

欧洲花楸中鼠李糖合成酶基因 *SaRHM*s 的克隆及鉴定

周良云¹, 李佳兴^{1,2}, 杨健², 王升², 吕朝耕², 郭兰萍^{2*}

(1. 广东药科大学中药学院, 国家中药材产业技术体系广州综合试验站, 广东 广州 510006;
2. 中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

摘要: 鼠李糖合成酶 (rhamnose synthase, RHM) 是尿苷二磷酸鼠李糖 (UDP-Rha) 生物合成的关键酶, 其在还原型辅酶I和还原型辅酶II的存在下, 可将尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-Glc) 转化为 UDP-Rha。本文以酵母提取物 (yeast extract, YE) 诱导的欧洲花楸悬浮细胞为研究材料, 基于前期转录组数据, 筛选并克隆出 2 条 *RHM* 基因, 命名为 *SaRHM1* (GenBank 登录号 MK213340) 和 *SaRHM2* (GenBank 登录号 MK213341)。*SaRHM1* 和 *SaRHM2* 基因的开放阅读框分别为 2 007、2 040 bp, 分别编码 668、679 个氨基酸, 生物信息学分析推测其分子质量分别为 75.25、76.26 kD, 理论等电点 (theoretical pI) 分别为 7.24、6.41, 两者均具有 RHM 家族的保守结构域 (GxxGxxG/A 和 YxxxK)。多重序列比对与系统进化树显示, *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 与其他物种的 RHM 具有较高的同源性。体外酶促反应显示, 重组蛋白 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 均具有将 UDP-Glc 转化为 UDP-Rha 的功能。酶促动力学参数显示, *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 反应的最佳 pH 分别为 9 和 8, 温度均为 40 °C, 其中 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 的 K_m 值分别为 212.4 ± 56.70 和 $361.0 \pm 63.74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_{\max} 值分别为 235.5 ± 18.98 和 $516.5 \pm 22.30 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ 。本研究首次报道了欧洲花楸 *RHM* 基因, 并验证了其功能, 为后续天然产物鼠李糖苷的生物合成提供鼠李糖供体。

关键词: 欧洲花楸; 鼠李糖合成酶; 尿苷二磷酸鼠李糖; 功能鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)01-0328-08

Cloning and characterization of two rhamnose synthases from *Sorbus aucuparia*

ZHOU Liang-yun¹, LI Jia-xing^{1,2}, YANG Jian², WANG Sheng², LÜ Chao-geng², GUO Lan-ping^{2*}

(1. Comprehensive Experimental Station of Guangzhou, Chinese Materia Medica, China Agriculture Research System, School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Rhamnose synthase (RHM) is a key enzyme in the biosynthesis of uridine diphosphate rhamnose (UDP-Rha), reversibly converting uridine diphosphate-glucose (UDP-Glc) into UDP-Rha in the presence of NADH or NADPH. In this research, yeast extract (YE) was used to stimulate *Sorbus aucuparia* suspension cells. Based on a previous study of the transcriptome database of *S. aucuparia* suspension cells, two RHM s were cloned from *S. aucuparia* and named *SaRHM1* (GenBank No.: MK213340) and *SaRHM2* (GenBank No.: MK213341). The *SaRHM1* gene contained a 2 007 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 668 amino acids with a molecular weight of 75.25 kD, and a theoretical isoelectric point (pI) of 7.24. The *SaRHM2* gene contained a 2 040 bp ORF encoding a polypeptide of 679 amino acids with a molecular weight of 76.26 kD and pI of 6.41.

收稿日期: 2020-07-27; 修回日期: 2020-08-19.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1700701); 国家自然科学基金项目 (81703648, 81603239, 81891014); 广东省普通高校青年创新人才类项目 (2018KQNCX133).

*通讯作者 Tel: 86-10-64011944, E-mail: glp01@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1247

Bioinformatic analysis indicated that *SaRHM1* and *SaRHM2* contained two special sequences of GxxGxxG/A and YxxxK. Multiple sequence alignments and phylogenetic trees show that *SaRHM1* and *SaRHM2* have high sequence similarity with other plant species of RHMs. The results of enzyme activity assays *in vitro* revealed that both recombinant *SaRHM1* and *SaRHM2* are able to convert UDP-Glc into UDP-Rha. *SaRHM*s displayed maximum activity at 40 °C and a pH of 8 and 9, respectively. The K_m values of *SaRHM1* and *SaRHM2* for UDP-Glc were 212.4 ± 56.70 and $361.0 \pm 63.74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, with V_{max} values of 235.5 ± 18.98 and $516.5 \pm 22.30 \text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$, respectively. This study reports the cloning and sequencing of RHMs from *S. aucuparia* and verifies their function, which likely provide rhamnose donors for the subsequent biosynthesis of rhamnosides.

Key words: *Sorbus aucuparia*; rhamnose synthase; UDP-Rha; function characterization

鼠李糖是自然界中广泛分布的 6-脱氧己糖, 是植物细胞壁的果胶多糖成分^[1]。含鼠李糖多糖的细胞壁对于维管植物的生长和发育具有重要的作用^[2]。尿苷二磷酸鼠李糖 (UDP-Rha) 可作为糖供体与小分子化合物糖基化生成次生代谢产物鼠李糖苷。而鼠李糖苷的生成在一定程度上可增加苷元的溶解度, 其生物活性也发生一定的变化。例如, 槲皮素 3-*O*-鼠李糖苷对流感病毒复制具有阻断作用^[3]; 杨梅素-3-*O*- β -鼠李糖苷可促进成纤维细胞迁移, 并加速植物伤口愈合^[4], 可见鼠李糖糖基化产物具有多种生物活性。植物中的鼠李糖合成酶 (RHM) 可直接将胞浆中的 UDP-Glc 转化成 UDP-Rha, 该酶兼具 UG4,6-Dh、UDP-4K6DG 3,5-差向异构酶和 UDP-4KR 4-酮-还原酶 3 种酶的功能^[2], 其氨基酸序列存在 NADP(H) 结合位点 (GxxGxxG/A) 和类似 RmlD 酶结构的活性中心 (YxxxK)^[5]。

欧洲花楸 (*Sorbus aucuparia* L.) 为蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Pyrinae) 花楸属植物, 原产于欧洲和亚洲西部, 分布于我国北方部分地区^[6]。其果实、枝叶及茎皮皆可入药, 富含抗坏血酸、酚类化合物、有机酸及糖, 具有抗炎、抗糖尿病和抗氧化等作用^[7]。欧洲花楸悬浮细胞体系对外界胁迫具有较好的响应作用。据报道, 欧洲花楸悬浮细胞在酵母提取物 (yeast extract, YE) 诱导下可产生新的次生代谢产物, 包括欧花楸素、3-羟基-5-甲氧基联苯和 2'-羟基欧花楸素等联苯类化合物^[8,9], 其对苹果和梨等植物中破坏性较强的火疫病的致病菌 (欧文氏菌 *Erwinia amylovora*) 有一定的抑制作用^[10], 被称为苹果亚科植物植保素。研究发现, 联苯糖苷可能是苹果亚科植物应对外界胁迫的重要物质^[11,12]。但目前对联苯糖苷及其活性的报道较少, 为探索更多类型的联苯糖苷, 本研究从寻找糖基供体入手, 为后续进一步利用生物合成的方法合成联苯糖苷提供分子基础。课题组前期利用 YE 诱导欧洲花楸悬浮细胞, 并进行了转录组测序。本研究基于转录组数据筛选并克隆了 2 条 *SaRHM*s, 为后续联苯鼠李糖苷的生物合成提供鼠李糖供体。

材料与方法

材料 欧洲花楸悬浮细胞系由中国科学院植物研究所叶和春研究员赠送, 置于 25 °C 培养箱中暗培养, 转速为 120 r·min⁻¹, 每 14 天继代 1 次。5810R 型低温冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), Nano Drop 2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 紫外凝胶成像分析仪 (Gene, 中国), MM400 冷冻混合研磨仪 (Retsch, 德国)。高效液相色谱串联质谱仪 (Waters Acquity I-Class UPLCTM 串联 Waters Zevo G2-S Q-TOF MS) (Waters, 美国), 色谱柱为: BEH Amide 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)。液相色谱仪: Waters Acquity H-Class UPLCTM 超高效液相色谱仪 (Waters, 美国)。

特异性引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成, KOD-Plus-Neo 高保真酶购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司, 2×TSINGKE Master Mix 购自北京擎科新业生物技术有限公司, Power SYBR Green PCR Master Mix、*Bam*I/*Not*I-HF/*Sca*I/*Eco*RI 限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司, T₄-DNA 连接酶、 β -巯基乙醇、异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、还原型辅酶 I (NADH)、还原型辅酶 II (NADPH) 和尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-Glc) 均购自北京江晨生物技术公司。Ni-琼脂糖树脂柱 (Ni-Agarose Resin) 购自康为世纪生物科技有限公司。质粒小提试剂盒、胶回收纯化试剂盒、植物总 RNA 提取试剂盒、大肠杆菌 *Trans*1-T1 和大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 均购自北京全式金生物技术有限公司。

总 RNA 提取及 cDNA 合成 欧洲花楸悬浮细胞培养 5 d 后给予 YE 诱导, 终浓度为 3 g·L⁻¹。诱导时间设定为 0、4、8、12、24 h。收取样品用液氮速冻后, 置于 -80 °C 冰箱保存。按照植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 将质量合格的 RNA 用反转录试剂盒获得 cDNA, 用于本实验研究的基因克隆。

基因克隆与载体构建 参考欧洲花楸悬浮细胞转录组数据结合 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

BLAST, 获得鼠李糖合成酶 *RHM* 基因序列和开放阅读框 (open reading frame, ORF), 设计 cDNA 全长克隆引物 (表 1)。根据 KOD-Plus-Neo 高保真酶说明书配制 PCR 体系: ddH₂O 32 μ L、10 \times PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 5 μ L、2 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 5 μ L、25 mmol \cdot L⁻¹ MgSO₄ 3 μ L、正反向引物各 2.5 μ L、cDNA 1 μ L 和 KOD-Plus-Neo 1 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 重复 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 分别用 *Bam*I/*Not*I-HF 和 *Sca*I/*Eco*RI 两对限制性内切酶双酶切 PCR 反应产物, 反应体系如下: ddH₂O 21 μ L、NE Buffer 5 μ L、pET28a 载体 13 μ L 和限制性内切酶各 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 5 h。蛋白表达载体 pET28a 同时进行酶切反应。将酶切产物纯化后, 按 T₄-DNA 连接酶说明书将目的片段与载体连接, 并转化至大肠杆菌 *Trans*1-T1 克隆感受态细胞中, 涂布在含有 50 mg \cdot L⁻¹ Kan 的 LB 固体培养基上过夜培养, 选取单克隆进行菌液 PCR, 并将阳性结果送公司测序验证。将获得的重组质粒 pET28a-SaRHM1 和 pET28a-SaRHM2, 分别转化至大肠杆菌 *Trans*etta (DE3) 表达感受态细胞中, 涂布在含有 50 mg \cdot L⁻¹ Kan 的 LB 固体培养基上过夜培养, 选取单克隆进行菌液 PCR, 并将阳性结果送公司测序验证。

Table 1 Sequences of primers used in the *SaRHM*s cloning

Primer name	Primer sequences (5'-3')
<i>SaRHM1</i> -R	GAGGGATCCATGGGTTTCATATACCCCAA
<i>SaRHM1</i> -F	GAGGCGCCGCTTACGCTTCTGTGTTG GTCAAAG
<i>SaRHM2</i> -R	GAGGAATTCATGGATACTGCGTATAAAC GAAGA
<i>SaRHM2</i> -F	GAGGAGCTCTTAAATTGCTGCTCCACCTG

欧洲花楸 *SaRHM*s 的生物信息学分析 将测序得到的序列通过 InterPro 在线软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan>) 进行结构域分析。通过 ExPASy ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白分子质量和理论等电点。根据 NCBI BLAST 结果下载同源序列, 分别使用 DNAMAN 软件和 MEGA 5.0 软件进行多重序列比对和系统进化树的构建。SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析。TRMHMM server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜域分析。PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 进行二级结构预测和二级结构分析。

SaRHMs 重组蛋白表达及纯化 将保存的菌液扩大培养于 100 mL 含有 50 mg \cdot L⁻¹ Kan 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 250 r \cdot min⁻¹ 摇到 A₆₀₀ 约 0.6, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 0.4 mmol \cdot L⁻¹, 16 $^{\circ}$ C、200 r \cdot min⁻¹

诱导 12 h。将诱导完的菌液 4 $^{\circ}$ C、8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min 收集菌体, 用 ddH₂O 清洗 2 次, 最后用 10 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 重悬菌体。将重悬菌液置于冰中, 用超声波细胞破碎机超声破碎 (30% 功率, 超声 5 s, 间隔 5 s, 持续 5 min), 破碎后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 上清即为蛋白粗提物。

按照 Ni-Agarose Resin 说明书, 将 Ni-Agarose Resin 填料混匀后加入色谱柱, 室温静置 10 min, 将保存液乙醇放出, 用 5 倍柱体积的去离子水洗净乙醇, 再用 10 倍柱体积的磷酸盐缓冲液平衡镍柱后上样, 控制流速为每小时 10 倍柱体积, 用 10 倍柱体积的 20 mmol \cdot L⁻¹ 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱杂蛋白, 用 200 mmol \cdot L⁻¹ 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱 SaRHM1 和 SaRHM2 蛋白, 最后依次用 5 倍柱体积 500 mmol \cdot L⁻¹ 咪唑的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和 ddH₂O 洗涤镍柱, 最后用 20% 乙醇封存镍柱于 4 $^{\circ}$ C 冰箱。将含 SaRHM1 和 SaRHM2 蛋白的流分通过 10 kD 超滤管进行脱盐浓缩, 以牛血清蛋白作标准用 Bradford 方法 (Bio-Rad Protein Assay Kit) 测浓度, 并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳检测。

SaRHMs 重组蛋白酶促反应检测 酶促反应体系: 总体积 200 μ L, 包含 SaRHM1 和 SaRHM2 蛋白 20 μ g、1.25 mmol \cdot L⁻¹ NADPH、1.25 mmol \cdot L⁻¹ NADH、1 mmol \cdot L⁻¹ UDP-Glc、20 mmol \cdot L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5)^[13]。以未连接目的基因的 pET28a 空载表达蛋白作为对照组。将反应混合物在 40 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h 后, 加甲醇 400 μ L 终止反应, 充分振荡, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液于 UPLC-Q-TOF-MS 进行检测。液相检测条件为: 流动相: 25 mmol \cdot L⁻¹ 95% 乙酸铵-乙腈 (pH 5.5) (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~0.5 min, 70% B; 0.5~3.5 min, 70%~60% B; 3.5~6.5 min, 60% B; 6.5~8.0 min, 60%~55% B; 8.0~9.0 min, 55% B; 9.0~9.5 min, 55%~70% B; 流速: 0.2 mL \cdot min⁻¹, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 进样量: 1.0 μ L。质谱检测条件: 离子化模式为负离子, 毛细管电压为 2 500 V, 锥孔电压为 30 V, 除溶剂气体为氮气, 900 L \cdot h⁻¹, 除溶剂温度为 450 $^{\circ}$ C, 离子源温度为 100 $^{\circ}$ C, 扫描范围为 *m/z* 50~1 400, 碰撞气体为氩气。低能量扫描时 trap 电压为 6 eV, 高能量扫描时 trap 电压为 35~65 eV。准确质量数用亮氨酸脑啡肽 (leucine enkephalin) 作校正液。

SaRHMs 重组蛋白酶促动力学分析 为确定两种纯化重组蛋白催化的最佳 pH 和最佳温度, 依次设置不同 pH 梯度及温度梯度。每个 SaRHM 反应混合物的总体积为 200 μ L, 包含 20 μ g 纯化的 SaRHM 蛋白、

1.25 mmol·L⁻¹ NADPH、1.25 mmol·L⁻¹ NADH、1 mmol·L⁻¹ UDP-Glc, 缓冲液分别为 20 mmol·L⁻¹ 柠檬酸钠缓冲液 (pH 5~7)、20 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7~9) 和 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7~10), 反应温度分别设置为 10、20、30、40、50 和 60 °C, 孵育 1 h。通过热处理 (100 °C) 10 min 终止反应, 每个反应重复 3 次。将混合物以 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液于高效液相色谱进行检测, 计算反应物 UDP-Glc 剩余量^[7]。使用 Graphpad Prism 6.02 软件计算动力学值。

结果与讨论

1 *SaRHM*s 基因 cDNA 的克隆

以欧洲花楸悬浮细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在 2 000 bp 附近有明亮条带 (图 1), 与预期目的条带大小一致。测序结果表明, *SaRHM1* 的 ORF 大小为 2 007 bp, 编码 668 个氨基酸; *SaRHM2* 的 ORF 大小为 2 040 bp, 编码 679 个氨基酸。

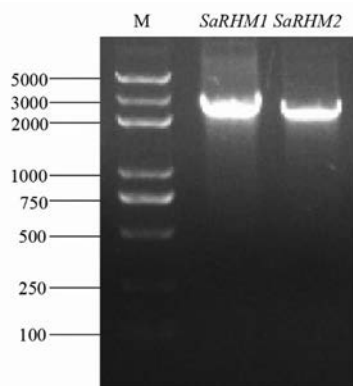


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the full-length cDNA of *SaRHM1* and *SaRHM2*

2 *SaRHM*s 蛋白的生物信息学分析

SaRHM1 和 *SaRHM2* 蛋白的分子质量分别为 75.25 和 76.26 kD, 理论等电点分别为 7.24 和 6.41; 信号肽分析显示无信号肽; 跨膜域分析结果表明其为非膜蛋白, 无分泌蛋白。结构域分析表明: *SaRHM*s 的 N 端区域 (*SaRHM1*: 10~315 aa; *SaRHM2*: 11~316 aa) 含有 NADP(H) 结合位点, 而 C 端区域 (*SaRHM1*: 385~557 aa; *SaRHM2*: 389~561 aa) 含有类似 RmlD 酶结构的活性中心, 表明这两个基因可能均具有将 UDP-Glc 转化为 UDP-Rha 的生物活性。二级结构预测结果显示: 无规则卷曲和 α -螺旋结构是 *SaRHM1* 主要结构元件, 无规则卷曲占 51.35%、 α -螺旋结构占 33.68%; 无规则卷曲和 α -螺旋结构是 *SaRHM2* 主要结构元件, 无规则卷曲占 54.64%、 α -螺旋结构占 30.34%。

3 同源性比对及系统进化树分析

BLASTP 对比结果显示 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 与 NCBI 基因库的同源性达 80%, 包括桃 *Prunus persica* PpRHM (XP_007215006.1)、川桑 *Morus notabilis* MnRHM1 和 MnRHM2 (XP_010109352.1 和 XP_010093448.1)、可可 *Theobroma cacao* TcRHM (EOX92988.1)、虎眼万年青 *Albuca bracteata* AbRHM (ANK57460.1)、欧洲栓皮栎 *Quercus suber* QsRHM (XP_023887068.1)、枣 *Ziziphus jujuba* ZjRHM (XP_015899272.1)、欧洲甜樱桃 *Prunus avium* PaRHM (XP_021809658.1), 该结果说明 RHM 蛋白氨基酸序列在系统进化上有高度的保守性。将它们与 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 氨基酸序列进行多重序列比对, 发现 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 均存在 GxxGxxG/A 基序和 YxxxK 基序, 该基序为 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 蛋白的功能结构域^[7] (图 2)。比对结果暗示, *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 可能均为一种多功能性酶, 该酶可通过中间体 UDP-4-酮-6-脱氧葡萄糖和 UDP-4-酮-鼠李糖将 UDP-Glc 生成 UDP-Rha^[14]。为了进一步研究 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 蛋白的功能, 在 NCBI 中下载完整 RHM 蛋白的氨基酸序列, 利用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树 (图 3)。结果发现, *SaRHM1* 与欧洲栓皮栎 (XP_023887068.1)、枣 (XP_015899272.1)、川桑 (XP_010093448.1) 和欧洲甜樱桃 (XP_021809658.1) 聚为一支, 与欧洲甜樱桃的亲缘关系最近; *SaRHM2* 与可可 (EOX92988.1)、川桑 (XP_010109352.1) 和桃 (XP_007215006.1) 聚为一支, 与桃的亲缘关系最近。

4 IPTG 诱导 *SaRHM*s 蛋白表达

诱导表达的 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 蛋白经纯化后的 SDS-PAGE 扫描结果 (图 4) 表明, 在 IPTG 诱导大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 表达后, 重组蛋白 pET28a-*SaRHM1* 和 pET28a-*SaRHM2* 在近 70 kD 处有蛋白条带, 与预测的蛋白大小基本一致, 说明欧洲花楸鼠李糖合成酶基因 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 均在大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 中成功表达。

5 *SaRHM* 酶促反应检测

使用 UPLC-Q-TOF-MS 对酶促反应进行分析。对照组与实验组的基峰离子比较色谱图见图 5A, 其中图 5A-a 为对照组, 图 5A-b 为 *SaRHM1* 酶促反应实验组, 图 5A-c 为 *SaRHM2* 酶促反应实验组, 图 5B-1、5B-2 和 5B-3 分别为峰 1、2、3 的二级质谱图。通过质谱图可知, 峰 1 为 NADH (m/z 662.103 1 [M-H]⁻), 峰 2 为 UDP-Glc (m/z 565.045 7 [M-H]⁻)^[7]、峰 3 为 NADPH (m/z 744.084 7 [M-H]⁻)。由图 5A-a 可知, 对照组中未出现新的产物峰, 说明空载不能催化 UDP-Glc 生成 UDP-Rha; 与对

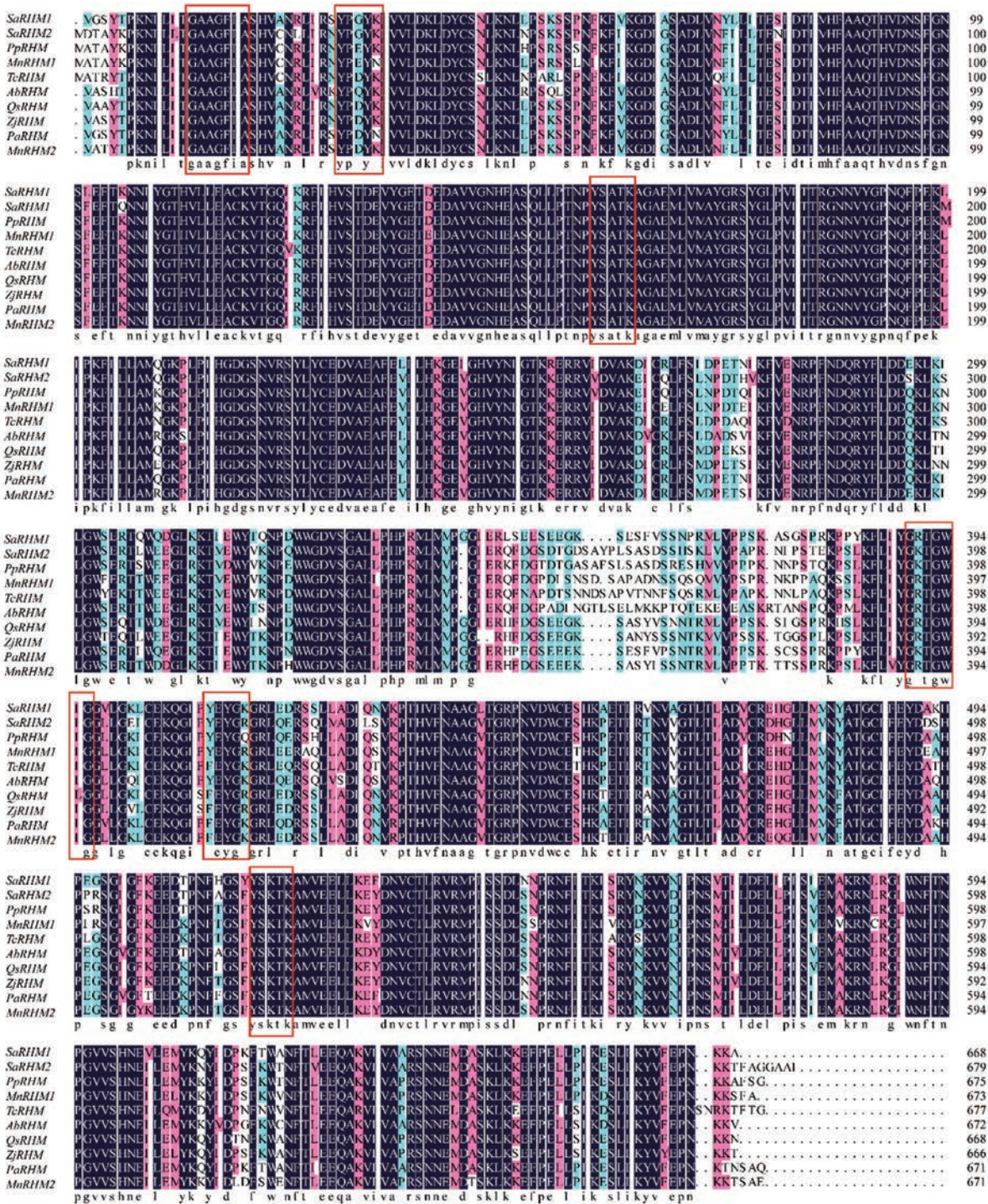


Figure 2 Multiple sequence alignment of SaRHMs and RHM proteins from other plants

照组相比, 图 5A-b 和图 5A-c 均在 5.28 min 出现了新的产物峰 (峰 4)。质谱图 (图 5B-4) 显示峰 4 的质核比 m/z 为 549.051 9 [M-H]⁻, 由此得出产物为 UDP-Rha (相对分子质量为 550), 即 SaRH1 和 SaRH2 蛋白均具有鼠李糖合成酶的功能。

6 SaRHM 酶促动力学分析

为进一步对两种 SaRHMs 蛋白的生物学特性进行

表征, 以底物 UDP-Glc 含量测量酶活性, 获得了最佳 pH、最佳温度和动力学参数。结果表明, SaRH1 在 pH 9 时显示最大活性, 而 SaRH2 在 pH 8 时显示最大活性, 最佳温度均为 40 °C (图 6)。利用 Michaelis-Menten 方程确定 SaRHMs 的 K_m 值和 V_{max} 值 (图 7)。SaRH1 和 SaRH2 的 K_m 值分别为 212.4 ± 56.70 和 $361.0 \pm 63.74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; V_{max} 值分别为 235.5 ± 18.98 和 $516.5 \pm 22.30 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ 。

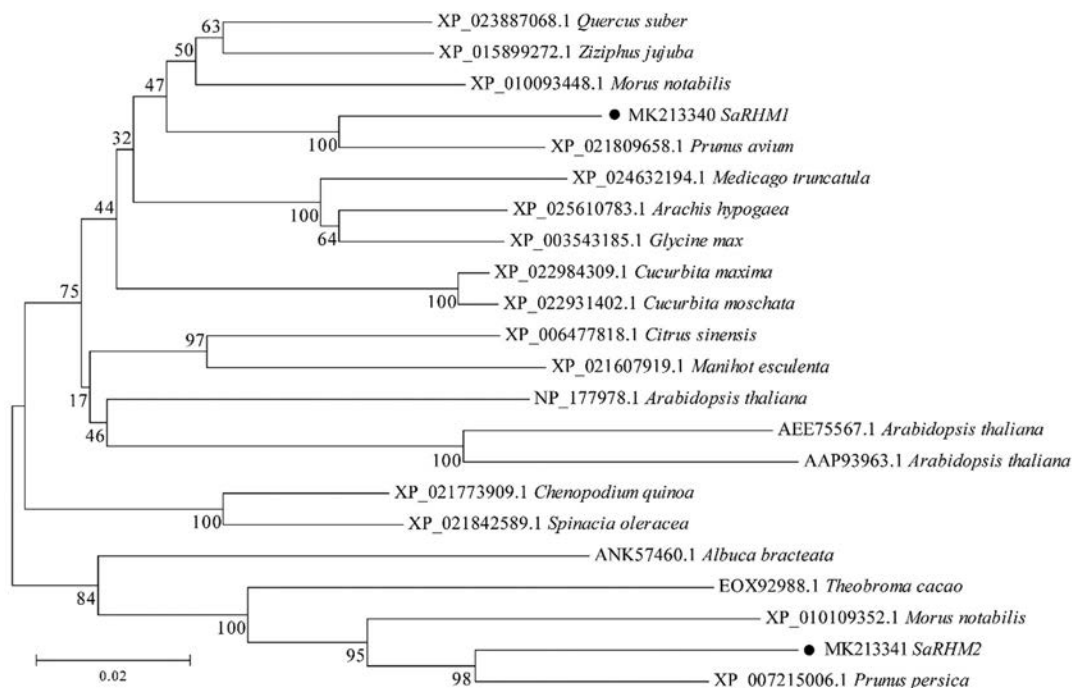


Figure 3 Phylogenetic analysis of RHM proteins. Amino acid sequences were analyzed using the clustal X2 program and the bootstrap consensus tree was constructed using MEGA 6.0 software with the neighbor-joining method and 1 000 bootstrap replicates. Black circles indicate SaRHM

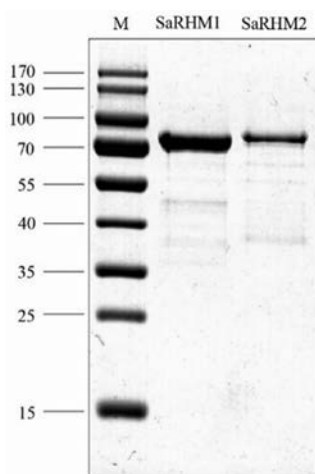


Figure 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein of SaRHM1 and SaRHM2 protein purification

讨论

UDP-Rha 是植物细胞壁果胶多糖 (鼠李半乳糖醛酸聚糖-I 和鼠李半乳糖醛酸聚糖-II) 及各种鼠李糖苷类次生代谢产物生物合成所必需的重要组分。因此, UDP-Rha 对于植物的生长发育及天然鼠李糖苷类次生代谢产物的合成具有重要的作用。研究显示, 鼠李糖苷类次生代谢物具有广泛的生物活性, 如抗炎^[15]、抗病毒^[16]、抗氧化^[17]、抗癌^[18]等作用。在植物中, UDP-Rha 的生物合成是由一个三功能酶 (RHM) 通过 3 步连

续催化反应完成^[5]。目前, 已从拟南芥^[2]、玉米^[19]等植物中克隆鉴定出相应的 *RHM* 基因, 而对药用植物中的 *RHM* 基因研究相对较少。Liu 等^[20]首次从我国传统中药何首乌中成功克隆出 2 条 *FmRHM*s, 并通过体外酶促反应证实了 *FmRHM1* 和 *FmRHM2* 均具有将 UDP-葡萄糖转化为 UDP-鼠李糖的功能。

本研究首次从欧洲花楸中克隆获得 2 个 *RHM* 基因 (*SaRHM1* 和 *SaRHM2*) 全长, 并对其进行了生物信息学分析。多重序列比对分析显示 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 均存在 GxxGxxG/A 和 YxxxK 两种基序, 暗示着 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 具有将 UDP-Glc 转化成 UDP-Rha 的潜在能力。通过构建原核表达载体, 诱导重组蛋白的表达, 利用纯化后的重组蛋白进行体外酶促反应, 结果进一步证实了 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 蛋白具有催化合成 UDP-Rha 的功能。为了进一步研究在体外具有催化功能的 2 个 RHM 的生化特性, 本文对 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 进行了酶促动力参数测定, 测定结果显示尽管 *SaRHM1* 和 *SaRHM2* 均具有将 UDP-Glc 转化成 UDP-Rha 的功能, 但是两者的催化能力存在一定的差异。

课题组前期研究显示, 欧洲花楸悬浮细胞在 YE 的诱导下可产生联苯和二苯并呋喃类植保素, 其中包含鼠李糖苷类化合物。在此条件下, 本文克隆得到 2 条 *SaRHM*s 基因, 这说明 UDP-Rha 的生物合成将为下一步鼠李糖苷类植保素的生物合成奠定物质基础。萃

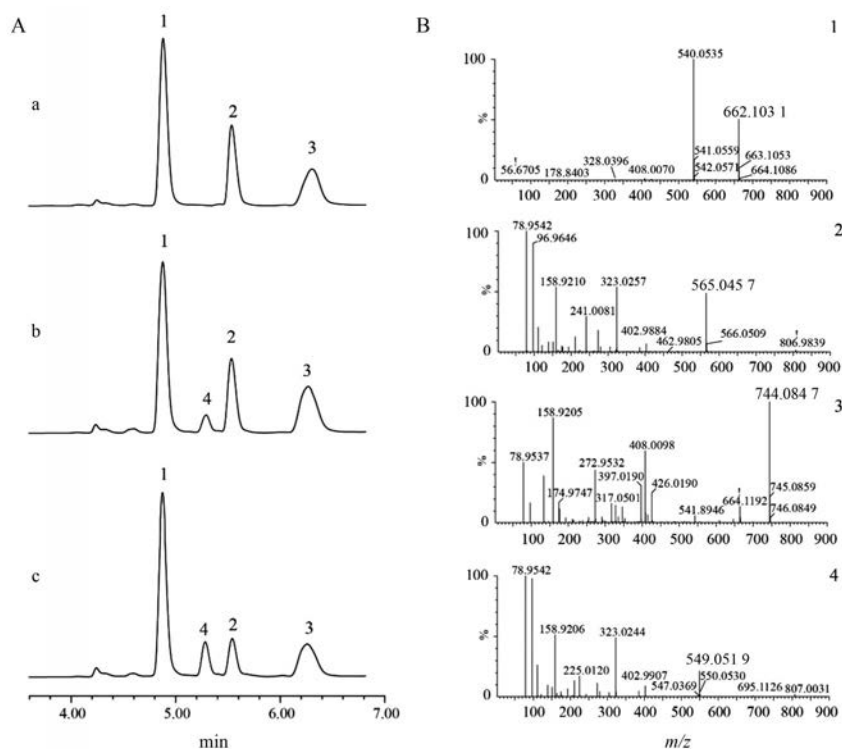


Figure 5 UPLC-Q-TOF-MS analyses of the reaction products from UDP-Glc catalyzed by the SaRHMs. (5A-a: Reaction products of empty plasmid with UDP-Glc as a substrate; 5A-b: Reaction products of SaRHM1 with UDP-Glc as a substrate; 5A-c: Reaction products of SaRHM2 with UDP-Glc as a substrate; 5B-1: MS analysis of NADH; 5B-2: MS analysis of UDP-Glc; 5B-3: MS analysis of NADPH; 5B-4: MS analysis of reaction product)

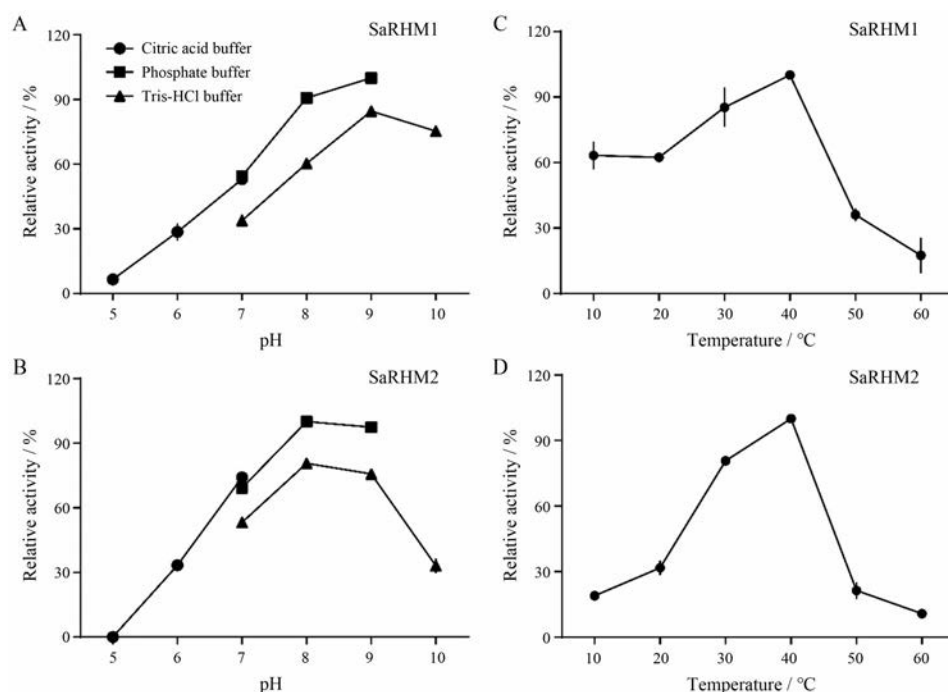


Figure 6 Effect of pH (A and B) and temperature (C and D) on SaRHM1 and SaRHM2 activity

果亚科植物在受到细菌或真菌感染后能够产生具有抗菌活性的联苯和二苯并呋喃类植保素,如 2'-羟基欧花楸素、异欧花楸素等,但目前关于植保素糖苷的抗菌活

性研究相对甚少。因此,本研究从植保素糖苷的糖供体入手,寻找可以合成 UDP-Rha 的关键酶基因,为获得具有较强抗菌活性的植保素糖苷提供 UDP-Rha 糖

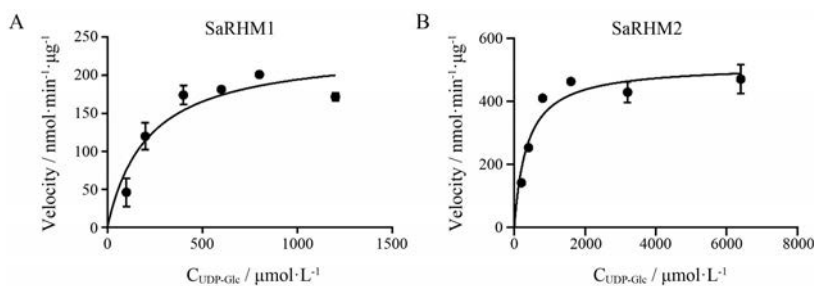


Figure 7 Determination of Michaelis constant of recombinant protein of SaRHM1 (A) and SaRHM2 (B). Data are the means of three replicate analyses \pm standard error

供体。

作者贡献: 周良云和郭兰萍设计本研究内容; 周良云和李佳兴提供实验数据; 周良云撰写文章; 杨健、王升和吕朝耕负责部分数据分析及文章修改; 郭兰萍提供项目资助。

利益冲突: 所有作者没有利益冲突。

References

- [1] Caffall KH, Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides [J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344: 1879-1900.
- [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] Choi HJ, Song JH, Kwon DH. Quercetin 3-rhamnoside exerts antiinfluenza A virus activity in mice [J]. *Phytother Res*, 2012, 26: 462-464.
- [4] Sara M, Samad E, Peyman S, et al. Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-O- β -rhamnoside isolated from *Parrotia persica* [J]. *Molecules*, 2017, 22: 1501.
- [5] Yin S, Liu M, Kong JQ. Functional analyses of OcRhS1 and OcUER1 involved in UDP-L-rhamnose biosynthesis in *Ornithogalum caudatum* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 109: 536-548.
- [6] Chinese Academy of Sciences Chinese Flora Editorial Committee. Chinese Flora (中国植物志) [M]. Vol 36. Beijing: Science and Technology Press, 1974: 284.
- [7] Yang XD, Yu XJ, Lu CY, et al. Research progress on main chemical constituents and pharmacological effects of *Sorbus aucuparia* [J]. *J Mod Med Health (现代医药卫生)*, 2020, 36: 850-852.
- [8] Liu B, Beuerle T, Beerhues KL. Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia* [J]. *Planta*, 2004, 218: 492.
- [9] Huttner C, Beuerle T, Scharnhop H, et al. Differential effect of elicitors on biphenyl and dibenzofuran formation in *Sorbus aucuparia* cell cultures [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 11977-11984.
- [10] Chizzali C, Beerhues L. Phytoalexins of the Pyrinae: biphenyls and dibenzofurans [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2012, 8: 613-620.
- [11] Li JX, Li HL, Zhou LY, et al. Chemical constituents from *Sorbus aucuparia* cell suspension treated with yeast and their antifungal activity [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31: 2071-2076.
- [12] Zhou LY, Yang J, Yang G, et al. Biphenyl phytoalexin in *Sorbus pohuashanensis* suspension cell induced by yeast extract [J]. *Molecules*, 2016, 21: 1180.
- [13] Lim EK, Ashford DA, Bowles DJ. The synthesis of small-molecule rhamnosides through the rational design of a whole-cell biocatalysis system [J]. *ChemBioChem*, 2006, 7: 1181-1184.
- [14] Kim BG, Jung WD, Ahn JH. Cloning and characterization of a putative UDP-rhamnose synthase 1 from *Populus euramericana* Guinier [J]. *J Plant Biol*, 2013, 56: 7-12.
- [15] Lee SH, Ko CI, Ahn G, et al. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava* [J]. *Carbohydr Polymers*, 2012, 89: 599-606.
- [16] 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.
- [17] Tatsimo SJ, Tamokou JD, Havyarimana L, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum* [J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5: 158.
- [18] 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.
- [19] Casas MI, Falcone-Ferreira 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.
- [20] Liu L, Zhou LY, Zhang CR, et al. Cloning and characterization of UDP-L-rhamnose synthase 1/2 from *Fallopia multiflora* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1515-1523.