物因其多样的结构和丰富的活性在众多领域具有广泛应用，但由于多苯环特性使其分子结构刚性较强，大多数黄酮分子微溶于水或不溶

于水，导致口服后生物利用度低，在临床应用中受到限制。例如，牡荆素水溶性较差，胃肠道吸收率仅约 5%<sup>[19-20]</sup>。糖基化是增加化合物水溶性并改善其药效和药动学特性的有效方法<sup>[21]</sup>。例如，槲皮素 3-O-二糖苷（芦丁）的溶解度比槲皮素高 240 倍以上<sup>[22-23]</sup>，可以有效改善血管功能和抑制血栓形成，已成为癌症治疗候选药物<sup>[24]</sup>。黄酮糖苷的化学合成通常有区域选择性和立体选择性较差的问题，黄酮类化合物多个羟基的存在更依赖基团的保护和脱保护过程，相比之下，糖基转移酶介导的生物催化反应只需要一步，并且条件温和、反应效率高、对环境友好<sup>[25]</sup>，因而备受关注。

目前对桔梗中黄酮类成分的研究主要涉及提取分离和药学性质鉴定，Nam 等<sup>[26]</sup>从桔梗乙醇提取物中分离出 8 个黄酮类化合物，包括紫檀苷 I、紫檀苷 II、忍冬苷、漆叶苷、木犀草素-7-O-(6"-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素，证明了桔梗的地上部分及其成分对受损的胰岛具有再生作用。Jang 等<sup>[27]</sup>从桔梗花醋酸乙酯提取物中分离得到 3 个黄酮类化合物，分别是芹菜素、芹菜素-7-O-(6"-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷，旨在从传统草药桔梗中发现治疗糖尿病并发症的新方法。但针对桔梗体内黄酮糖苷合成的研究仍存在未知，尚需进一步探索。

本实验基于桔梗基因组和转录组数据，从桔梗中筛选得 1 条 UGT 基因全长序列，并对其进行生物信息学分析。多重序列对比分析显示，PgUGT72B21 结构中含有 PSPG box，说明 PgUGT72B21 可能具有将 UDP-葡萄糖中的糖基转移到受体底物上的能力。进化分析显示，PgUGT72B21 可能具有多位点催化功能。此外本研究通过构建原核表达载体 pET-28a-UGT72B21 诱导表达重组蛋白，并通过加入槲皮素、UDP-葡萄糖和酶，进行酶促反应，检测异槲皮苷的生成，证实了 PgUGT72B21 表达的蛋白具有催化合成异槲皮苷的功能。在此基础上，进一步测定了 PgUGT72B21 的最适反应条件与酶促动力学参数，发现其最适 pH 为 6.0，最适反应时间为 2 h，最适温度为 60 °C，且最高至 65 °C 左右仍保持大部分酶活性，耐受温度明显高于目前大多数黄酮糖基转移酶的最适温度，此项特性在植物 UGT 相关的研究中尚属首次发现。

在最适 pH 与最适温度下，PgUGT72B21 催化槲皮素的催化效率  $k_{cat}/K_m$  为 0.028 μmol/(min·L)。同时，PgUGT72B21 可以参与 6 种黄酮底物的催化反应，具有较为广泛的黄酮底物谱。PgUGT72B21 的表征不仅扩展了桔梗中糖基转移酶的种类，有助于桔梗中黄酮类成分生物合成途径的解析，也为利用合成生物学方法和代谢工程手段生产黄酮苷类化合物做出了一定贡献。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 79-89.
- [2] 陈昊, 沈琼, 李伟. 我国桔梗产地加工、炮制及其在药食方面的应用现状 [J]. 中国野生植物资源, 2025, 44(4): 85-91.
- [3] 李超, 张欢, 汲晨锋. 桔梗化学成分、药理作用及现代应用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 38(6): 1-17.
- [4] 刘一杰, 薛永常. 植物黄酮类化合物的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(9): 81-86.
- [5] 李晓波, 刘雪, 赵广荣. 微生物合成黄酮糖苷类天然产物研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(8): 105-112.
- [6] 王佳蕊. 苦荞黄酮糖苷相关糖基转移酶基因的鉴定及功能验证 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2023.
- [7] 熊瑞琦. 苦荞类黄酮糖基转移酶基因 FtUFGT4 的克隆及功能鉴定 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2024.
- [8] Liu N, Zou Y P, Jiang Z Q, et al. Multomics driven identification of glycosyltransferases in flavonoid glycoside biosynthesis in safflower [J]. Hortic Plant J, 2024, 10(3): 245-258.
- [9] Li S Y, Wang G Q, Long L, et al. Functional and structural dissection of glycosyltransferases underlying the glycodiversity of wolfberry-derived bioactive ingredients lycobarbarspermidines [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 4588.
- [10] Wang Z L, Du X Q, Ye G, et al. Functional characterization, structural basis, and protein engineering of a rare flavonoid 2'-O-glycosyltransferase from *Scutellaria baicalensis* [J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(8): 3746-3759.
- [11] Chen J, Qiu X J, Sun Z M, et al. Genome-wide analysis of UDP-glycosyltransferase family in *Citrus sinensis* and characterization of a UGT gene encoding flavonoid 1-2 rhamnosyltransferase [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 280(Pt 2): 135752.
- [12] Bao Y O, Zhang M, Li H R, et al. Functional characterization and protein engineering of a glycosyltransferase GcCGT to

- produce flavone 6, 8-di-C- and 6-C-4'-*O*-glycosides [J]. *ACS Catal*, 2024, 14(2): 1075-1082.
- [13] Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(15): 6185-6205.
- [14] Huong N T, Son N T. Icaritin: A phytomolecule with enormous pharmacological values [J]. *Phytochemistry*, 2023, 213: 113772.
- [15] Sajid M, Channakesavula C N, Stone S R, et al. Synthetic biology towards improved flavonoid pharmacokinetics [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 754.
- [16] Li H B, Lyv Y, Zhou S H, et al. Microbial cell factories for the production of flavonoids-barriers and opportunities [J]. *Bioresour Technol*, 2022, 360: 127538.
- [17] Lv Y K, Marsafari M, Koffas M, et al. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(11): 2514-2523.
- [18] Tohge T, de Souza L P, Fernie A R. Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(15): 4013-4028.
- [19] Abdulai I L, Kwofie S K, Gbewonyo W S, et al. Multitargeted effects of vitexin and isovitexin on diabetes mellitus and its complications [J]. *Sci World J*, 2021, 2021: 6641128.
- [20] Peng Y, Gan R Y, Li H B, et al. Absorption, metabolism, and bioactivity of vitexin: Recent advances in understanding the efficacy of an important nutraceutical [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(6): 1049-1064.
- [21] Singh S, Phillips G N Jr, Thorson J S. The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(10): 1201-1237.
- [22] Li J, Shi M, Ma B L, et al. Antitumor activity and safety evaluation of nanoparticle-based delivery of quercetin through intravenous administration in mice [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 77: 803-810.
- [23] Saija A, Tomaino A, Trombetta D, et al. 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56(2): 167-174.
- [24] Park S H, Kim H J, Yim S H, et al. Delineation of the role of glycosylation in the cytotoxic properties of quercetin using novel assays in living vertebrates [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(11): 2389-2396.
- [25] Liang D M, Liu J H, Wu H, et al. Glycosyltransferases: Mechanisms and applications in natural product development [J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(22): 8350-8374.
- [26] Nam Y H, Kim E B, Kang J E, et al. Ameliorative effects of flavonoids from *Platycodon grandiflorus* aerial parts on alloxan-induced pancreatic islet damage in zebrafish [J]. *Nutrients*, 2023, 15(7): 1798.
- [27] Jang D S, Lee Y M, Jeong I H, et al. Constituents of the flowers of *Platycodon grandiflorum* with inhibitory activity on advanced glycation end products and rat lens aldose reductase *in vitro* [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(6): 875-880.

[责任编辑 时圣明]