

催化根皮素生成三叶苷的来源于穿心莲的糖基转移酶 UGT74L2 及其酶学研究

孙术富^{1,2}, 谭宇萍², 姜银银², 张苛苛², 杨 健², 查良平¹, 唐金富^{2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 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: 根皮素-4'-O糖基转移酶 (P4'-OGT) 是三叶苷生物合成途径中最后一步关键酶, 可在体外催化根皮素生成三叶苷, 但目前仅有少数 P4'-OGT 被鉴定。本研究利用已报道的苹果中 P4'-OGT (*MdPh-4'-OGT*) 序列对穿心莲转录组进行筛选, 获得两条同源基因 *UGT74L2* 和 *UGT74L3*。系统发育树分析表明, *UGT74L2* 和 *UGT74L3* 与其他物种中已鉴定功能的 UGT74 家族聚为一类。体外酶促反应显示, *UGT74L2* 可特异性催化根皮素生成三叶苷, 而 *UGT74L3* 无产物产生。通过 Ni-NTA 亲和色谱纯化获得可溶性 *UGT74L2* 重组蛋白, 以根皮素为底物进行酶促动力学研究。研究表明, *UGT74L2* 酶促反应最适温度为 40 °C, 最适 pH 值为 8.0 (Tris-HCl 体系)。Ca²⁺、Mn²⁺、Co²⁺ 对 *UGT74L2* 的活性有一定的抑制作用, 而 Mg²⁺ 可提高 *UGT74L2* 的活性, 其他金属离子对 *UGT74L2* 活性无明显影响。酶促动力学参数测定结果显示, K_m 值为 29.84 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, k_{cat} 值为 0.02 s^{-1} , k_{cat}/K_m 值为 572.6 $\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。同源建模、分子对接结合突变实验结果显示, 底物结合口袋中的多个氨基酸与其催化活性密切相关。本研究从穿心莲中鉴定了一条新的 P4'-OGT, 可为活性天然产物三叶苷的生物合成提供糖基化元件, 也可为其他植物糖基转移酶的功能挖掘提供参考。

关键词: 穿心莲; 三叶苷; 糖基转移酶; 酶促反应动力学; 分子对接模拟

中图分类号: R932 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0789-11

The UGT74L2 of *Andrographis paniculata* catalyzes phloretin to produce trilobatin and its enzymatic study

SUN Shu-fu^{1,2}, TAN Yu-ping², JIANG Yin-yin², ZHANG Ke-ke², YANG Jian²,
ZHA Liang-ping¹, TANG Jin-fu^{2*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: The last essential enzyme in the biosynthetic pathway of trilobatin, phloretin-4'-O glycosyltransferase (P4'-OGT), catalyzes the conversion of trilobatin to phloretin *in vitro*. However, only a few P4'-OGTs have been found in plants. This study used *Malus domestica* phloretin-4'-O glycosyltransferase (*MdPh-4'-OGT*) as a query to identify and clone two UDP-glucuronosyltransferase (*UGT*) genes, designated *UGT74L2* and *UGT74L3*, from the transcriptome of *Andrographis paniculata*. According to a phylogenetic tree analysis, *UGT74L2* and *UGT74L3* belonged to the UGT74 family, which has been linked to several activities in other species. The *in vitro* enzymatic reaction demonstrated that *UGT74L2* could particularly catalyze the formation of

收稿日期: 2022-07-31; 修回日期: 2022-09-06.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2020YFA0908000); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04114); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设” (2060302).

*通讯作者 Tel: 86-10-64087469, E-mail: jftang@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0936

trilobatin from phloretin, but UGT74L3 had no effects. By using Ni-NTA affinity chromatography to extract the soluble UGT74L2 recombinant protein, the enzymatic kinetics of the activity was investigated using phloretin as the substrate. The results showed that the optimal temperature and pH for UGT74L2 enzymatic reaction were 40 °C and 8.0 (Tris-HCl system), respectively. Three metal ions (Ca^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+}) showed inhibitory effect on the activity of UGT74L2, while Mg^{2+} could improve the activity of UGT74L2. Other tested metal ions have no significant effect on UGT74L2. The results of enzymatic kinetic parameters that the K_m value was $29.84 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the k_{cat} was 0.02 s^{-1} , and the $k_{\text{cat}}\cdot K_m^{-1}$ was $572.6 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. By homology modeling, molecular docking and mutation experiments, we found that multiple amino acids residues around the substrate binding pocket play quite an important role during catalytic process. In summary, we identified a novel *P4'-OGT* gene from medicinal plant *Andrographis paniculata* and provided a new efficient catalyst to synthesize trilobatin. Meanwhile, this study provides a reference for mining new efficient glycosylation modules from plants.

Key words: *Andrographis paniculata*; trilobatin; glycosyltransferase; enzyme kinetics; molecular docking simulation

黄酮类化合物是广泛存在于植物中的一大类次级代谢产物^[1], 而二氢查尔酮是一种天然存在于植物中的“少数黄酮类”^[2], 迄今为止, 从植物 (尤其是中草药) 中分离出的二氢查尔酮不到 100 种^[3,4]。三叶苷是一种二氢查耳酮 4'-*O*-葡萄糖苷^[5], 最早于 1981 年发现于北美海棠 (*Malus spp. cv. Adams*) 中, 1982 年在中国木姜叶柯中被发现^[6,7], 是一种天然甜味剂^[8], 其甜度是蔗糖的 300 倍左右, 热量比糖低得多^[9], 三叶苷不仅被用作天然甜味剂, 而且还具有多种药理活性, 包括抗氧化^[10,11]、抗糖尿病^[12]、抗炎^[13]等。

目前, 三叶苷的生物合成途径已被阐明, 其归属于苯丙烷途径的一个分支, 三叶苷生物合成中的第一步可由双键还原酶 (double bond reductase) 催化, 该酶将对羟基香豆酰辅酶 A 转化为对二氢香豆酰辅酶 A^[14-16], 接着通过查尔酮合酶 (chalcone synthase) 对二氢香豆酰辅酶 A 和 3 个丙二酰辅酶 A 脱羧缩合和环合, 生成根皮素^[15,17], 最后一步需 UDP-糖基转移酶在查尔酮 A 环的 4' 位置加一分子葡萄糖。已知来自苹果的糖基转移酶 *MdPh-4'-OGT* 可在体外催化根皮素的 4' 位糖基化^[18], 但目前从植物中报道的根皮素-4'-*O* 糖基转移酶 (*P4'-OGT*) 只有苹果中的一条, 因此从自然界中或植物体内获得更加高效的 *P4'-OGT* 是实现合成生物学生产三叶苷非常重要的一环。

穿心莲作为国内外常用的药用植物, 其主要化学成分为二萜内酯类和黄酮类^[19], 已从穿心莲中分离得到的化合物约 120 多种, 其中黄酮类约占 40 种, 主要在其根中积累, 基本结构类型主要包括黄酮类 (A 型)、二氢黄酮类 (黄烷酮类, B 型)、双苯吡酮类 (xanthone, C 型)、查尔酮类 (D 型)^[20-22], 目前尚未有研究报道穿心莲中含有二氢查耳酮类化合物。

本研究利用苹果 *MdPh-4'-OGT* 序列对穿心莲转

录组进行筛选, 克隆得到两条同源基因 *UGT74L2* 和 *UGT74L3*。提取穿心莲 RNA 反转录合成 cDNA 作为模板, 利用聚合酶链式反应 (PCR) 并测序获得了两条基因的全长编码序列, 对其编码的蛋白序列进行生物信息分析, 并通过异源表达和体外酶促反应对 UGT74L2 催化根皮素的活性进行鉴定, 考察了重组 UGT74L2 蛋白的最佳反应条件并测定了酶动力学参数。进一步通过同源建模、分子对接及点突变实验, 获得了影响酶催化活性的关键氨基酸残基, 可为探究根皮素 4'-*O* 糖基化催化机制提供参考。尽管 UGT74L2 在穿心莲体内的功能尚不明确, 但在体外可用于三叶苷的生物转化, 也为三叶苷的异源生物合成提供了有用的糖基化元件。

材料与方法

材料 穿心莲种子为实验室自留, 于 2021 年 4 月播种, 整个过程在人工气候室培养, 8 月份采集根、茎、叶及花, 液氮保存, 提取 RNA。

试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) Trans1-T1 感受态细胞、EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit、DMT 酶 (GD111-01)、DMT 感受态细胞 (CD511-01) (北京全式金生物技术有限公司); *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞 (北京康维世纪生物科技有限公司); pET28a-HIS-MBP (本实验室保存); 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Cat 0416-50ase, 北京华越洋生物科技有限公司); 反转录试剂盒 (PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa 公司); KOD-Plus-Neo 高保真酶 (东洋纺生物科技有限公司); Plasmid Mini Kit I (OMEGA 公司); UDP-葡萄糖 (UDPG)、异丙基- β -*D*-硫代半乳糖苷 (IPTG)、咪唑、琼脂粉 (美国 Sigma 公司); 乙腈 (HPLC grade, 美国 Fisher Scientific 公司); 根皮素标准品 (纯

度 $\geq 98\%$), 三叶苷标准品 (纯度 $\geq 98\%$) (北京倍特仁康生物医药科技有限公司); *EcoRI*-HF[®] (R3101V)、*HindIII*-HF[®] (R3104V)、*BamHI*-HF[®] (R3136V)、*SaII*-HF[®] (R3138S) (美国 NEB 公司)。扩增引物由上海生物工程股份有限公司完成。

主要仪器 NanoDrop-1000 型核酸/蛋白分析仪 (中国香港基因有限公司); DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪 (北京市六一仪器厂); 超高效液相 ACQUITY UPLC I-Class (美国 Waters 公司, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、EmpowerTM 3 色谱工作站); 超高效液相色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m)、Waters Xevo G2-S Q-TOF 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司)。

总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 按照植物 RNA 快速提取试剂盒的操作说明提取各组织样品 RNA, 利用 NanoDrop-1000 检测 RNA 浓度, 同时利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 使用反转录试剂盒将穿心莲总 RNA 反转录为第一链 cDNA。

UGT 基因序列全长克隆 从 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) 获得二氢查耳酮 4'-O-糖基转移酶基因的氨基酸序列 (GenBank: AAX16493), 通过本地 Blast 比对穿心莲转录组数据, 筛选到两条同源性高的候选基因 *UGT74L2* 和

UGT74L3, 使用 UniGene 的序列设计引物 74L2MSC-F/R 和 74L3MSC-F/R (表 1), 以穿心莲 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 (模板约 20 ng, 50 μ L 体系)。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 34 个循环后 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并照相, 扩增片段约为 1 500 bp, 回收扩增片段。利用 *EcoRI*-HF/*HindIII*-HF 和 *BamHI*-HF/*SaII*-HF 在 37 $^{\circ}$ C 下酶切 pET28a-HIS-MBP 载体 5 h, 并进行琼脂糖凝胶电泳。将回收的 PCR 产物分别与候选基因 *UGT74L2* 和 *UGT74L3* 连接, 转化到 Trans1-T1 感受态细胞, PCR 筛选阳性克隆, 并进行菌液测序 (北京睿博兴科生物技术有限公司完成)。

UGT74L2 和 UGT74L3 的生物信息学分析 利用 NCBI 在线查找软件 ORF finder 查找 *UGT74L2* 和 *UGT74L3* 的开放阅读框 (ORF) 并得到对应的氨基酸序列; 使用在线软件 ProtParam 对 *UGT74L2* 和 *UGT74L3* 蛋白的氨基酸组成、分子质量、理论等电点及稳定性参数进行分析; 通过 ExPASy 中的 SOPMA 工具分析蛋白质序列的二级结构; 通过 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件构建蛋白质三维结构模型; 使用软件 TMHMM2.0 进行蛋白质跨膜结构域分析; 利用 DNAMAN 将 *UGT74L2* 和 *UGT74L3* 与其他物种的 UGT 氨基酸序列进行同源性比对; 通过 MEGA-X 软件构建 Neighbor-joining 系统发育树, 进化距离的计算采

Table 1 The primer sequences used in the study

Primer	Primer sequence (5'→3')
Amplification	
74L2MSC-F	AGGGGCCCGAATTCATGGATCCCAATGTCGAAGACC
74L2MSC-R	GCGGCCGCAAGCTTGTTACTTTGCTTCATTTTCTCT
74L3MSC-F	AGGGGCCCGAATTCGGATCCATGGATTCCGATGAAGACTG
74L3MSC-R	GCGGCCGCAAGCTTGTCGACTCATCCTCTAACATTACTTTTTTCCAAC
Mutation	
74L2M1F	GCCTACTTCTGCCCTACCCAAACGCGGCGACATCAATCCTA
74L2M1R	CGCCGCGTTTGGGTAGGGCAGAAGTAGGCAGTGAGGCGTGC
74L2M2F	CTACCCAAACCAAGGTCACATCGCGCCTATCCTCCA
74L2M2R	CGCGATGTGACCTTGGTTTGGGTAGGGCAGAAGTAG
74L2M3F	GACAAAAGGTTGCAAGATGATGAAGCGGCGGTCTAAGCCTCT
74L2M3R	CGCCGCTTCATCATCTTGAACCTTTTGTCTAAGCACATCG
74L2M4F	GATGATGAAGATTATGGTCTAGCGCTCTTTGAACC
74L2M4R	CGCTAGACCATAATCTTCATCATCTTGAACCTT
74L2M5F	ATCGGTTCATCTACATTTCTTTTCGCGGCGTTAGTTCAATTAAC
74L2M5R	ATCGGTTCATCTACATTTCTTTTCGCGGCGTTAGTTCAATTAAC
74L2M6F	GTCATCTACATTTCTTTTCGAGCGTTAGTTCAATTAAC
74L2M6R	CGCTCCGAAAGAAATGTAGATGACCGATTAGATTG
74L2M7F	CGGAAAATGGATTGATCGTGTGTCAGCGGCGCCACAACCTAAAAG
74L2M7R	CGCCGCTGACACGATCAATCCATTTTCCGGTGGAAAGTTATTTG
74L2M8F	GGATTGATCGTGTGTCATGGGGCGCGGCGTAAAAGTATTAG
74L2M8R	CGCCGCGCCCATGACACGATCAATCCATTTTCCGGTGGAA
74L2M9F	GATCGTGTGTCATGGGGCCCAAGCGGCGGTATTAGGACACG
74L2M9R	CGCCGCTTGTGGGCCCCATGACACGATCAATCCATTTTCCG
74L2M10F	GTTTCATTACACACTGTGGATGGGCGTGCACGCTTGAG
74L2M10R	CGCCATCCACAGTGTGTAATGAAACATCCGATTGC

用泊松模型, bootstrap 重复次数 1 000 次。

UGT74L2 和 UGT74L3 原核表达载体的构建及异源表达 设计带有酶切位点的引物 74L2MSC-F/R 和 74L3MSC-F/R (表 1), 扩增 UGT74L2 和 UGT74L3 的 CDS (coding sequence) 区。分别使用 *EcoRI*-HF/*HindIII*-HF 和 *BamHI*-HF/*SalI*-HF 双酶切 pET28a-HIS-MBP 表达载体, 获得线性载体。将目的片段与线性化的 pET28a-HIS-MBP 载体按摩尔比为 3:1 混合, 使用 2×Assembly Mix 连接酶连接, 50 °C 反应 20 min。将重组产物转入大肠杆菌 Trans1-T1 中, 涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基上, 于 37 °C 过夜培养, 挑选阳性菌落提质粒进行测序验证。

经测序验证成功后的 pET28a-HIS-MBP-UGT74L2 和 pET28a-HIS-MBP-UGT74L3 质粒转入 *E. coli* Rosetta (DE3) 中, 挑选阳性菌落接种至 1 mL 含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜活化。活化后的菌液按 1:50 比例接种至 50 mL 含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 下培养至 $A_{600\text{nm}}$ 为 0.4~0.6 时加入终浓度为 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG, 于 16 °C 继续振荡培养 16 h; 以含有 pET28a-HIS-MBP 空载体的 *E. coli* Rosetta (DE3) 培养物为阴性对照。于 4 °C、3 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集菌体沉淀, 重悬于预冷纯水中, 洗 2 次, 每 50 mL 菌液离心得到的菌体加入 3 mL 重悬缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF、10% 甘油, pH 7.4)。细胞破碎机进行菌液破碎, 90 W 频率下间歇 5 s、破碎 5 s, 共破碎 5 min; 4 °C、13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取 90 μL 上清, 加入 30 μL 4×loading buffer, 100 °C 煮沸 5 min 作为 SDS-PAGE 样品, pET28a-HIS-MBP 为载体对照, 以不加 IPTG 的 pET28a-HIS-MBP-UGT74L2 蛋白粗提物为阴性对照, 余上清液作为粗酶提取液, 置 -80 °C 备用。

UGT74L2 和 UGT74L3 酶活性测定 取 100 μL 粗蛋白进行活性检测, 反应体系如下: UGT74L2 和 UGT74L3 粗蛋白 100 μL , 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 根皮素 1 μL , 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ UDPG 2 μL , 30 °C 反应 8 h, 反应结束后, 向其中加入 2 倍体积的甲醇终止反应, 振荡混匀后 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清 0.22 μm 滤膜过滤, 使用 UPLC (ultra-performance liquid chromatography) 检测。检测条件如下: 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸-水 (A)/乙腈 (B) 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~0.5 min, 90%~80% A; 0.5~5 min, 80%~75% A; 5~7 min, 75%~30% A; 7~7.2 min, 30%~5% A; 7.2~9.2 min, 5% A; 9.2~10 min, 5%~90% A; 10~13 min, 90% A。流速: 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 40 °C, 进样量 2 μL , 紫外吸收波长

285 nm。利用 Q-TOF-MS 对 UGT74L2 的反应样品进行定性分析, 质谱条件: Waters Xevo G2-S QTOF-MS 质谱采用电喷雾离子化源 (ESI), 采用负离子检测模式; 扫描范围 m/z 50~1 500, 扫描时间 0.2 s, 毛细管电压 2 000 V, 锥孔电压 40 V, 除溶剂气体氮气 900 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, 除溶剂温度 450 °C, 离子源温度 100 °C。

重组蛋白纯化及酶学性质分析 利用 Ni-NTA 亲和色谱对重组 UGT74L2 进行蛋白纯化, 使用 10 倍柱体积无菌双蒸水和重悬缓冲液 [20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.4] 平衡镍柱, 将破碎离心后的上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后, 上样于平衡好的 Ni²⁺ 螯合树脂亲和色谱柱, 上清液全部过柱后, 使用 20 倍柱体积含 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS, pH 7.4) 洗脱除去杂蛋白, 使用 10 倍柱体积含 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑缓冲液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS, pH 7.4) 洗脱目的蛋白, 目的蛋白经超滤管 (30 kDa, Millipore) 离心浓缩为 1 mL, 更换蛋白缓冲液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.4), 加入 50% 甘油至其终浓度为 10% 并保存于 -80 °C, 对纯化后的蛋白进行酶学特性分析, 反应体系: 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ UGT74L2 5 μL , 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 根皮素 1 μL , 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ UDPG 2 μL , 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.4) 缓冲液 92 μL 。时间选取 0.5、1、2、3、4、6、8、12 h, 每个时间点 3 个生物学重复, 于 35 °C、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.4) 缓冲液中进行反应, 温度选取 15、20、25、30、35、40、45、50、55 °C, 每个温度 3 个生物学重复, 在 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.4) 中反应 4 h, 选取柠檬酸-柠檬酸钠 (pH 4.0、5.0、6.0)、Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 6.0、7.0、8.0)、Tris-HCl (pH 7.0、8.0、9.0)、Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 8.8、9.9、10.6) 这 4 种缓冲液体系, 每个体系的每个 pH 设置 3 个生物学重复, 于 30 °C 反应 4 h。选择金属离子 Fe²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Na⁺、Ca²⁺、Ni²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Li⁺ 和 K⁺, 其中 Mg²⁺ 终浓度为 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余金属离子终浓度为 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 30 °C 的 Tris-HCl (pH 8.0) 中反应 4 h。设置根皮素不同浓度梯度, 35 °C 反应 30 min 后, 以根皮素的浓度为横坐标, 消耗量为纵坐标, 通过米氏方程拟合作图, 计算根皮素的 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 、 $k_{\text{cat}}\cdot K_m^{-1}$ 值。

同源建模、分子对接和定点突变 通过 Swiss-Model 对 UGT74L2 进行同源建模以预测其结构, 然后使用 Autodock Tools 软件对 UGT74L2 进行底物和蛋白分子对接筛选关键活性位点, 根据定点突变原理设计突变引物 (表 1), 利用 PCR 法进行突变 (25 μL 体系), 质粒 DNA 模板 2 ng、引物各 5 μmol 、dNTP 0.2 mmol 、MgSO₄ 3 mmol 、KOD-Plus-neo 0.5 U。PCR 反应结束后, 加入 0.5 U DMT 酶, 37 °C 反应 60 min, 加

入至大肠杆菌 DMT 感受态细胞转化突变质粒, 随后涂板至含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 平板上, 37°C 过夜, 挑选单克隆进行 PCR 验证并测序, 将测序结果正确的质粒转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞中进行转化, 挑选阳性菌落接种至 50 mL 含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37°C 下培养至 $A_{600\text{nm}}$ 为 $0.4\sim 0.6$ 时加入终浓度为 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG, 于 16°C 继续振荡培养 16 h ; 提取粗蛋白进行酶活性验证。

统计学分析 每组实验独立重复 3 次, 采用 Excel 2019 软件进行数据处理和标准差分析, 使用 GraphPad Prism 9 软件绘图, 结果以平均值 \pm 标准差形式进行表示。

结果与分析

1 穿心莲 UGT74L2 和 UGT74L3 基因全长 cDNA 的克隆

以穿心莲 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 2 条 $1\ 500 \text{ bp}$ 左右的条带, 扩增结果如图 1A 所示, 将 PCR 产物连接至 pET28a-HIS-MBP 载体上, 测序结果经 Blast 比对分析, 确定扩增产物为具有完整 ORF 框的 UGT 基因, 其序列长度分别为 $1\ 392 \text{ bp}$ 和 $1\ 386 \text{ bp}$, 分别编码 463 和 462 个氨基酸。

2 UGT74L2 和 UGT74L3 的生物学信息分析

2.1 UGT74L2 和 UGT74L3 的理化性质和跨膜区域分析

通过 ProtParam 软件预测 UGT74L2 和 UGT74L3

编码的蛋白分子式分别为 $\text{C}_{2366}\text{H}_{3674}\text{N}_{614}\text{O}_{687}\text{S}_{18}$ 和 $\text{C}_{2350}\text{H}_{3650}\text{N}_{636}\text{O}_{685}\text{S}_{19}$, 分子质量分别为 52.29 和 52.38 kDa , 理论等电点分别为 5.26 和 5.84 , 不稳定系数 II 分别为 39.62 和 47.89 , UGT74L2 属于稳定蛋白, UGT74L3 属于不稳定蛋白; 总平均亲水性 GRAVY 分别为 -0.142 和 -0.285 , 均为亲水性蛋白。利用 TMHMM2.0 预测分析表明 UGT74L2 和 UGT74L3 中均不包含跨膜区域。

2.2 UGT74L2 和 UGT74L3 蛋白的二级结构分析及三级结构预测

利用 ExPASy 中的 SOPMA 工具对 UGT74L2 和 UGT74L3 基因编码蛋白的二级结构进行预测。结果显示, UGT74L2 蛋白的二级结构由 37.8% 的 α -螺旋 (α -helices)、 42.76% 的随机卷曲 (random coil)、 15.33% 的延伸链 (extended strand) 和 4.10% 的 β -折叠 (β -turn) 组成 (图 1B), 而 UGT74L3 蛋白的二级结构由 38.1% 的 α -螺旋、 39.39% 的随机卷曲、 15.8% 的延伸链和 6.71% 的 β -折叠组成 (图 1C), 推测随机卷曲是其最大量的二级结构元件, 而 α -螺旋、 β -折叠和延伸链散布于整个蛋白中。

通过 SWISS-MODEL 对 UGT74L2 和 UGT74L3 蛋白三维空间结构进行预测分析 (图 1D、E), 结果显示, UGT74L2 蛋白与拟南芥的 UGT74F2 (GenBank: NP172059.1) 序列一致性为 47.61% , 覆盖度为 0.77 , UGT74L3 蛋白与拟南芥的 UGT74F2 序列一致性为 49.56% , 覆盖度为 0.78 。

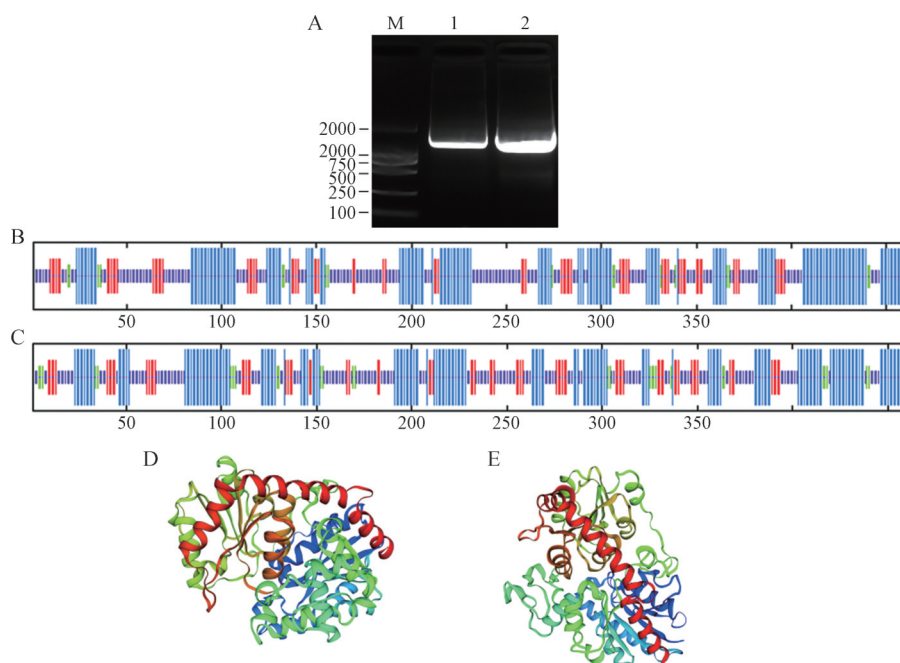


Figure 1 A: Cloning of UGT74L2 gene from *Andrographis paniculata*. M: DNA marker; 1: UGT74L2 gene; 2: UGT74L3 gene. B: Predicted secondary structure of UGT74L2 protein. C: Predicted secondary structure of UGT74L3 protein. Blue: α -Helices; Red: Extended strand; Green: β -Turn; Orange: Random coil. D: The deduced three-dimensional structure of UGT74L2 protein; E: The deduced three-dimensional structure of UGT74L3 protein

2.3 穿心莲 UGT74L2 和 UGT74L3 氨基酸序列比对和系统发育树分析 在线 Blast 结果表明, 与 UGT74L2 和 UGT74L3 相似性高的已报道功能的糖基转移酶较少, 通过文献搜索和蛋白数据库搜索, 选取了 8 个不同家族已报道功能的糖基转移酶, 利用 MEGA X 软件中的邻接法构建系统发育树 (图 2), 结果显示, UGT74L2 和 UGT74L3 属于 UGT74 家族, 且与来自苹果中的糖基转移酶 MdPh-4'-OGT 亲缘关系较近, MdPh-4'-OGT 能催化根皮素生成三叶苷, 推测 UGT74L2 和 UGT74L3 可能也具有糖基化根皮素的活性。

利用 MAFFT 对 UGT74L2 和 UGT74L3 与已报道的 MdPh-4'-OGT 及亲缘关系较近的糖基转移酶进行多序列比对分析 (图 3), 结果表明, UGT74L2 在 C 末端

有与其他糖基转移酶相同的、包含 44 个氨基酸的糖基转移酶保守序列 (PSPG motif)。此外, 根据序列比对结果发现, UGT74L2 和 UGT74L3 均与 UGT74F2 氨基酸序列一致性最高, 分别为 43.74% 和 45.94%, UGT74L2 与 MdPh-2'-OGT (GenBank: AMA68117.1)、MdPh-4'-OGT (GenBank: AAX16493)、UGT74M1 (GenBank: ABK76226)、UGT74E2 (GenBank: NP172059.1)、UGT74T1 (GenBank: AGD95008.1) 的氨基酸序列一致性分别为 23.85%、33.13%、34.42%、42.55%、42.53%, UGT74L3 与 MdPh-2'-OGT、MdPh-4'-OGT、UGT74M1、UGT74E2、UGT74T1 的同源性分别为 24.90%、34.76%、35.11%、41.97%、41.67%。

3 UGT74L2 原核表达分析

pET28a-HIS-MBP-UGT74L2 原核表达载体构建

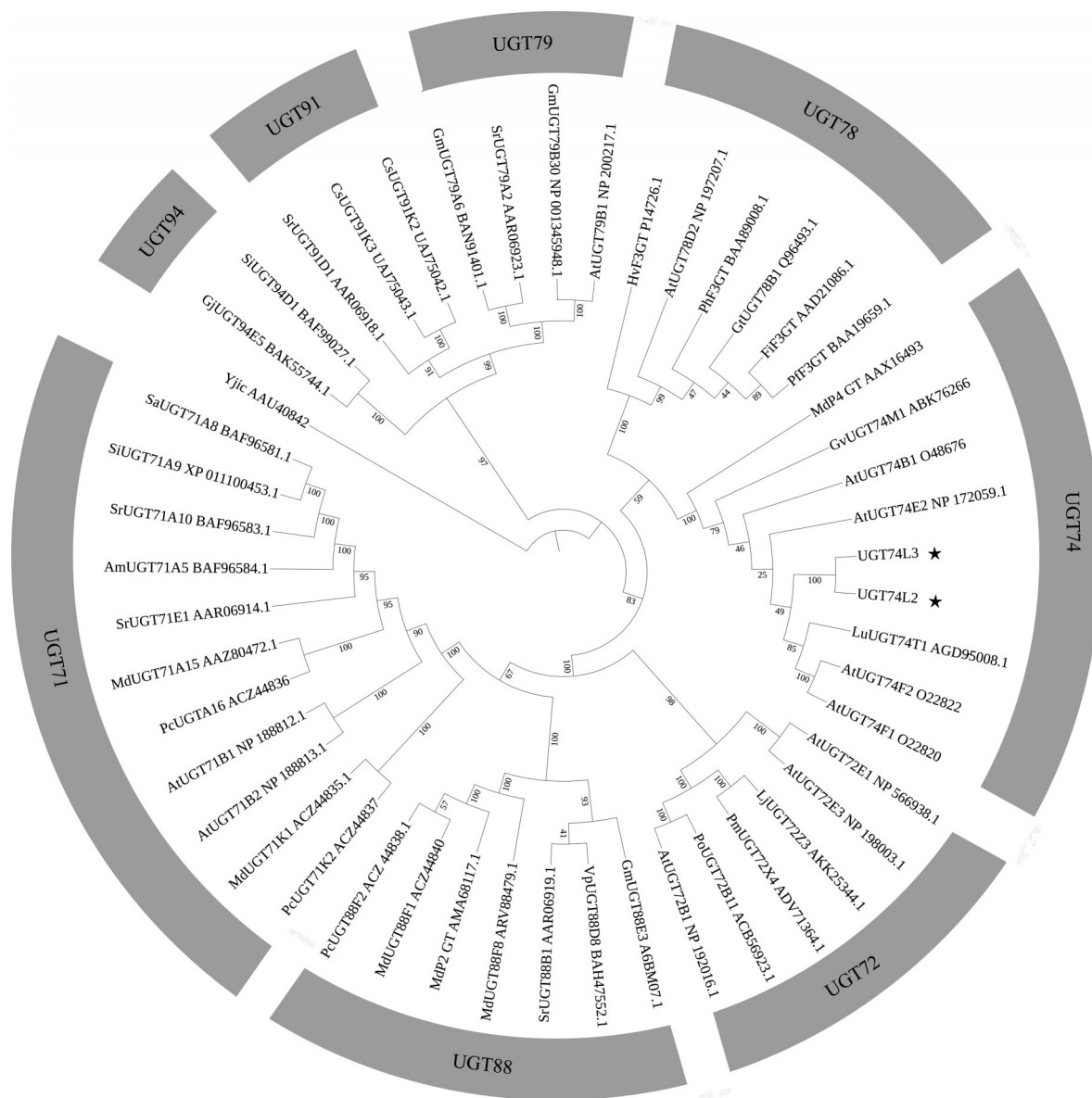


Figure 2 Phylogenetic relationships between UGT74Ls with their close relatives

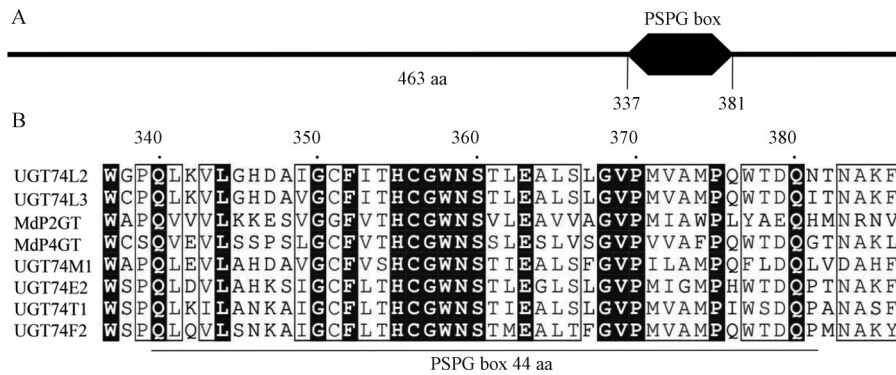


Figure 3 Structure and functional domain prediction of UGT74L2 and UGT74L3. A: PSPG position; B: PSPG box sequence

示意图 (图 4A), 将 pET28a-HIS-MBP-UGT74L2 和 pET28a-HIS-MBP-UGT74L3 原核表达载体转入大肠杆菌原核表达菌株 Rosetta (DE3) 中, 与空载体和未诱导的重组蛋白相比, 经 IPTG 诱导的重组蛋白 UGT74L2 和 UGT74L3 在分子质量约为 100 kDa 处, 出现一条明显的特异蛋白质表达条带, 与理论值一致 (图 4B), 也与纯化后的蛋白表达条带相一致 (图 4C), 说明 UGT74L2 和 UGT74L3 重组蛋白在大肠杆菌 Rosetta 中成功表达。

4 UGT74L2 和 UGT74L3 的体外酶活鉴定

以根皮素为底物, UDP-Glc 为糖基供体, 在酶促反应体系中分别加入 UGT74L2 重组蛋白上清液和 UGT74L3 重组蛋白上清液, 反应完成后, 将产物通过 UPLC 进行检测, 结果显示, UGT74L2 粗酶反应产物出峰时间与对照品三叶苷一致, 而 UGT74L3 样品中没有检测到相应的特征峰 (图 5A), 利用 Q-TOF-MS 对 UGT74L2 的反应样品产物中的特征峰进行定性分析,

结果如图 5B 所示, 产物分子离子峰为 m/z 435.141 5 $[M-H]^-$, 与底物根皮素 m/z 273.082 8 $[M-H]^-$ 分子质量相差 162, 说明产物在根皮素的基础上加了一分子葡萄糖, 与对照品三叶苷 (图 5C) 出峰时间、分子质量和碎片离子均一致, 说明产物 m/z 435.141 5 $[M-H]^-$ 是三叶苷 (图 5B), 因此可认定 UGT74L2 具有特异性催化根皮素生成三叶苷的活性。

5 重组蛋白纯化及酶学性质分析

通过 Ni-NTA 亲和色谱对重组蛋白进行纯化, 依次用含 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑缓冲液 ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS, pH 7.4) 洗脱, SDS-PAGE 结果表明, $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑缓冲液将大部分杂蛋白洗脱, $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑缓冲液洗脱下来的目的蛋白浓度和纯度较高。通过 Bradford 法测牛血清白蛋白浓度标准曲线 ($y = 0.142 6x + 0.750 5$, $R^2 = 0.999 6$), 计算得到 UGT74L2 蛋白浓度约为 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

对时间、温度、pH 值、重金属盐及底物与重组蛋白

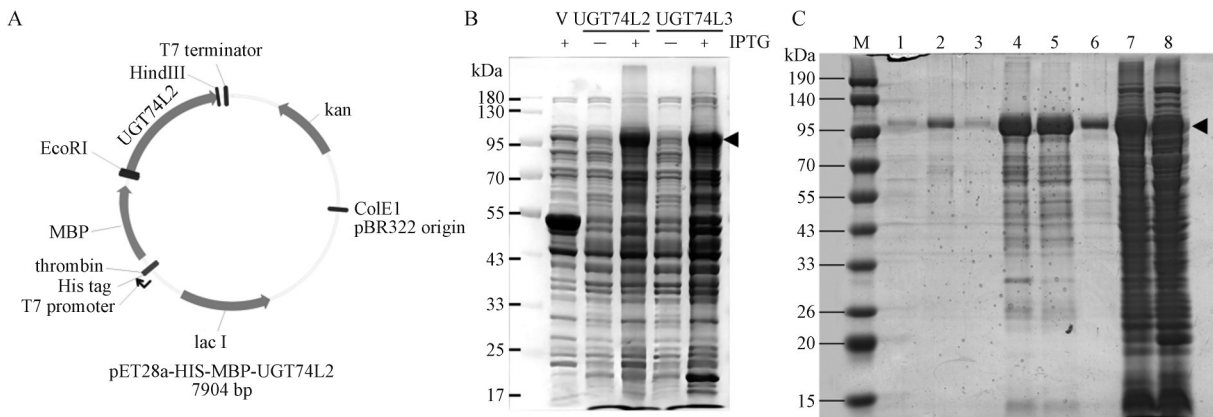


Figure 4 A: UGT74L2 schematic diagram of recombinant expression vector. B: sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of expression of UGT74L2 and UGT74L3 recombinant enzymes. V: Expression of pET28a-HIS-MBP protein target strip; ◀: UGT74L2 and UGT74L3 protein expression target bands. C: UGT74L2 purified protein was analyzed by SDS-PAGE. M: Marker, 1: $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Imidazole eluent; 2: $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Imidazole eluent; 3: $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Imidazole eluent; 4: UGT74L2 concentrated sample; 5: UGT74L2 desalted sample; 6: UGT74L2 desalted and diluted the sample 10 times; 7: The crude enzyme of UGT74L2; 8: UGT74L2 wear fluid flow; ▶: The target band of UGT74L2 protein after purification. IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

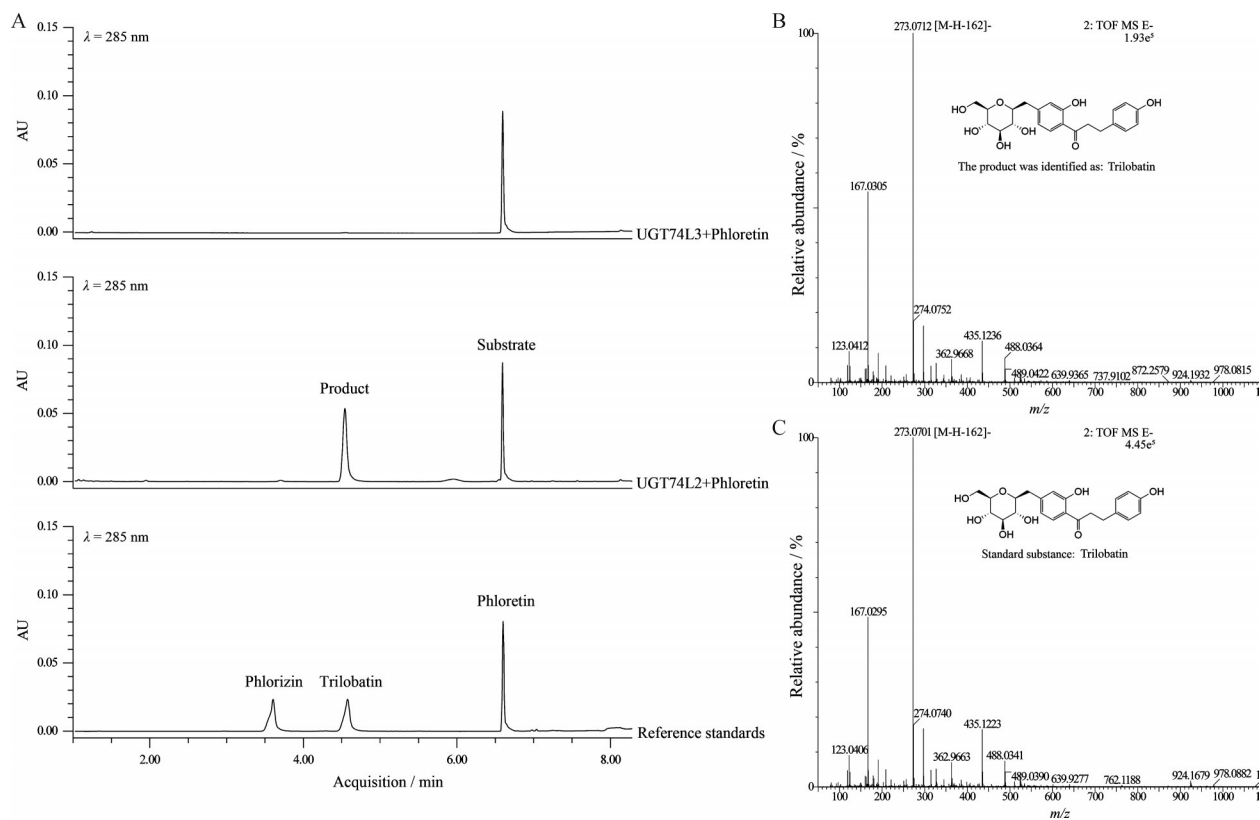


Figure 5 A: Ultra performance liquid chromatography (UPLC) analysis of enzymatic products of the UGT74L2 and UGT74L3. B: Q-time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF-MS) analysis of enzymatic products of the UGT74L2. C: Q-time-of-flight mass spectrometer analysis of trilobatin standard

的动力学常数进行考察, 选取 0.5、1、2、3、4、6、8、12 h 共 8 个时间点对 UGT74L2 的酶活性进行分析比较 (图 6A), 随时间延长, UGT74L2 的催化活性呈持续上升趋势, 在 12 h 时达到较高的底物转化率; 选取 15、20、25、30、35、40、45、50、55 °C 共 9 个温度对 UGT74L2 进行考察 (图 6B), UGT74L2 在 40 °C 时对底物根皮素有较高的催化活性, 底物转化率高达 77%; 选取 4 种常用缓冲液, 柠檬酸-柠檬酸钠 (pH 4.0、5.0、6.0)、 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 6.0、7.0、8.0)、Tris-HCl (pH 7.0、8.0、9.0)、 Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 8.8、9.9、10.6), 并在其常用缓冲液 pH 值下进行定量分析 (图 6C), 结果显示, UGT74L2 在 Tris-HCl (pH 8.0) 体系中有较高催化活性, 高达 55%; 部分糖基转移酶在反应过程中会受到金属离子的影响, 如图 6D 所示, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 对 UGT74L2 的活性有一定抑制作用, 而 Mg^{2+} 可提高 UGT74L2 的活性, 其他金属离子对 UGT74L2 无明显影响。UGT74L2 纯化蛋白分别与不同浓度的根皮素进行反应并测定其酶学参数, 拟合曲线如图 6E 所示, 以不同底物浓度为横坐标, 以底物消耗量为纵坐标, 计算得到根皮素的 K_m 为 $29.84 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, k_{cat} 为 0.02 s^{-1} , $k_{\text{cat}}\cdot K_m^{-1}$ 为 $572.6 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

6 UGT74L2 同源建模、分子对接和定点突变

通过 Swiss-Model 对 UGT74L2 进行同源建模, 并构建了 UGT74L2 根皮素的复合物模型 (图 7A), 在此模型中, 疏水氨基酸 W337、P339、L341 及保守残基 Q20、G21、N24、Y257、G287、S288、Q340、N359 共同形成了一个活性口袋 (图 7B), 可容纳根皮素作为底物。对这些位点进行突变, 构建突变体原核表达载体并诱导表达。体外酶活检测结果表明 (图 7C), 当 Q20/G21、D256/Y257、G287/S288、P339/Q340 突变为丙氨酸后, UGT74L2 活性消失; 当 S288、N359 突变为丙氨酸后, UGT74L2 活性分别下降 89.6% 和 83.5%; 当 W337/G338 突变为丙氨酸后, UGT74L2 活性下降 48.6%。基于以上结果推测, S288、N359、Q20/G21、D256/Y257、W337/G338、G287/S288、P339/Q340 是影响根皮素进入活性口袋的关键位点。

讨论

在三叶苷生物合成途径中, P4'-OGT 是三叶苷合成途径中的最后一步关键酶, 在该酶的催化下, 根皮素在 4'位连接一分子的 β -D-吡喃葡萄糖形成三叶苷, 目前已公开报道的 P4'-OGT 只有一条, 是从苹果中挖掘

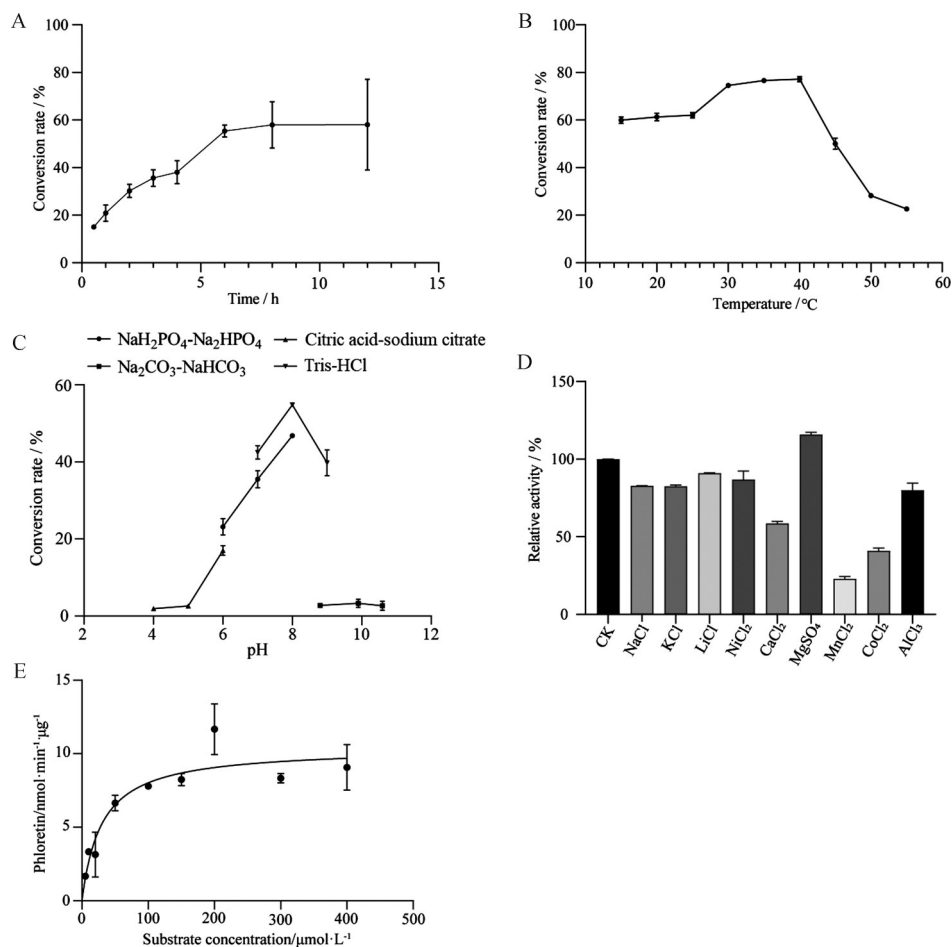


Figure 6 Enzyme activity parameters of UGT74L2. A-D: Effect of time (A), temperature (B), pH (C), and metal ions (D) on UGT74L2 enzyme activity for phloretin; E: Kinetic parameters of recombinant UGT74L2 enzyme. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

的^[18], 虽然穿心莲中并未有报道根皮素和三叶苷的化合物, 但本研究却从穿心莲转录组中挖掘到一条糖基转移酶基因 *UGT74L2*。对其序列进行生物信息学分析发现, 在 *UGT74L2* 氨基酸 C 端有糖基转移酶的保守序列, 包含 44 个氨基酸, 且作为酶的核苷二磷酸-糖结合位点^[23,24]; 通过与其他物种中已克隆并鉴定的糖基转移酶氨基酸系统分析发现, *UGT74L2* 与 *UGT74* 家族聚为一类, 且与苹果中的 *MdPh-4'-OGT* 亲缘关系较近, 通过体外酶促实验证实了 *UGT74L2* 可催化根皮素生成三叶苷。

利用 Ni-NTA 亲和色谱对 *UGT74L2* 重组蛋白进行纯化, 并对纯化产物进行了酶促反应动力学, *UGT74L2* 催化反应的最适反应温度为 40 °C, 与苹果中 *MdPh-4'-OGT* 的最佳反应温度一致, 最适 pH 值为 8.0 (Tris-HCl 体系)。Ca²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Mg²⁺ 对 *UGT74L2* 的活性有显著影响, 以根皮素为底物测得 K_m 为 29.84 μmol·L⁻¹, k_{cat} 为 0.02 s⁻¹, 催化效率为 572.6 mol⁻¹·s⁻¹, 与苹果中已报道的 *MdPh-4'-OGT* 相比, K_m 为 26.11 μmol·L⁻¹, 催化效率为 3 810 mol⁻¹·s⁻¹^[18], 催

化效率是 *UGT74L2* 的 6.6 倍。虽然二者糖基转移酶催化效率有所差异, 但都催化根皮素生成唯一产物三叶苷, 而地衣芽孢杆菌中已报道的糖基转移酶却能催化根皮素生成 5 种黄酮糖苷类化合物^[25], 与之相比, *UGT74L2* 具有更高的专一性, 可作为人工合成三叶苷的候选元件。

通过 Swiss-Model 对 *UGT74L2* 进行同源建模, 构建了 *UGT74L2* 与根皮素的复合物模型, 对预测活性位点进行突变, 构建突变体原核表达载体并诱导表达, 结合体外酶活检测和分子对接结果, 推测机制如下: 芳香族氨基酸 Y257 和 W337 通过 π - π 堆叠作用分别固定根皮素的 A 环和 B 环, 而 Y257 与根皮素 A 环的 π - π 堆叠作用可能会拉近 4'-OH 与 UDP-Glc 的距离, 导致 4'-OH 糖基化形成三叶苷, 将 Y257 突变之后活性丧失; 疏水性氨基酸 P339、L341、W337 在蛋白质内部, 由于其疏水相互作用, 维持了蛋白质三维结构, 使根皮素更易接近活性口袋; Q340 和 L341、S74L2 和 W337、S288 分别与根皮素 A 环的 6'-OH、2'-OH 及 B 环的 4-OH 形成氢键, Q340 突变后活性丧失, W337 和 S288 突变后活性

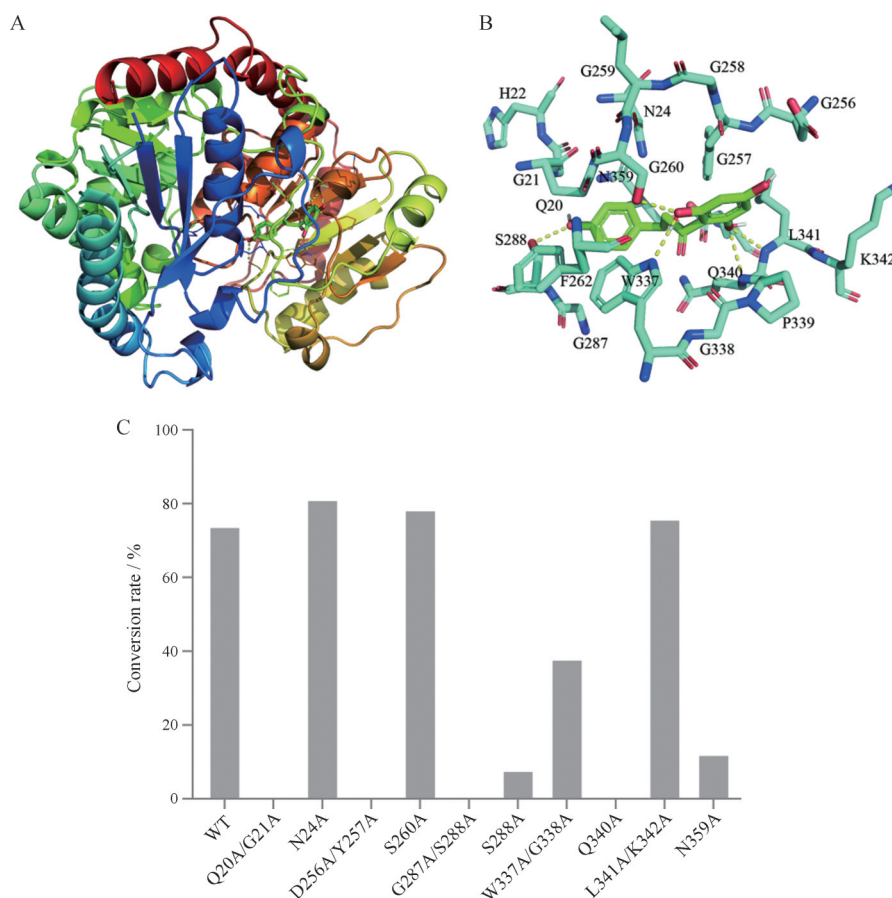


Figure 7 A: Homology modeling and molecular docking diagram. B: The key residues that make up the active pocket. Green: Phloretin; Blue: Amino acid residue. C: The mutation results

减弱,说明氢键断裂导致蛋白质结构变化,影响了4'-OH与UDP-Glc的结合;对于UDP依赖性糖基转移酶(UGT),保守的PSPG盒负责识别和结合糖供体^[26],残基W337、G338、P339、Q340、L341、K342、N359位于PSPG盒结构域中,当P339和Q340突变为丙氨酸时活性丧失,W337和G338、N359突变为丙氨酸时活性减弱,这些探索为以后人工改造P4'-OGT提供了参考和依据。

尽管穿心莲中不含有三叶苷化合物,但本研究同源克隆并鉴定了一条糖基转移酶UGT74L2,可在体外高效催化根皮素生成三叶苷,说明植物糖基转移酶存在比较普遍的杂泛性。本研究同时也支持从多种来源的植物中挖掘非天然活性的新颖糖基转移酶有一定的可行性。

综上所述,本研究从穿心莲中鉴定了一条新的P4'-OGT,可为活性天然产物三叶苷的生物合成提供糖基化元件,也可为其他新型植物糖基转移酶的功能挖掘提供参考。

作者贡献: 孙术富进行本研究的实验、数据分析和论文初稿撰写;谭宇萍和姜银提供实验技术支持;张苛苛参与

植物实验材料取样和RNA提取;杨健和查良平负责论文修改;唐金富是本项目的构思者和负责人,指导实验设计、数据分析和文章的修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Lin CC, Chen DW, Dai JG. Advances of synthetic biology of flavonoids [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2022, 57: 1322-1335.
- [2] Zhou Y, Li W, Qu XN, et al. Review on the distribution and biological activity of dihydrochalcone [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2014, 33: 36-40, 46.
- [3] Qin HL, Yu DQ. ¹H-NMR Spectroscopic Databook of Natural Products (天然产物的¹H-NMR谱数据) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 2224-2235.
- [4] Yang JS. ¹³C-NMR Spectroscopic Databook of Natural Products (天然产物的¹³C-NMR谱数据) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 1771-1774.
- [5] Dong HQ, Li M, Zhu F, et al. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes [J]. Food Chem, 2012, 130: 261-266.

- [6] Rui LN, Tanaka T, Zhou J, et al. Phlorizin and trilobatin, sweet dihydrochalcone-glucosides from leaves of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Rehd (Fagaceae) [J]. *Agric Biol Chem*, 1982, 46: 1933-1934.
- [7] Tanaka T, Kawamura K, Kohda H, et al. Glycosides of the leaves of *Symplocos* spp. (Symplocaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 30: 2421-2423.
- [8] Wu DR, Hao ZM, Fu JZ, et al. Research progress on *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun [J]. *Guizhou Agric Mechanization* (贵州农机化), 2018, (04): 39-40, 44.
- [9] Eichenberger M, Lehka BJ, Folly C, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties [J]. *Metab Eng*, 2017, 39: 80-89.
- [10] Li X, Chen B, Xie H, et al. Antioxidant structure-activity relationship analysis of five dihydrochalcones [J]. *Molecules*, 2018, 23: 1162.
- [11] Yang WM, Liu JK, Qin XD, et al. Antioxidant activities of three dihydrochalcone glucosides from leaves of *Lithocarpus pachyphyllus* [J]. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2004, 59: 481-484.
- [12] Wang J, Huang Y, Li K, et al. Leaf extract from *Lithocarpus polystachyus* Rehd. promote glycogen synthesis in T2DM mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0166557.
- [13] Fan X, Zhang Y, Dong H, et al. Trilobatin attenuates the LPS-mediated inflammatory response by suppressing the NF- κ B signaling pathway [J]. *Food Chem*, 2015, 166: 609-615.
- [14] Dare AP, Tomes S, Jones M, et al. Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus \times domestica*) [J]. *Plant J*, 2013, 74: 398-410.
- [15] Gosch C, Halbwirth H, Kuhn J, et al. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. *Plant Sci*, 2009, 176: 223-231.
- [16] Ibdah M, Berim A, Martens S, et al. Identification and cloning of an NADPH-dependent hydroxycinnamoyl-CoA double bond reductase involved in dihydrochalcone formation in *Malus \times domestica* Borkh. [J]. *Phytochemistry*, 2014, 107: 24-31.
- [17] Yahyaa M, Ali S, Davidovich-Rikanati R, et al. Characterization of three chalcone synthase-like genes from apple (*Malus \times domestica* Borkh.) [J]. *Phytochemistry*, 2017, 140: 125-133.
- [18] Yahyaa M, Davidovich-Rikanati R, Eyal Y, et al. Identification and characterization of UDP-glucose: phloretin 4'-O-glycosyltransferase from *Malus \times domestica* Borkh. [J]. *Phytochemistry*, 2016, 130: 47-55.
- [19] Huang JL. Study on Flavonoids in *Andrographis Paniculata* (穿心莲黄酮类成分研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2021.
- [20] Gao JL. Analysis of Enzyme and Diterpene Lactone Variability During Ontogenesis of *Andrographis paniculate* (Burm. f.) Nees (不同生长期穿心莲化学成分及相关酶活性变化规律的研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.
- [21] Xu C, Wang ZT. Chemical constituents from roots of *Andrographis paniculata* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2011, 46: 317-321.
- [22] Zhang X, Tang LY, Wu HW, et al. Development of modern research on *Andrographis paniculate* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 222-234.
- [23] Wang X. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583: 3303-3309.
- [24] Yonekura-sakakibara K, Hanada K. An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases [J]. *Plant J*, 2011, 66: 182-193.
- [25] Pandey RP, Li TF, Kim EH, et al. Enzymatic synthesis of novel phloretin glucosides [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 3516-3521.
- [26] Ross J, Li Y, Lim EK, et al. Higher plant glycosyltransferases [J]. *Genome Biol*, 2001, 2: REVIEWS3004.