

何首乌中UDP-鼠李糖合成酶基因 *FmRHM1/2* 的克隆与鉴定

刘 露, 周良云, 张春荣, 王 浩, 刘长征, 杨 全*

(广东药科大学中药学院/国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点研究室/国家中药材产业技术体系广州综合试验站/广东省南药规范化种植与综合开发工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

摘要: UDP-鼠李糖是一种由UDP-鼠李糖合酶(RHM)催化合成的鼠李糖供体, 而鼠李糖是鼠李糖苷化合物的重要组成部分, 植物中只有少数基因编码的酶参与UDP-鼠李糖生物合成。本研究基于何首乌(*Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.) 转录组数据, 首次克隆得到2个RHM基因(*FmRHM1*和*FmRHM2*), 并进行生物学信息分析、体外功能鉴定及组织特异性分析。结果显示*FmRHM1/2*基因的开放阅读框均为2 013 bp, 均编码670个氨基酸, 推测蛋白质分子质量均为75.6 kDa, 理论等电点分别为6.20和7.19, 具有RHM酶家族的特征信号序列(GxxGxxG/A和YxxxK); 多序列比对与系统进化树显示, *FmRHM*与其他物种的RHM具有同源性。体外酶促反应结果显示, 重组蛋白*FmRHM1*和*FmRHM2*均具有催化活性, 可将UDP-葡萄糖转化为UDP-鼠李糖。组织特异性表达显示, *FmRHM1*和*FmRHM2*基因在根中的表达量最低, 并与茎和叶相比均存在显著性差异。本研究首次报道了何首乌RHM, 并验证了其催化功能, 为进一步研究微生物合成UDP-鼠李糖奠定基础。

关键词: 何首乌; UDP-L-鼠李糖; UDP-鼠李糖合成酶; 功能鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)08-1515-09

Cloning and characterization of UDP-L-rhamnose synthase 1/2 from *Fallopia multiflora*

LIU Lu, ZHOU Liang-yun, ZHANG Chun-rong, WANG Hao, LIU Chang-zheng, YANG Quan*

(Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Production and Development of Cantonese Medicinal Materials, Guangzhou Comprehensive Experimental Station of National Industrial Technology System for Chinese Materia Medica, Guangdong Engineering Research Center of Good Agricultural Practice and Comprehensive Development for Cantonese Medicinal Materials, School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: UDP-rhamnose is a rhamnose donor in a reaction catalyzed by UDP-rhamnose synthase (RHM), and plays an important role in the biosynthesis of rhamnoside compounds. The current literature suggests that there are only a few genes can encode the corresponding enzymes to participate in UDP-rhamnose biosynthesis in plants. In this study, two RHM genes (*FmRHM1* & 2) were first cloned by using the transcriptomic data of *Fallopia multiflora* (Thunb) Harald and the multidimensional analysis, including bioinformatics, functional identification *in vitro* and tissue-specific expression analysis. The results showed that the open reading frame (ORF) of *FmRHM1* & 2 genes both were 2 013 bp, encode proteins consisting of 670 amino acids with a calculated molecular mass of 75.6 kDa, and the theoretical isoelectric points of 6.20 and 7.19, respectively. Bioinformatic analysis also indicated that *FmRHM1* & 2 contained 2 special sequences of GxxGxxG/A and YxxxK. The phylogenetic analysis showed that the *FmRHM* gene has a high homology with RHM of other species. The results of enzyme activity *in vitro* revealed that both recombinant *FmRHM1* and *FmRHM2* have catalytic activities for converting UDP-glucose into UDP-

收稿日期: 2019-03-19; 修回日期: 2019-05-12.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1700704); 2017年广东省岭南中药材保护资金专项(粤财社[2017]60号).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-39352353, E-mail: yangquan7208@vip.163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0184

rhamnose. Measurements of tissue-specific expressions showed that the expression levels of *FmRHM1* and *FmRHM2* were lower in roots. On the contrary, the 2 genes showed significantly high expression in the stems and leaves. In conclusion, we have cloned and characterized the *RHM* gene function for the first time in *F. multiflora*. Here we have provided the preliminary data suggesting the need for further research on UDP-rhamnose biosynthesis by microorganisms.

Key words: *Fallopia multiflora*; UDP-rhamnose; UDP rhamnose synthase; function characterization

UDP-鼠李糖 (UDP-Rha) 是合成 *L*-鼠李糖及苷的重要糖供体, *L*-鼠李糖是植物细胞壁果胶多聚糖 RG-I 和 RG-II 生物合成所必需的组分之一。植物中的鼠李糖基转移酶通过糖苷键将活化的鼠李糖与小分子连接起来^[1], 构成的鼠李糖多糖参与植物细胞壁的形成, 在维管植物的生长及发育过程中发挥重要作用^[2]; 细菌细胞表面多糖也含有鼠李糖, 对细胞生长和细菌间的相互作用起着重要作用^[2]。UDP-Rha 是黄酮类、皂甙类、三萜类和小酚类化合物等次生代谢物的糖苷类化合物合成的糖基供体^[3]; 研究表明, 鼠李糖苷具有广泛的生物活性, 如抗炎作用^[4]、抗病毒活性^[5]、抗氧化作用^[6]和抗癌作用^[7]。自然界中至少存在两种形式核苷酸鼠李糖: dTDP-Rha 和 UDP-Rha^[8,9], dTDP-Rha 存在于细菌中, 而 UDP-Rha 存在于真菌和植物中。在细菌中, 由 dTDP-葡萄糖 4,6-脱水酶 (RmlB)^[10]、dTDP-4-酮-6-脱氧-*D*-葡萄糖 3,5-差向异构酶 (RmlC)^[11]和 dTDP-4-酮-*L*-鼠李糖 4-酮-还原酶 (RmlD)^[12]基因编码的 3 种酶连续催化 dTDP-葡萄糖生成 dTDP-Rha (图 1A)。真菌中则通过两种酶: UDP-葡萄糖 4,6-脱水酶 (UG4,6-Dh) 和 UDP-4-酮-6-脱氧-*D*-葡萄糖 (UDP-4K6DG) 3,5-差向异构酶-4-酮-还原酶通过两步催化合成 UDP-Rha^[13] (图 1B)。而植物中, 则存在一种同时具有 UG4,6-Dh、UDP-4K6DG 3,5-差向异构酶和 UDP-4-酮-*L*-鼠李糖 (UDP-4KR)4-酮-还原酶活性的单酶, UDP-鼠李糖合成酶 (RHM) 整合了细菌 dTDP-Rha 生物合成途径中 3 种酶的功能, 直接催化底物 UDP- α -*D*-葡萄糖 (UDP-Glc) 生成 UDP-Rha (图 1C)。植物 RHM 由两个功能不同的结构域组成: 分别是具有 UG4,6-Dh 活性的 N-末端和具有 UDP-4K6DG 3,5-差向异构酶和 UDP-4KR 4-酮-还原酶活性的 C-末端结构域^[2]。

RHM 是植物中控制鼠李糖苷合成途径中的关键节点酶, 将 UDP-Glc 转化为 UDP-Rha, 并作为糖基供体, 用于鼠李糖分子类化合物的生物合成。目前已有化学合成和酶法合成 UDP-Rha, 但在化学合成上无论是利用磷酸-鼠李糖与活化的核苷 5'-单磷酸 (NMP) 进行偶联^[4], 还是利用核苷二磷酸 (NDP) 与亲电子糖基供体反应, 在其末端磷酸上发生糖基化生成 UDP-Rha^[15], 都存在反应条件苛刻、反应效率和立体选择性低等问

题, 实际应用价值有限。酶法合成是通过相关蛋白催化产物生成, 具有简单、快速、副产物少等优势, 已逐渐成为理想的替代化学合成的途径。目前, 已有报道利用拟南芥^[2]、杨树^[16]、玉米^[17]等植物中的 RHM 酶, 以 UDP-Glc 为底物连续催化合成 UDP-Rha 的研究, 但在中药领域中却未见相关研究报道。

何首乌 [*Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.] 是我国著名的传统中药, 含有多种对人体有益的活性成分, 具有抗衰老、抗动脉粥样硬化、抗高血脂、抗肿瘤、抗炎、清除自由基、保肝等方面的生物活性^[18]。何首乌中存在 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-鼠李糖苷和槲皮素 7-*O*-鼠李糖苷^[9], 这暗示何首乌中存在 RHM, 催化 UDP-Rha 的合成, 以提供鼠李糖糖基, 用于鼠李糖苷类化合物的生物合成。目前为止, 尚未有何首乌鼠李糖合成酶基因 (*FmRHM*) 的相关报道。本文通过何首乌转录组数据筛选, 首次克隆得到 2 条 *RHM* 基因 (*FmRHM1* 和 *FmRHM2*) 的全长 cDNA 序列, 并在体外进行原核表达获得重组蛋白; 通过以槲皮素、UDP-Glc、*FmRHM* 基因和拟南芥 *AtUGT78D1* 编码的酶进行酶促反应, 检测槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷的生成^[16], 以鉴定 *FmRHM* 的体外功能。其次, 采用实时荧光定量 PCR 检测这两个基因在何首乌不同组织中的表达水平。何首乌中 *RHM* 基因功能的成功鉴定, 为合成生物学和代谢工程提供更多的植物基因用于微生物合成 UDP-Rha, 为鼠李糖多糖及糖苷的生物合成奠定了基础。

材料与方法

材料 样品采自广东省德庆县大桥村, 经广东药科大学杨全教授鉴定为蓼科植物何首乌 (*F. multiflora*)。取其根、茎、叶组织样品, 液氮速冻后置 -80 °C 保存备用。用根、茎、叶提取总 RNA, 检测 *FmRHM* 基因在不同组织中的特异性表达。所用的克隆、表达大肠杆菌 (*Escherichia coli*) *Transl*-T1、*Transetta* (DE3) 均购自全式金 (TransGen Biotech, China) 公司, 原核表达载体 pET-28a (+) 由实验室传代冻存。引物合成及片段测序送北京擎科新业生物技术有限公司 (Tsingke, China) 进行。拟南芥 *AtUGT78D1* 基因在 GenBank 的登录号

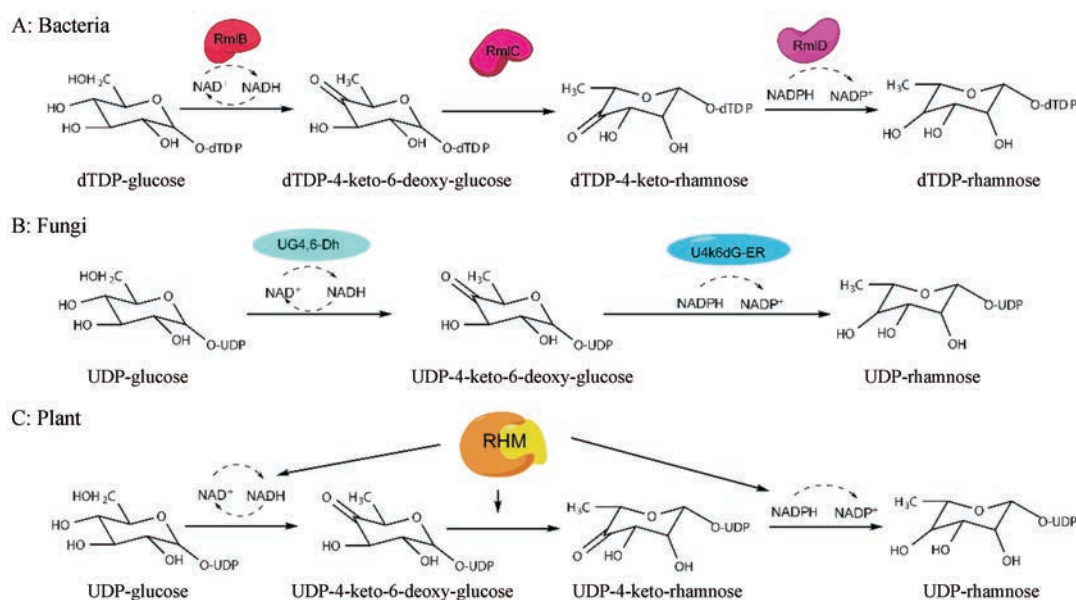


Figure 1 The biosynthetic pathway of dTDP-Rha/UDP-Rha in nature

为AY056312.1, 序列送苏州泓迅生物科技有限公司合成。槲皮素、槲皮素 3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素 3-*O*-鼠李糖苷均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

何首乌总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 按照 RNAPrep Pure 试剂盒 (Tiangen, China) 操作说明提取何首乌总 RNA, 利用 Nano-100 检测 RNA 浓度和纯度, 同时利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用反转录试剂盒 (TaKaRa, Japan) 将总 RNA 反转录为第一链 (cDNA), -20°C 保存备用。

***FmRHM* 基因序列全长克隆** 根据从何首乌转录组数据中筛选的 2 条 *FmRHM* 基因序列, 设计特异性扩增引物, 设计原理基于 *pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit* (TransGen Biotech, China) 说明书, 分别在一对引物的 5' 端引入一段和线性化载体 (pET28a) 两端相同的序列 (引物序列见表 1)。利用扩增试剂盒 (TOYOBO, Japan), 以何首乌 RNA 的反转录产物为模板, 进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 *FmRHM* 基因片段。PCR 反应体系为: cDNA 1 μL , KOD-Plus-Neo

(1 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , 10 \times PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 5 μL , 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 5 μL , 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4 3 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 1.5 μL , ddH₂O 补足至 50 μL 。反应程序: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环后; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 利用 TaKaRa 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。使用无缝克隆试剂盒 (TransGen Biotech, China), 将 PCR 产物与 *BamH* I 酶切后的 pET28a 载体连接。转化到 *Transl*-T1 菌株中, 在含卡那霉素抗性的平板上进行筛选, 并经过菌落 PCR 检测后送擎科公司测序。

何首乌 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 的生物信息学分析 利用 ExPASy Proteomics Server 在线软件 ProtParam 对 2 个 *FmRHM* 基因编码蛋白的氨基酸组成、蛋白质分子量、理论等电点及稳定性等理化性质进行分析; 通过 SOPMA 预测蛋白质二级结构; 利用 SWISS-MODEL 在线软件构建 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 蛋白的三级结构模型; 在线软件 TMHMM 2.0 进行蛋白质跨膜结构分

Table 1 Primers sequence

Primer role	Primer name	Primer sequence (5'-3')
PCR	RHM1-F	CAGCAATGGGTCGCGGAATGTCTACATATAAACCCAAAAAC
	RHM1-R	ACGGAGCTCGAATTCGGATCAAGCAGACCTCTGTGTTGGC
	RHM2-F	CAGCAATGGGTCGCGGAATGTCTACATACACACCGAAAAAC
	RHM2-R	ACGGAGCTCGAATTCGGATTAATTTGGATAGTTTGTCTTC
qPCR	RHM1-F	GAGCGAACTACATGGGAAGAG
	RHM1-R	CATCCTTGGGTGTGGAAGAA
	RHM2-F	GGAAAGGGTCGTTTGGAGAATA
	RHM2-R	CATTGGGTCTGCCAGTAACA
	Actin-F	GCTCAGCCATTGAGAAGAACTA
	Actin-R	CATAGAAGGCTGGAAGAGAACC

析;将所获得的 *FmRHM* 编码的氨基酸序列在 NCBI 中进行蛋白 Blast 比对分析,通过 DNAMAN 软件与其他物种的 *RHM* 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析;通过 MEGA 6.0 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树,进化距离的计算采用泊松校正法,Bootstrap 重复次数为 1 000 次。

FmRHM 蛋白原核表达 挑选测序验证后的转化子,过夜培养,提取 pET28a-FmRHM 重组质粒,转化 *Transetta* (DE3) 感受态大肠杆菌中培养。挑取阳性克隆进行 PCR 检测,并送测序验证表达系统正确性。挑选序列正确菌株,按 1:100 比例加入到适量含有 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中; 37°C 、 $250 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养至 OD_{600} 达 0.6~1.0 左右;加 IPTG 至终浓度 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 30°C 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养细胞 5 h,诱导产生重组 FmRHM 蛋白。经诱导表达的培养物,以 $4\,000 \times g$ 离心 15 min 收集菌体,用 ddH_2O 清洗菌体 2 次后,菌体悬浮于缓冲液 ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 10% 甘油, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF) 中,超声破碎 (30% 功率,超声 5 s,间歇 5 s,工作 5 min)。细胞破碎液于 4°C 、 $13\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,去除细胞碎片。取粗酶液加入 $6\times$ loading buffer 混匀,沸水浴 5 min, $12\,000 \times g$ 离心 5 min,上样 $10 \mu\text{L}$ 进行 10% SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将胶置于考马斯亮蓝染色 1 h,用脱色液进行背景脱色,检测蛋白表达情况。

拟南芥 *AtUGT78D1* 表达载体构建及体外表达 将 *AtUGT78D1* 连接到 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切的 pET28a 载体上,构建重组表达载体。克隆菌株扩大培养,提取重组质粒,转化到 *Transetta* (DE3) 中培养,挑选阳性克隆菌,按上述项下的操作进行 *AtUGT78D1* 重组蛋白的体外原核表达及蛋白提取,并进行 10% SDS-PAGE 电泳检测。

酶促反应检测 酶促反应体系:总体积为 $400 \mu\text{L}$,含有 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 槲皮素、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ UDP-Glc、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAD^+ 、*AtUGT78D1* 和 FmRHM 粗酶液各 $193 \mu\text{L}$ 。以未连接目的基因的 pET28a 空载表达菌在同等表达条件下的蛋白粗提物进行酶促反应作为阴性对照。混匀后于 30°C 下孵育 12 h,加入等体积甲醇终止反应。 $13\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜,进行 HPLC 检测。

检测条件如下:Waters 1525 高效液相色谱仪系统;色谱柱:Phenomenex 00G-4252-E0 ($4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$, $0.45 \mu\text{m}$);流动相:甲醇-0.1% 磷酸溶液 (55:45, v/v);流速: $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积: $10 \mu\text{L}$, 30°C 柱温, 366 nm 的波长下进行检测。

何首乌 *FmRHM* 基因的组织特异性表达分析 利用 qRT-PCR 方法检测何首乌 *FmRHM* 基因在不同组织中的表达水平。使用 TaKaRa 的反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser) 进行反转录生成单链 cDNA。使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa, Japan), 在 CFX96 Touch (Bio-Rad, USA) 仪上进行扩增。选取何首乌 *Actin* 基因作为目标基因定量表达的内参基因,利用 Integrated DNA technologies 在线软件设计引物,引物序列见表 1。每个样品设 3 个重复,重复 3 次。扩增体系中含有 $10 \mu\text{L}$ TB Green Premix Ex Taq II ($2\times$)、上下游引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $0.8 \mu\text{L}$ 、模板 $2 \mu\text{L}$, ddH_2O 补足总体积为 $20 \mu\text{L}$ 。反应程序: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火/延伸 30 s, 40 个循环后; 95°C 变性 10 s, $65\sim 95^\circ\text{C}$ 做熔解曲线分析,每个温度以每步 0.5°C 上升,每个温度停留 5 s。根据熔解曲线判断 RT-PCR 产物的特异性,相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行,结果采用 GraphPad Prism 7.0 进行各组间方差分析。

结果与分析

1 何首乌 *FmRHM* 基因全长 cDNA 克隆

以何首乌 cDNA 为模板进行扩增,通过 PCR 扩增后,2 条基因的 PCR 产物均约为 $2\,000 \text{ bp}$,与预期大小相近,如图 2 所示。将纯化后的 PCR 产物连接到 pET28a 载体上,进行测序。测序结果显示克隆的片段与转录组数据中的基因序列一致,其序列长度均为 $2\,013 \text{ bp}$,均编码 670 个氨基酸,基因命名为 *FmRHM1* 和 *FmRHM2*。

2 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 生物信息学分析

2.1 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 理化性质分析、亚细胞定位、跨膜区域分析 通过 ProtParam 软件预测重组蛋白的理化性质 (表 2),推测的 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 编码的蛋白均属于稳定和亲水性蛋白;且 TMHMM 2.0 预测显示何首乌 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 蛋白均无跨膜区域。

Table 2 Physicochemical property of FmRHM protein from *F. multiflora*

Protein	Molecular formula	Molecular weight/kDa	Theoretical pI	Instability index (II)	GRAVY	TMD
FmRHM1	$\text{C}_{3387}\text{H}_{5282}\text{N}_{910}\text{O}_{1002}\text{S}_{26}$	75.62	6.20	31.42	-0.359	none
FmRHM2	$\text{C}_{3377}\text{H}_{5257}\text{N}_{907}\text{O}_{1012}\text{S}_{28}$	75.65	7.19	28.34	-0.394	none

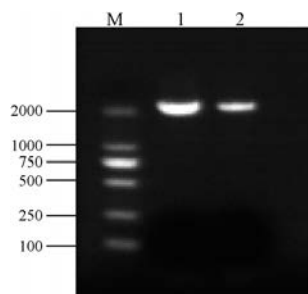


Figure 2 Cloning of *FmRHM* gene from *F. multiflora*. M: DNA marker; 1: PCR product of *FmRHM1* gene; 2: PCR product of *FmRHM2* gene

2.2 FmRHM1 和 FmRHM2 蛋白的二级结构分析及三维结构预测 结果显示, 预测 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 基因编码蛋白的二级结构由无规则卷曲 (random coil)、 α -螺旋 (α -helices)、延伸链 (extended strand) 和 β -折叠 (β -turn) 组成 (图3), 且大部分由无规则卷曲和 α -螺旋组成 (表3), 推测两者是其主要的二级结构元件, 同时 α -螺旋、 β -折叠和延伸链散布于整个蛋白中。

Table 3 Secondary structure of FmRHM protein from *F. multiflora*

Protein	Random coil	α -Helices	Extended strand	β -Turn
FmRHM1	35.97%	40.90%	15.97%	7.16%
FmRHM2	40.75%	36.57%	16.42%	6.27%

将 FmRHM1 和 FmRHM2 的氨基酸序列通过 SWISSMODEL Workspace 在线分析软件建立三维结构模型, 选择 AtRHM (PDB No.: 4QQR) 的蛋白结构为模板^[20], 对 FmRHM1 和 FmRHM2 结构进行预测, 所得三维结构如图4所示。两个蛋白与 AtRHM 蛋白的相似度分别为 82% 和 83%, 因 FmRHM1 和 FmRHM2 的氨基酸序列相似度很高, 所以在蛋白三维结构模型上较难看出区别。

2.3 何首乌 FmRHM 氨基酸序列和系统进化树分析 将何首乌 FmRHM 氨基酸序列与 GenBank 蛋白数据库中进行同源比对, 通过 DNAMAN 软件与多种植物进行多序列比对分析, FmRHM1 和 FmRHM2 与其他物

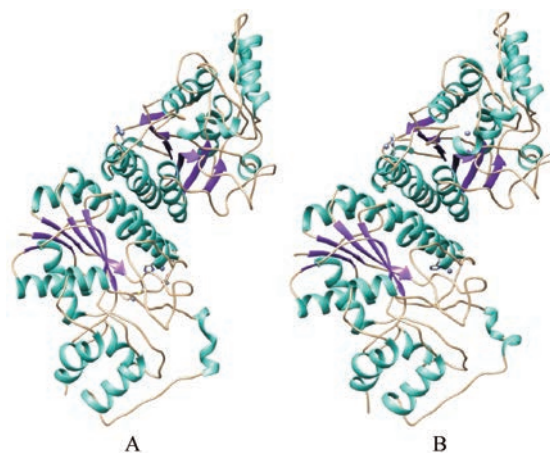


Figure 4 The deduced three-dimensional structure of FmRHM protein. A: Protein of FmRHM1; B: Protein of FmRHM2

种 RHM 同源性很高, 达 85% 以上。将 FmRHM1 和 FmRHM2 与拟南芥、虎眼万年青、茶树的 RHM 进行详细比对, 发现 FmRHM 与这些植物 RHM 的 N-端和 C-端高度相似, 而这两个功能单元, 在拟南芥 RHM2 的体外酶活性分析发现, N-端区具有较强的 UDP-葡萄糖 4, 6-脱水酶活性, 而 C-端区域则同时具有 UDP-4K6DG 3,5-差向异构酶和 UDP-4KR 4-酮-还原酶活性^[21]。且 FmRHM1 和 FmRHM2 每个功能单元中均存在 NADP (H) 结合位点 (GxxGxxG/A) 和类似 RmlD 酶结构的活性中心, 即 YxxxK 模序 (图5)。

为了进一步了解何首乌 FmRHM1/2 蛋白在植物 RHM 家族中的进化位置, 将 FmRHM1/2 与 NCBI 中 51 条 RHM 氨基酸序列进行系统发育分析, 其中包括细菌、真菌、蕨类植物和苔藓门, 以及植物中 RHM 序列, 包括乔木类植物甜橙、葡萄等, 模式植物拟南芥, 以及其他植物如大豆、虎眼万年青等, 利用 MEGA 6.0 构建系统进化树。结果表明, 不同来源的 RHM 最后聚为一支, 表明其具有共同的祖先, 且在被子植物中分为双子叶植物和单子叶植物两类, 何首乌中的 2 个 RHM 均归属于双子叶植物一类; 另外, FmRHM2 与双子叶植物陆地棉距离较近, 而 FmRHM1 则单独聚为一支 (图6)。

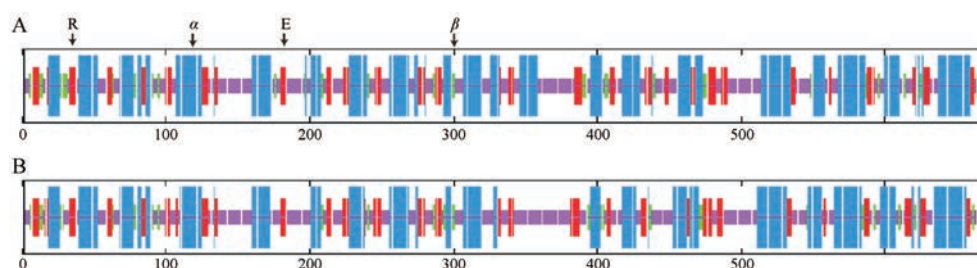


Figure 3 Predicted secondary structure of FmRHM protein with SOPMA. A: Protein of FmRHM1; B: Protein of FmRHM2; α : α -Helices; β : β -Turn; E: Extended strand; R: Random coil

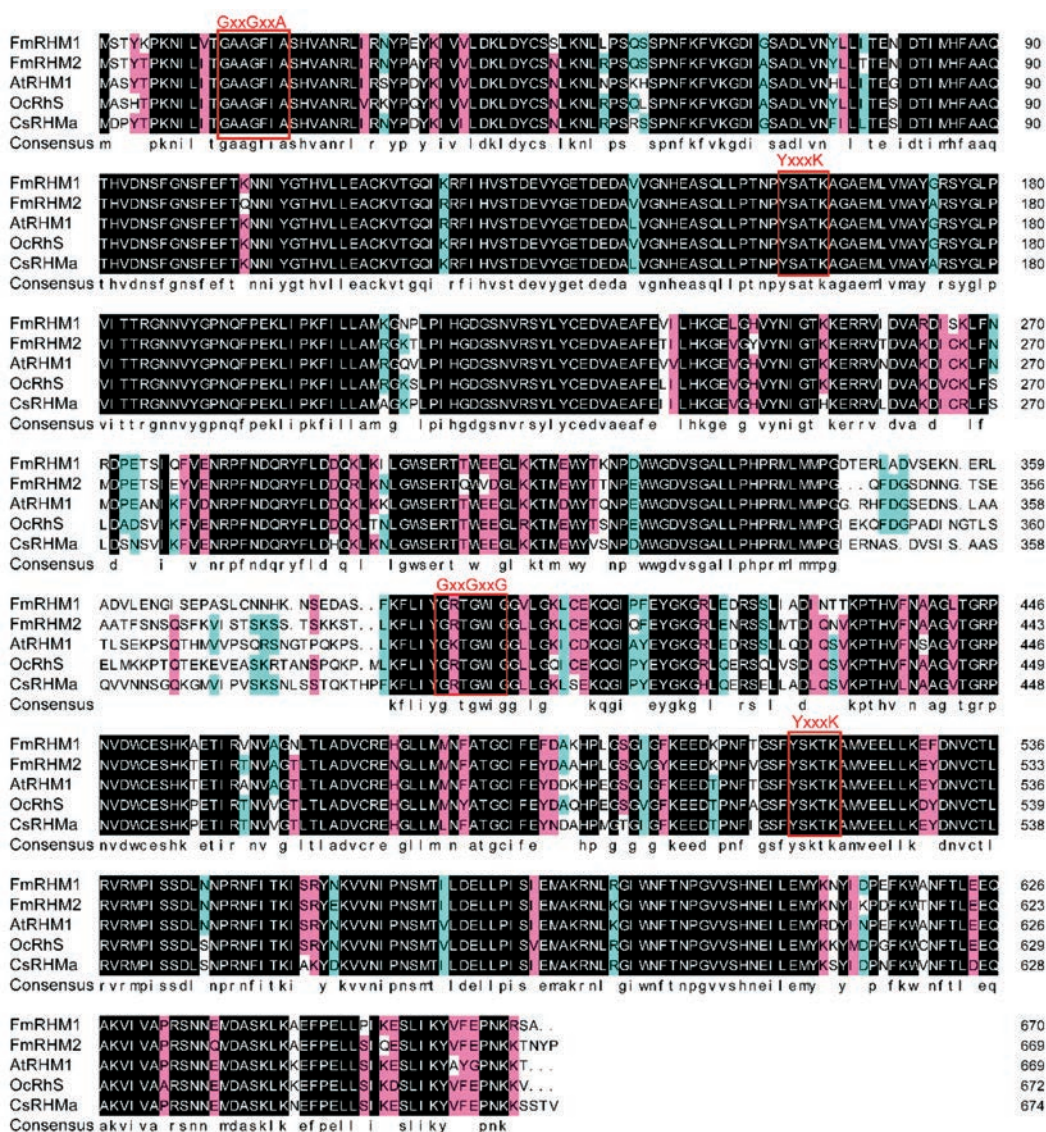


Figure 5 Multiple sequence alignment of FmRHM and RHM1 from other plant species. Fm: *F. multiflora*; At: *Arabidopsis thaliana*; Oc: *Ornithogalum caudatum*; Cs: *Camellia sinensis*

3 FmRHM 与 AtUGT78D1 原核表达分析

本研究用 pET28a 为表达载体, 利用同源重组原理构建 pET28a-FmRHM 重组原核表达载体, 并转化 *Transsetta* (DE3) 感受态大肠杆菌进行诱导表达蛋白。SDS-PAGE 电泳结果表明, 经诱导后, 与未连接目的基因的 pET28a 空载诱导蛋白及未诱导的含目的基因载体表达的蛋白对比。在约 70 kDa 和 52 kDa 附近, 诱导样品 6、7 和 8 出现明显的蛋白条带 (图 7)。FmRHM1 和 FmRHM2 的预测分子质量大小均约为 75 kDa, AtUGT78D1 的预测分子质量约为 50 kDa, 所以这 3 个蛋白条带分别为诱导表达的 FmRHM 重组蛋白和 AtUGT78D1 重组蛋白。

4 FmRHM 酶促反应检测

在酶促反应液中加入 UDP-鼠李糖合成酶和糖

基转移酶共同反应, 检测反应液中糖苷的形成。HPLC 检测结果显示 (图 8), 所有样品均在保留时间约为 4.17 min 处出现色谱峰, 与标准品中的槲皮素-3-O-葡萄糖苷 (S1) 的出峰时间相近, 说明反应液中均生成槲皮素-3-O-葡萄糖苷; 在槲皮素 (S3) 的出峰时间 8.48 min 处未见明显峰, 说明槲皮素大部分已被 AtUGT78D1 酶转化为糖苷, 所以检测量较低; 更重要的是, 重组表达质粒组与空载对照组相比, FmRHM1 和 FmRHM2 组均在保留时间约为 5.10 min 处出现明显色谱峰, 与槲皮素-3-O-鼠李糖苷 (S2) 的出峰时间一致, 对照组却未在此出现明显峰, 证明重组质粒组的反应液中生成了 UDP-Rha, 从而使 AtUGT78D1 酶能利用除 UDP-Glc 外的 UDP-Rha 为糖基供体, 生成槲皮素 3-O-鼠李糖苷。结果验证了所得 FmRHM 重组蛋白

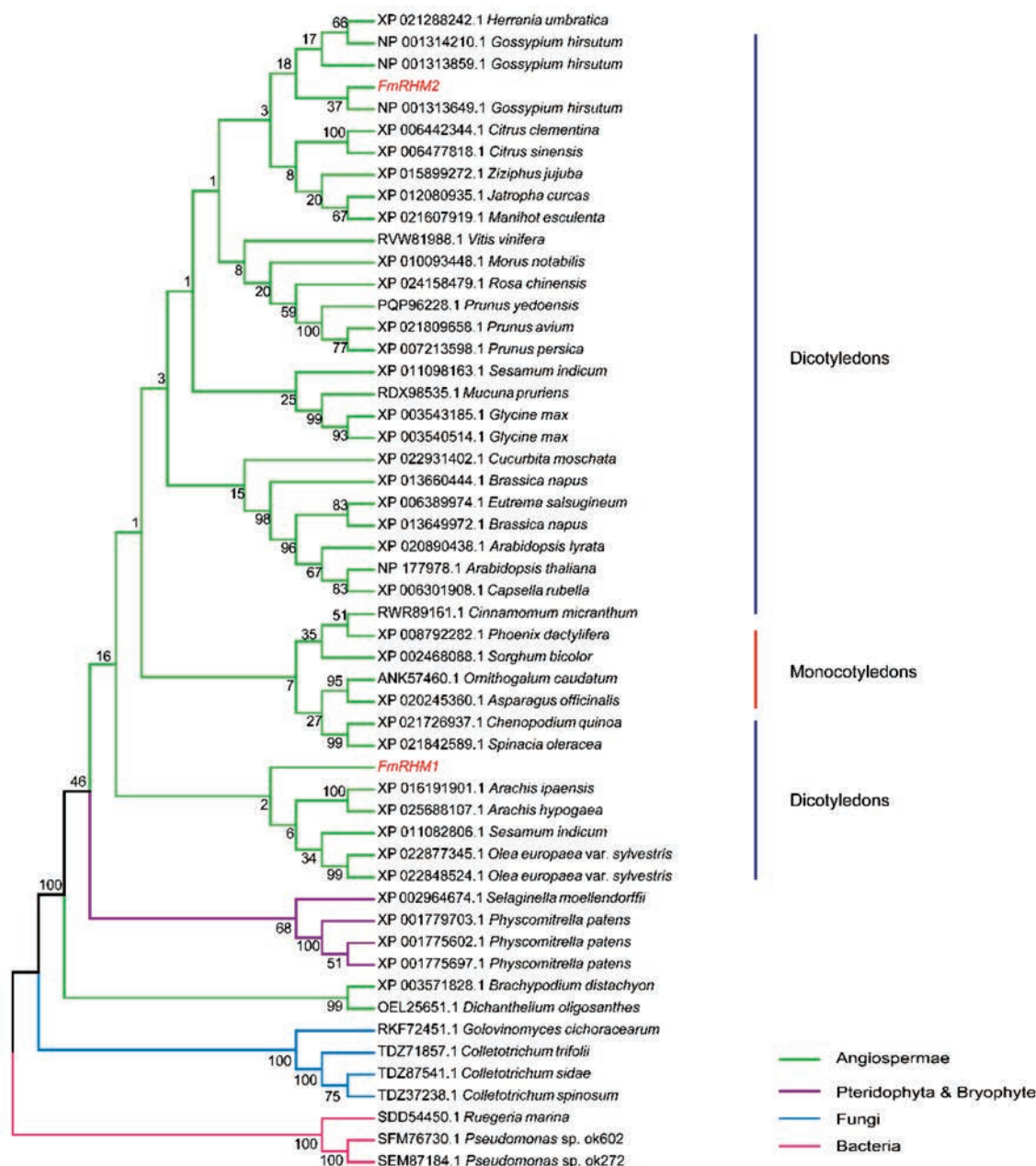


Figure 6 Phylogenetic analysis of *FmRHM1* and *FmRHM2* from *F. multiflora*

均具有生物学活性,可在体外催化UDP-Glc转化生成UDP-Rha。

5 *FmRHM* 基因组织特异性表达分析

采用qRT-PCR方法分析 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 基因在何首乌不同组织(包括根、茎、叶)中的相对表达量,图9表示两个基因在根、茎、叶中的相对表达水平, *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 在根中的表达量均最低。尽管 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 编码的蛋白在体外具有相同功能,但它们的表达水平是不同的。显著性差异分析结果显示, *FmRHM1* 在茎、叶中的表达水平与根之间的差异均具有显著性,但茎叶间的相对表达量相近,差异

不显著;而 *FmRHM2* 在不同组织间的表达水平均存在显著性差异,表达量呈现叶 > 茎 > 根的结果。

讨论

鼠李糖是许多天然有效产物的一部分,UDP-Rha是一种活化形式的L-鼠李糖,参与鼠李糖苷的生物合成,RHM是植物鼠李糖合成的关键酶。目前,尚未有何首乌中关于RHM基因的相关研究,本研究首次在从何首乌中扩增得到2个RHM基因(*FmRHM1*和*FmRHM2*)全长,并对其进行生物信息学分析;以拟南芥中RHM蛋白为模板进行同源建模,构建了*FmRHM1*

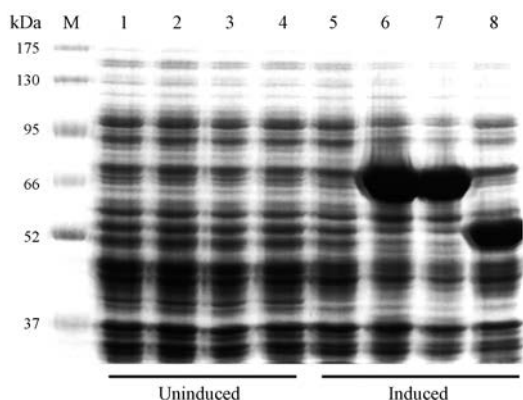


Figure 7 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant FmRHM1 and AtUGT78D1. M: Protein molecular weight marker (Beyotime, China); 1-4: Uninduced protein; 5-8: Induced protein; 1, 5: Empty vector protein; 2, 6: Recombinant protein of FmRHM1; 3, 7: Recombinant protein of FmRHM2; 4, 8: Recombinant protein of AtUGT78D1

和 FmRHM2 蛋白的三维结构; 多序列比对分析发现 2 个 FmRHM 含有植物中 RHM 的 2 个高度保守结构 (GxxGxxG/A 和 YxxxK), GxxGxxG/A 是酶促反应辅因子 NADP(H) 的结合模序, 而辅因子 NAD⁺ 则结合 YxxxK 结构, 有趣的是在序列的 N-端和 C-端均存在这两种结构, 暗示所得的两个 FmRHM 均具有将 UDP-Glc 转化为 UDP-Rha 的催化能力; 进化分析结果表明 FmRHM 与其他物种 RHM 存在同源性。另外, 本研究

通过构建原核表达载体 pET28a-FmRHM, 诱导表达重组蛋白, 并通过加入 FmRHM 和拟南芥糖基转移酶进行酶促反应检测鼠李糖苷的生成, 证实了表达的 FmRHM 蛋白具有催化合成 UDP-Rha 的功能。植物中含糖类化合物的生物合成存在许多未知, 因此, 采用 qRT-PCR 方法研究 *FmRHM* 基因在何首乌不同组织中的表达水平, 旨在探讨 RHM 在鼠李糖类小分子化合物生物合成中可能存在的作用。数据显示何首乌 RHM 基因存在组织特异性表达, 且 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 在不同组织中的表达水平不同, 总体来说, 在叶和茎中均表现出较高的表达量, 暗示 RHM 基因可能参与某种鼠李糖类化合物的合成, 在叶和茎发育过程中起主要作用。

目前, 通过生物合成核苷酸糖的实际应用还很少, 并且合成方法还不够完善, 如 UDP-Xyl^[22] 合成过程中存在需要多种酶参与, 反应步骤多, 反应效率较难控制, 合成费用高等问题。然而, 在本研究中所提出的何首乌基因所编码的酶, 只需要单酶参与反应便能合成 UDP-Rha。作为鼠李糖基供体, UDP-Rha 是鼠李糖苷生物合成所必需的, 也是植物细胞壁组成中不可缺少的。毫无疑问, 这两个基因的成功鉴定为全面分析含鼠李糖多糖的生物合成途径奠定了良好的基础, 提供了一种简单快速合成 UDP-鼠李糖的方法, 目前该技术尚未在商业上使用。本研究阐述了利用植物基因合成

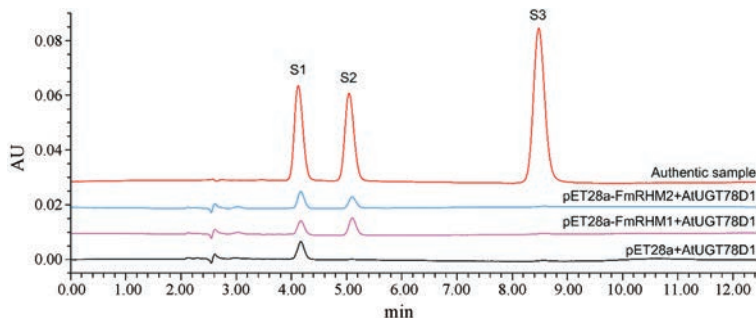


Figure 8 HPLC analyses of the reaction products from UDP-Glc catalyzed by the FmRHM; S1: Authentic sample of quercetin-3-O-glucoside; S2: Authentic sample of quercetin-3-O-rhamnoside; S3: Quercetin

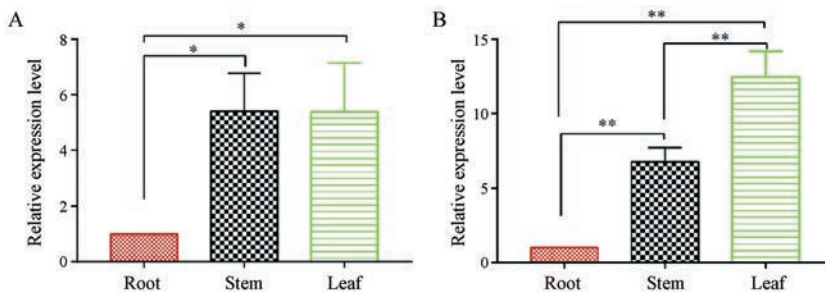


Figure 9 Relative expression level of *FmRHM* gene in different tissues. A: *FmRHM1*; B: *FmRHM2*. Note: Repeat 3 samples, each for 3 times. The vertical bars represent the standard error of the means of independent replicates. One-way ANOVA was used to compare the expression difference between tissues. The significance was set at level * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$

小分子糖苷的方法, 为天然产物鼠李糖苷的生物合成奠定基础。

References

- [1] Kim BG, Kim HJ, Ahn JH. Production of bioactive flavonol rhamnosides by expression of plant genes in *Escherichia coli* [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 11143-11148.
- [2] Oka T, Nemoto T, Jigami Y. Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* RHM2/MUM4, a multidomain protein involved in UDP-*D*-glucose to UDP-*L*-rhamnose conversion [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 5389-5403.
- [3] Manzanares P, Vallés S, Ramòn D, et al. α -*L*-Rhamnosidases: old and new insights//Polaina J, MacCabe AP (eds) *Industrial Enzymes* [M]. Dordrecht: Springer, 2007: 117-140.
- [4] Rho HS, Ghimeray AK, Yoo DS, et al. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties [J]. *Molecules*, 2011, 16: 3338-3344.
- [5] Choi HJ, Kim JH, Lee CH, et al. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Antiviral Res*, 2009, 81: 77-81.
- [6] Hayder N, Bouhlel I, Skandrani I, et al. *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-*O*-galactoside and myricetin-3-*O*-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray [J]. *Toxicol in Vitro*, 2008, 22: 567-581.
- [7] Diantini A, Subarnas A, Lestari K, et al. Kaempferol-3-*O*-rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth. inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3: 1069-1072.
- [8] Kamsteeg J, Brederode JV, Nigtevecht GV. The formation of UDP-*L*-rhamnose from UDP-*D*-glucose by an enzyme preparation of red campion (*Silene dioica* (L) Clairv) leaves [J]. *FEBS Lett*, 1978, 91: 281-284.
- [9] Jiang XM, Neal B, Santiago F, et al. Structure and sequence of the rfb (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2) [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 5: 695-713.
- [10] Yoo HG, Kwon SY, Karki S, et al. A new route to dTDP-6-deoxy-*L*-talose and dTDP-*L*-rhamnose: dTDP-*L*-rhamnose 4-epimerase in *Burkholderia thailandensis* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 3914-3917.
- [11] Giraud MF, Leonard GA, Field RA, et al. RmlC, the third enzyme of dTDP-*L*-rhamnose pathway, is a new class of epimerase [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 398-402.
- [12] Blankenfeldt W, Kerr ID, Giraud MF, et al. Variation on a theme of SDR: dTDP-6-deoxy-*L*-lyxo-4-hexulose reductase (RmlD) shows a new Mg²⁺-dependent dimerization mode [J]. *Structure*, 2002, 10: 773-786.
- [13] Martinez V, Ingwers M, Smith J, et al. Biosynthesis of UDP-4-keto-6-deoxyglucose and UDP-rhamnose in pathogenic fungi *Magnaporthe grisea* and *Botryotinia fuckeliana* [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 879-892.
- [14] Zhao Y, Thorson J. A methodological comparison: the advantage of phosphorimidates in expanding the sugar nucleotide repertoire [J]. *J Org Chem*, 1998, 63: 7568-7572.
- [15] Sun Q, Li XJ, Sun J, et al. An improved P (V)-N activation strategy for the synthesis of nucleoside diphosphate 6-deoxy-*L*-sugars [J]. *Tetrahedron*, 2014, 70: 294-300.
- [16] Kim B, Jung W, Ahn J. Cloning and characterization of a putative UDP-rhamnose synthase 1 from *Populus Euramericana* Guinier [J]. *J Plant Biol*, 2013, 56: 7-12.
- [17] Casas MI, Falcone-Ferreya ML, Jiang N, et al. Identification and characterization of maize *salmon silks* genes involved in insecticidal maysin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2016, 28: 1297-1309.
- [18] Zhao MY. Chemical constituents and pharmacology from the root of *Polygonum multiflorum* [J]. *J North Pharm (北方药学)*, 2018, 15: 192-193.
- [19] Yuan W, Gao ZP, Yang JB, et al. Chemical constituents from *Polygonum multiflorum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 631-634.
- [20] Han X, Qian L, Zhang L, et al. Structural and biochemical insights into nucleotide-rhamnose synthase/epimerase-reductase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854: 1476-1486.
- [21] Han XD. Structural Studies of *L*-Sorboside Dehydrogenase and Nucleotide-Rhamnose Synthetase (山梨糖脱氢酶与鼠李糖合成酶结构与功能的研究) [D]. Tianjin: Nankai University, 2014.
- [22] Eixelsberger T, Nidetzky B. Enzymatic redox cascade for one-pot synthesis of uridine 5'-diphosphate xylose from uridine 5'-diphosphate glucose [J]. *Adv Synth Catal*, 2015, 356: 3575-3584.