

红花黄酮生物合成途径糖基转移酶基因 *CtUGT25* 的功能研究

齐书艺^{1#}, 王璐暖^{1#}, 何贝轩¹, 高越^{2*}, 郭美丽^{1*}

(1. 海军军医大学药理学系生药学教研室, 上海 200082; 2. 海军军医大学第一附属医院临床研究中心, 上海 200082)

摘要: 糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 是黄酮糖苷类化合物形成的末端修饰酶。本研究通过对红花花冠转录组数据库中糖基转移酶基因在四个花期的表达量与红花代谢组数据中主要成分的含量进行皮尔斯相关性分析, 获得了2个与红花黄酮类化合物合成密切相关的糖基转移酶基因 *CtUGT25*、*CtUGT18*, 并对二者的基因及蛋白序列进行生物信息学分析。表达模式分析发现 *CtUGT25* 主要在花冠中表达, 在开花第3天表达量最高; *CtUGT18* 主要在根中表达, 在开花第1天表达量最高。通过农杆菌介导的花粉管道法转基因手段在红花体内进行了功能验证, 证明 *CtUGT25* 促进了山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷及羟基红花黄色素 A (HSYA) 的积累, *CtUGT18* 促进了山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、茛菪苷的积累, 二者可能是红花黄酮类化合物合成的糖基修饰酶。同时, 体外实验证明 *CtUGT25* 蛋白对柚皮素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、2-羟基柚皮素、高良姜素均具有催化活性。本研究为下一步通过分子生物技术调控红花的品质, 特别是红花中特有成分 HSYA 等的工业化生产提供参考, 也为其他植物的相关基因的研究提供资料。

关键词: 红花; 黄酮类化合物; 糖基转移酶; 生物合成途径; 羟基红花黄色素 A

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)06-1854-10

Functional study of glycosyltransferase genes *CtUGT25* in the flavone biosynthesis pathway of *Carthamus tinctorius* L.

QI Shu-yi^{1#}, WANG Lu-nuan^{1#}, HE Bei-xuan¹, GAO Yue^{2*}, GUO Mei-li^{1*}

(1. Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200082, China;
2. Changhai Clinical Research Unit, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200082, China)

Abstract: UDP glycosyltransferase (UGT) is a terminal modifying enzyme for the formation of flavonoid glycosides. In this study, we obtained two glycosyltransferase genes, *CtUGT25* and *CtUGT18*, which are closely related to the synthesis of safflower flavonoids, through the Pierce correlation analysis of the expression of glycosyltransferase genes in the safflower corolla transcriptome database at different developmental stages with the contents of the major constituents of safflower metabolome database, and bioinformatically analyzed the gene and protein sequences of the two genes. Expression pattern analysis revealed that *CtUGT25* was mainly expressed in the corolla, with the highest expression on day 3 of flowering stage; *CtUGT18* was mainly expressed in the root, with the highest expression on day 1 of flowering stage. Functional validation was verified in safflower by *Agrobacterium*-mediated pollen-tube pathway transgenesis method, demonstrating that *CtUGT25* promoted the accumulation of kaempferol-3-*O*-glucoside and hydroxysafflor yellow A (HSYA), and *CtUGT18* promoted the accumulation of kaempferol-3-*O*-glucoside and orientin, both of which may be the glycosyl-modifying enzymes

收稿日期: 2023-09-01; 修回日期: 2024-03-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973421); 国家重点研发计划 (2019YFC1711100).

#并列第一作者.

*通讯作者 Tel: 13621767286, E-mail: mlguo@126.com;

Tel: 13701638627, E-mail: gaoyue2000@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1026

for the synthesis of safflower flavonoids. Meanwhile, *in vitro* experiments demonstrated the catalytic activity of *CtUGT25* protein on naringenin, quercetin, apigenin, kaempferol, luteolin, 2-hydroxynaringenin and galangin. This study serves as reference for future advancements in regulating the quality of safflower using molecular biotechnology, particularly focuses on the industrial production of safflower exclusive component HSYA. Additionally, it offers valuable insights for researching related genes in other plants.

Key words: safflower; flavonoid; glycosyltransferase; biosynthetic pathway; hydroxysafflor yellow A

红花 (*Carthami Flos*) 是常用的传统中药, 我国最早载于经典中药古籍《开宝本草》, 有活血化瘀、祛湿止痛功效^[1]。红花作为一味传统中药, 在临床应用中已有 2 500 年的历史^[2]。红花中的多种化合物在扩张冠状动脉、改善心肌缺血、抗凝和抗血栓等方面均具有广泛的药理活性^[3]。红花中黄酮类化合物为主要药效成分, 其中羟基红花黄色素 A (HSYA)、红花胺 (tinctormine)、carthamin、cartormin 等是红花中特有的活性成分, HSYA 作为红花药材质量评价的标准^[4], 其生物合成途径多年来一直是研究的热点。

糖基转移酶是植物体内广泛存在的一种进行糖基化反应的转移酶, 它可以将糖基供体分子如 UDP-葡萄糖、UDP-葡萄糖醛酸、UDP-木糖、UDP-鼠李糖、核苷-2-磷酸糖^[5-7] 上的活性糖基转移到糖基受体底物如单糖和多糖、蛋白质、脂类^[8] 及小分子天然化合物上, 从而改变受体的亲水性、稳定性、化学性质、亚细胞定位以及生物活性, 同时维持植物自身的代谢平衡^[9]。糖基转移酶按照糖基化位点分类可以分成 *O*-GT^[10]、*N*-GT^[11]、*C*-GT^[12]、*S*-GT^[13]。在红花中, Sui^[14] 通过体外实验发现了 *O*-GT 基因 *UGT88B2*。Xie 等^[15] 发现了底物杂泛性的糖基转移酶基因 *UGT73A1*, 进一步研究表明其具有 *O*-GT、*N*-GT、*S*-GT 催化活性。Guo 等^[16] 在红花的转录数据库中筛选并克隆出 3 个 UGT 基因, 并初步预测了 *O*-GT 功能。但是迄今为止, 红花中 *C*-GT 基因未见报道。红花中黄酮类化合物的生物合成途径已在多种模式植物及农作物中得到广泛研究, 但仍未被完全解析。特别是红花中含有糖基的特有药用成分如 HSYA^[17]、红花黄色素 A (safflor yellow A)^[18]、红花黄色素 B (safflor yellow B)^[17]、cartormin^[19]、carthamin^[17] 等, 它们生物合成途径上的相关功能基因尚不完全清楚。

本研究利用分子生物学和生物化学方法对可能影响红花黄酮类成分生物合成的糖基转移酶基因 *CtUGT25*、*CtUGT18* 进行了功能研究, 初步探究了其在红花黄酮类次生代谢物特别是 HSYA 生物合成的末端修饰过程中的作用。研究内容为下一步通过分子生物技术调控红花的品质以及工业化生产红花中重要黄酮类化合物提供了重要前提, 也为其他植物的相关基因的研究提供了资料。

材料与方法

实验材料及处理 植物材料为课题组多代纯化的云南巍山红花品系 (ZHH0119), 由海军军医大学药理学系郭美丽教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L.。红花种植条件: 温度恒定 25 ± 5 °C, 16 h 光照, 8 h 黑暗。采集红花组织后迅速存放于液氮并于 -80 °C 冰箱中冷冻。

菌株、载体与试剂 大肠杆菌 *Escherichia coli* T1 感受态细胞、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 感受态细胞、Rosetta (DE3) 感受态细胞、植物 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、*pEASY*[®]-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 无缝克隆试剂盒、qPCR Supermix 试剂盒、Blunt Zero 克隆载体、*NcoI* 限制性内切酶、*BamHI* 限制性内切酶、*XhoI* 限制性内切酶购自北京全式金生物技术有限公司。2×Phanta[®] Flash Master Mix (Dye Plus) 高保真酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司。His 标签蛋白纯化试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。真核表达载体 PMT39 为课题组自存, 原核表达载体 pET-28a(+) 购自上海酶研生物科技有限公司。化合物标准品除 2-羟基柚皮素购自成都乐美天医药科技, 其余都购自上海源叶生物科技有限公司。实验所用引物全部由上海生工生物有限公司合成。

红花黄酮类成分合成相关糖基转移酶基因筛选 基于红花花冠转录组数据库^[20], 筛选得到可能的糖基转移酶基因, 根据 NR 注释、NT 注释、COG 注释、GO 注释、KEGG 注释等结果综合分析, 确定是否为红花中的糖基转移酶。计算得到基因的四个花期: 开花前 3 天 (I 期)、开花当天 (II 期)、开花第 1 天 (III 期) 和第 3 天 (IV 期) 的表达量, 并与红花代谢组数据库中同样本所测得的柚皮素 (naringenin)、芹菜素 (apigenin)、槲皮素 (quercetin)、芦丁 (rutin)、山柰酚 (kaempferol)、木犀草素 (luteolin)、carthamin、HSYA、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷 (quercetin-3-*O*-glucoside)、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷 (kaempferol-3-*O*-glucoside)、野黄芩素 (scutellarin)、苯丙氨酸 (*D*-phenylalanine)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷

(kaempferol-3-*O*-rutinoside) 13个主要成分的含量进行皮尔森相关性分析。根据基因表达量与有效成分含量的相关系数确定目的基因。

红花花冠 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 按照植物 RNA 提取试剂盒的说明提取红花花冠总 RNA, 紫外分光光度计测量所提取 RNA 的吸光度, 选取 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间的样品作为反转录模板。使用 *TransScript*[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒合成 cDNA 第一链, 样品置于 -80 °C 保存。

***CtUGT18*、*CtUGT25* 基因全长克隆** 基于数据库中的基因片段, 用 Oligo 软件设计特异性引物 (表 1)。利用 2×Phanta[®] Flash Master Mix (Dye Plus) 高保真酶做目的基因的 PCR 扩增反应, 反应条件为 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 5 s, 50~70 °C (设置梯度) 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖电泳凝胶检测并回收, 按 *pEASY*[®]-Blunt Zero Cloning Kit 试剂盒说明将回收产物连接至 *pEASY*[®]-Blunt Zero Cloning Vector, 转化 T1 大肠杆菌 (*E. coli*) 感受态细胞, 菌液 PCR 验证阳性单克隆菌株, 提取质粒送上海生工生物测序验证。

Table 1 Design of full-length clone primers for *CtUGT18* and *CtUGT25*

Primer	Sequence	Length/bp
UGT18F	TCAATATCACCATAACCACACAGACGG	27
UGT18R	CTTCCTCAACGTATTAACACTCGCAAC	28
UGT25F	AATGGCTTCCTCACCTCATTTTCGTA	25
UGT25R	TTTCTATATTAAGCTTTGATTTC	24

***CtUGT18*、*CtUGT25* 基因生物信息学分析** 使用 NCBI 网站的 Open Reading Frame Finder 功能模块 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 和 Conserved Domain Search Service 功能模块 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行基因的 ORF 分析和保守域分析。使用 NCBI 网站的 BLAST 功能模块 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对基因的氨基酸序列进行同源比对, 并使用 MEGA7.0.14 软件, 选择邻接法构建系统进化树。用 Expasy 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *CtUGT18* 和 *CtUGT25* 蛋白的理化性质, 并用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 模块进行蛋白的亲水性/疏水性预测。使用 WoLF PSORT 网站 (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 对 *CtUGT18* 和 *CtUGT25* 蛋白亚细胞定位预测。使用 TMHMM-2.0 工具 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 对蛋白进行跨膜区预测。利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 工具和 SWISS-MODEL 工具 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对蛋白进行二级结构和三级结构预测。

表达特征分析 提取红花植株不同部位和花冠不同发育期 RNA, 将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 所得 cDNA 样品于 -40 °C 冰箱中保存。用 Beacon design 软件在 *CtUGT18*、*CtUGT25* 的 ORF 框内设计引物 (表 2)。选择 *Ct60S* (*Ct60S*-F: CATCCATTATCCAACAATC; *Ct60S*-R: AAGAGTAATCAGTCTCCA) 作为内参基因。

表达特征分析 提取红花植株不同部位和花冠不同发育期 RNA, 将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 所得 cDNA 样品于 -40 °C 冰箱中保存。用 Beacon design 软件在 *CtUGT18*、*CtUGT25* 的 ORF 框内设计引物 (表 2)。选择 *Ct60S* (*Ct60S*-F: CATCCATTATCCAACAATC; *Ct60S*-R: AAGAGTAATCAGTCTCCA) 作为内参基因。

Table 2 Primers used for *CtUGT18* and *CtUGT25* qRT-PCR

Primer	Sequence	Position	Length/bp
U18QPF	CCTCTGTGAGTCTATTCCTAAGCA	270	24
U18QPR	CCTCTGTGAGTCTATTCCTAAGCA	356	22
U25QPF	GAAGGTTGAGGAGATTGG	1 302	18
U25QPR	GAAGGTTGAGGAGATTGG	1 397	19

以红花植株不同部位和花冠不同发育期组织 cDNA 样品为模板, 利用 qPCR Supermix 试剂盒和 Applied Biosystems[™] QuantStudio[™] 3 实时定量 PCR 仪测定 *CtUGT18* 和 *CtUGT25* 基因的相对表达水平。

***CtUGT18*、*CtUGT25* 真核表达载体构建及过表达植株获得** 根据本课题组保存的 pMT-39 载体序列, 设计 *CtUGT18*、*CtUGT25* ORF 区的同源扩增引物 (表 3)。以红花 cDNA 第一链为模板克隆全长, 进行凝胶电泳并回收所扩增的目的片段。使用 *pEASY*[®]-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 无缝克隆试剂盒连接回收片段和线性化载体, 重连载体转化 T1 大肠杆菌 (*E. coli*) 感受态细胞, 测序验证后将测序正确的质粒转化根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞备用。

通过花粉管道法获得过表达植株, 待 T0 代红花结种子后, 收集 T1 代转基因种子, 种下 T1 代植株。PCR 鉴定 T1 代阳性植株。

转基因植株表达水平及黄酮有效成分测定 提取 T1 代阳性植株花冠 cDNA, qRT-PCR 方法检测 *CtUGT18*

Table 3 *CtUGT18*-pMT39 and *CtUGT25*-pMT39 homologous clone primers

Primer	Sequence
UGT18-pMT39-F	GAGCTTTCGCGGATCCGCCACCATGGGTTTCGACGGC
UGT18-pMT39-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTGGCGCCGCATTTTC
UGT25-pMT39-F	GAGCTTTCGCGGATCCGCCACCCCTCCAAAAATGGCTTCC
UGT25-pMT39-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTGGCGCCGCATTCTTAGGAGGTG

和 *CtUGT25* 的转录水平。选择 *L*-4-氯苯丙氨酸作为内标, 采用课题组前期建立的 UPLC-Q-TOF/MS 方法检测阳性植株中的黄酮有效成分^[21]。采用 GraphPad Prism8.0.1 软件, 在数据框中输入各组所测得的有效成分含量, 使用 *t* 检验对结果进行统计学检验, 在“Results”模块中读取对应 *P* 值。

CtUGT18、CtUGT25 原核表达载体构建及蛋白诱导表达 使用 CE Design 设计同源克隆引物 (表 4)。按 *pEASY*[®]-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 无缝克隆试剂盒说明连接 pET-28a(+) 线性化载体与克隆片段, 重连载体转化 T1 大肠杆菌 (*E. coli*) 感受态细胞, 选取阳性单克隆菌落测序验证, 将验证正确的重连载体转化 Rosetta (DE3) 表达菌株。重组载体的 Rosetta (DE3) 菌液, 接种于 100 mL LBK 液体培养基 (含 100 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基) 中。在摇床中 37 °C, 180 r·min⁻¹ 摇至 OD₆₀₀ 为 0.5 左右, 使用 100 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 在摇床中 16 °C, 90 r·min⁻¹ 过夜诱导表达。将菌液离心 (3 000 × *g*) 10 min, 10 mL PBS 缓冲液重悬菌液, 超声破碎仪 30 kW, 4 s, 60 个循环破碎细胞。超声破碎期间菌液全程浸于冰浴中, 破碎完成后菌液呈澄清状。4 °C、17 000 × *g* 离心 15 min 破碎后的菌液, 取上清液, 使用 His 标签蛋白纯化试剂盒 (耐还原整合型) 对目的蛋白进行纯化。纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳, 并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白浓度。

分子对接预测 为探索 *CtUGT25*、*CtUGT18* 的底物特异性以及与各种类型黄酮化合物的亲和力, 选择黄酮类 (flavone) 的芹菜素、木犀草素, 黄酮醇类 (flavonol) 的槲皮素、山柰酚、高良姜素, 二氢黄酮类 (flavanone) 的柚皮素作为底物, 同时选择植物 C-糖基转移酶常见的活性底物 2-羟基柚皮素与 UGTs 做亲和性测试。使用 PyRx (v0.8) 和 Autodock Vina (v1.1.1) 将目标分子与 *CtUGT18*、*CtUGT25* 进行蛋白底物对接, 对接坐标参数如表 5 所示。

蛋白酶活性检测 由于几种底物分子与 *CtUGT25* 对接、2-羟基柚皮素与 *CtUGT18* 对接都具有较好的亲和力, 因此用这些底物进行体外酶活反应测定。酶促反应总体系为 100 μL, 其中受体底物终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹, 供体 UDP-葡萄糖终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹,

Table 5 Protein substrate docking coordinate parameters

Receptor	<i>CtUGT18</i>	<i>CtUGT25</i>
Exhaustiveness	8.00	8.00
Center_x	13.82	-15.82
Center_y	9.90	1.55
Center_z	24.41	-48.41
Size_x	67.00	71.22
Size_y	65.71	62.51
Size_z	71.48	62.67

Tris-HCl (pH 7.4) 终浓度为 25 mmol·L⁻¹, 加入纯化蛋白 5 μg, 使用双蒸水补足至总体积为 100 μL。30 °C 过夜反应, 加入 200 μL 冷甲醇终止反应。4 °C、17 000 × *g* 离心 15 min。取 20 μL 上清液, 用于下一步 HPLC 检测, 其余样品于 -80 °C 冰箱中保存。

使用串联质谱联用仪 UPLC-Q-TOF/MS: Agilent 1290 Infinity LC 和 Agilent 6538 Accurate Mass Quadrupole Time-of-Flight。进一步检测酶活反应产物, 进样量 3 μL, 色谱柱为 XBridge[™] BEH C18 柱 (100 mm × 2.1 mm, 2.5 μm)。流动相为 0.1% 甲酸-水 (A) 和 0.1% 甲酸-乙腈 (B)。槲皮素、柚皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、高良姜素的洗脱梯度条件: 0~20 min (20%~55% A 和 80%~45% B), 2-羟基柚皮素的流动相比比例为固定的 25% A 和 75% B。流动相流速为 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。

质谱信号采集 *m/z* 为 50~1 100; 正离子模式下毛细管电压 4 000 V, 负离子模式下毛细管电压 3 500 V; 鞘气 45 psi, 离子源加热温度 350 °C, 干燥器流速 11 L·min⁻¹; 碰撞诱导解离 (CID) 电压 20 V; 正离子模式下参比离子 121.050 9 和 922.009 8, 负离子模式下参比离子 119.036 32 和 966.000 725。

所测结果使用 Agilent Mass Hunter B.08.00 软件进行数据提取及分析。

结果

1 红花黄酮类成分合成相关糖基转移酶基因筛选

从红花花冠转录组数据库中筛选得到 58 个糖基转移酶基因, 命名为 *CtUGT1*~*CtUGT58*。将筛选所得的 58 个 *CtUGTs* 基因在 4 个花期的相对表达量与代谢组数据库中相同样本所测得的 13 个主要成分含量进行皮尔森相关分析, 分析结果如图 1 所示。

通过皮尔森相关性分析发现, *CtUGT18* 的表达量

Table 4 *CtUGT18*-pET28a (+) and *CtUGT25*-pET28a (+) homologous clone primers

Primer	Sequence
UGT18-pet28a (F)	GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGATGGGTTCGACGGCAAAAA
UGT18-pet28a (R)	CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATTTTCAATAAAACATCAGTAATTAACCTTAT
UGT25-pet28a (F)	CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGCTTCCTCACCTCATTTTCG
UGT25-pet28a (R)	GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGGATTCTTAGGAGGTGTAATCATCCA

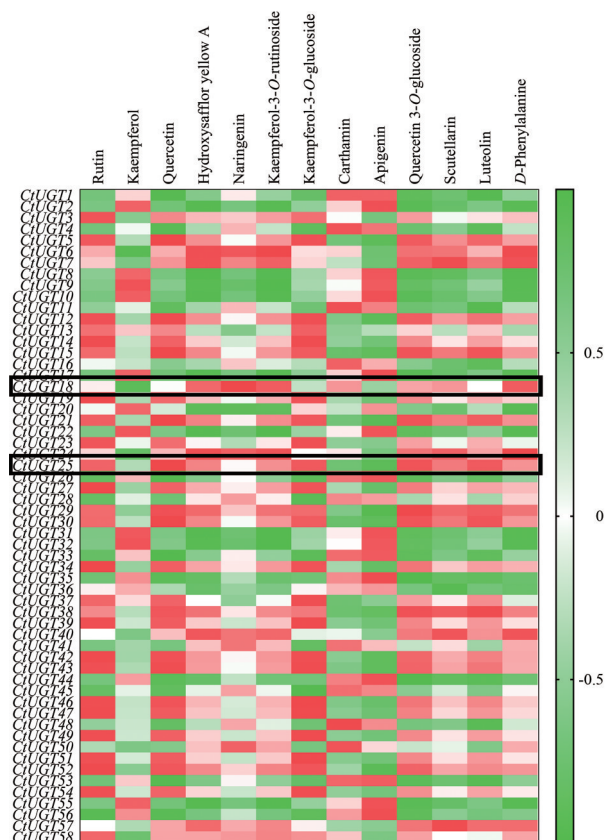


Figure 1 Correlation analysis between the expression of *CtUGTs* genes and the content of active ingredients in safflower obtained by screening

与 HSYA ($r_{\text{HSYA}} = 0.80$)、柚皮素 ($r_{\text{naringenin}} = 0.99$)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 ($r_{\text{kaempferol-3-O-rutinoside}} = 0.87$)、苯丙氨酸 ($r_{\text{D-phenylalanine}} = 0.86$)、carthamin ($r_{\text{carthamin}} = 0.51$) 5 个有效成分含量的相关系数大于 0.5; *CtUGT25* 的表达量与 HSYA ($r_{\text{HSYA}} = 0.62$)、槲皮素 ($r_{\text{quercetin}} = 1.00$)、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷 ($r_{\text{quercetin 3-O-glucoside}} = 0.92$)、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷 ($r_{\text{kaempferol-3-O-glucoside}} = 0.89$)、木犀草素 ($r_{\text{luteolin}} = 0.88$)、芦丁 ($r_{\text{rutin}} = 0.83$)、野黄芩素 ($r_{\text{scutellarin}} = 0.67$)、山柰酚-

3-*O*-芸香糖苷 ($r_{\text{kaempferol-3-O-rutinoside}} = 0.54$)、苯丙氨酸 ($r_{\text{D-phenylalanine}} = 0.52$) 9 个有效成分含量的相关系数大于 0.5。相关系数大于 0.5 即可认为两者是中等相关乃至强相关的关系,由此推测 *CtUGT18* 可能参与 HSYA、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、carthamin 等红花中有效成分的生物合成; *CtUGT25* 可能参与 HSYA、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷等红花中有效成分的生物合成。选择 *CtUGT18*、*CtUGT25* 进行下一步实验。

2 *CtUGT18*、*CtUGT25* 基因全长克隆

CtUGT18、*CtUGT25* 分别在反应温度为 65.9~70 °C、55~57.5 °C 时,可得到明亮条带。使用 DNAMAN 软件比对 *CtUGT18*、*CtUGT25* 测序片段与数据库中的序列,显示测序序列正确。

3 *CtUGT18*、*CtUGT25* 生物信息学分析

3.1 序列分析 *CtUGT18* 序列全长 1 738 bp, ORF 区在 45~1 502 bp, 编码 485 个氨基酸。*CtUGT25* 序列全长 1 746 bp, ORF 区在 11~1 483 bp, 编码 490 个氨基酸。

CtUGT18 保守域分析显示, *CtUGT18* 蛋白和 *CtUGT25* 蛋白都包含 14 个活性位点, 1 个受体-底物结合口袋, 6 个 TDP 结合位点, 属于糖基转移酶超家族。

3.2 系统进化分析 对 *CtUGT18*、*CtUGT25* 氨基酸序列进行系统进化分析如图 2 所示, *CtUGT18* 与洋蓟中的 UDP 糖基转移酶 85A8 类亲缘关系最近。*CtUGT25* 与红花 *CtUGT90A14* 氨基酸序列相似度最高, 且 *CtUGT25* 和 *CtUGT90A14* 与洋蓟中的 UDP 糖基转移酶 90A1 类亲缘关系最近, UGT90A1 家族在青蒿、除虫菊等植物中均有报道。

3.3 蛋白分析及预测 *CtUGT18* 蛋白分子式为 $C_{2444}H_{3797}N_{645}O_{714}S_{33}$, 蛋白分子量 54 697.91, 理论等电点 (pI) 为 5.73, 为不稳定的亲水性蛋白。*CtUGT25* 蛋白分子式为 $C_{2495}H_{3929}N_{669}O_{710}S_{20}$, 蛋白分子量 55 298.90, pI

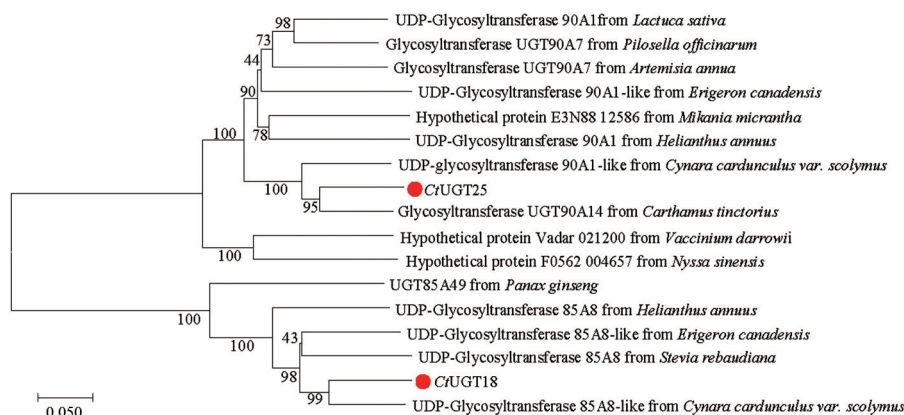


Figure 2 Phylogenetic tree of amino acid sequences of *CtUGT18* and *CtUGT25*

为 5.92, 为不稳定的亲水性蛋白。亚细胞定位预测显示, *CtUGT18* 最可能定位在细胞质, *CtUGT28* 最可能定位在细胞核。

对 *CtUGT25* 蛋白二级结构预测显示, *CtUGT25* 氨基酸序列中有 41.43% 的氨基酸组成 α -螺旋, 延伸链占 15.10%, 无规则卷曲占 36.94%, 仅有 6.53% 的氨基酸组成 β -折叠。 *CtUGT18* 蛋白二级结构预测显示, *CtUGT18* 氨基酸序列中有 44.95% 的氨基酸组成 α -螺旋, 延伸链占 14.85%, 无规则卷曲占 33.2%, 仅有 7.40% 的氨基酸组成 β -折叠。

4 *CtUGT18*、*CtUGT25* 表达特征分析

CtUGT18 在不同部位和不同发育期相对表达水平如图 3A、B 所示, *CtUGT18* 在红花植株不同部位表达水平为根 > 花冠 > 苞片 > 叶 > 茎, 主要在根中表达。 *CtUGT18* 在红花花冠各个花期的表达量为 III 期 > I 期 > II 期 > IV 期, 其中 III 期的表达量最高。

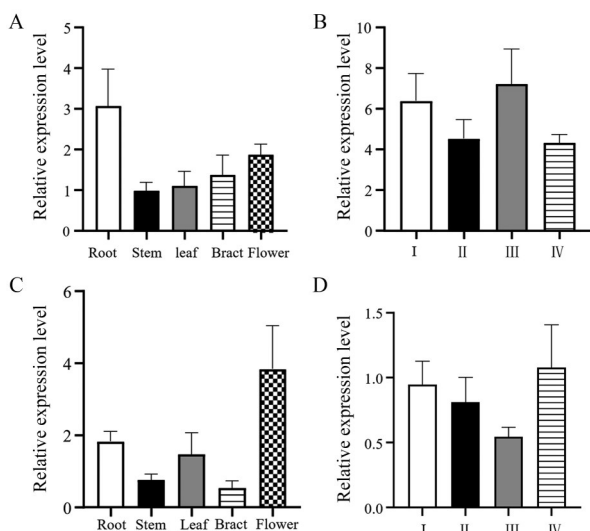


Figure 3 Relative expression levels of *CtUGT18* and *CtUGT25* in different tissues and at different developmental stages of the corolla. A: Relative expression levels of *CtUGT18* in different tissues of the plant; B: Relative expression levels of *CtUGT18* in different developmental stages of corolla; C: Relative expression levels of *CtUGT25* in different tissues of the plant; D: Relative expression levels of *CtUGT25* in different developmental stages of corolla

CtUGT25 在不同部位和不同发育期相对表达水平如图 3C、D 所示, *CtUGT25* 在植株不同部位表达水平为花冠 > 根 > 叶 > 茎 > 苞片, 主要在花冠中表达。 *CtUGT25* 在红花花冠各个花期的表达量为 IV 期 > I 期 > II 期 > III 期, 其中 IV 期的表达量最高。

5 真核表达载体构建与阳性植株鉴定

CtUGT18、*CtUGT25* 与 pMT-39 载体相连接的菌液

PCR 凝胶电泳结果条带位置正确, 测序结果正确。

根据 *CtUGT18* 过表达红花样品阳性植株鉴定结果, 得到 7 个阳性样品 *CtUGT18*-OVX1~7。根据 *CtUGT25* 过表达红花样品阳性植株鉴定结果, 得到 8 个阳性样品 *CtUGT25*-OVX1~8。

6 阳性植株表达水平与黄酮类有效成分表达测定

阳性植株表达水平测定结果如图 4A、B 所示, 与 pMT39 空载体处理的空白组相比, *CtUGT18*-OVX 组的目的基因表达量提高了 1.78 倍 ($P < 0.05$), *CtUGT25*-OVX 组的目的基因表达量提高了 2.17 倍 ($P < 0.01$)。

内标法测量 *CtUGT18* 转基因植株黄酮有效成分,

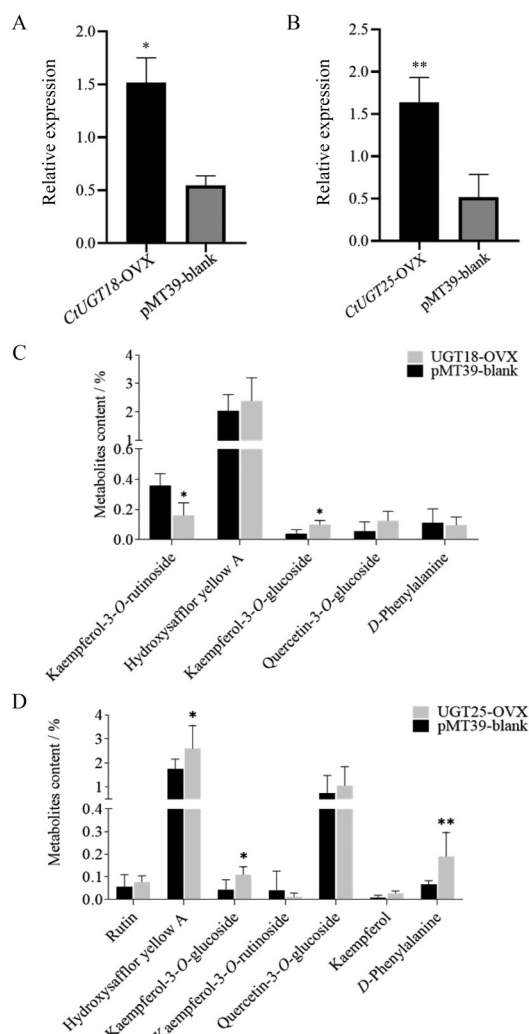


Figure 4 Results of expression level measurement and determination of active flavonoid ingredient content of transgenic plants. A: Comparison between *CtUGT18* overexpression group ($n = 8$) and blank group ($n = 7$); B: Comparison between *CtUGT25* overexpression group ($n = 7$) and blank group ($n = 7$); C: Determination of active flavonoid ingredient content of *CtUGT18* transgenic plants; D: Determination of active flavonoid ingredient content of *CtUGT25* transgenic plants. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pMT39-blank

结果显示 *CtUGT18* 过表达植株中山柰酚-3-*O*-芸香糖苷含量降低了 55.15% ($P < 0.05$), 而山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷含量提高了 1.62 倍 ($P < 0.05$, 图 4C)。峰面积归一化法计算 *CtUGT18* 转基因植株中荜草苷含量, 显示 *CtUGT18* 过表达组荜草苷含量升高了 2.28 倍 ($P < 0.01$)。

内标法测量 *CtUGT25* 转基因植株黄酮有效成分, 结果显示 *CtUGT25* 过表达植株中山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷提高了 1.61 倍 ($P < 0.05$), HSYA 含量提高了 47.9% ($P < 0.05$), 苯丙氨酸含量提高了 1.88 倍 ($P < 0.01$, 图 4D)。

7 *CtUGT18*、*CtUGT25* 原核表达载体构建及蛋白诱导表达

CtUGT18-pET28a(+), *CtUGT25*-pET28a(+) 转入大肠杆菌菌液 PCR 结果正确, 测序结果正确。

CtUGT18 蛋白纯化结果显示, 在预测的 70×10^3 Da (*CtUGT18* 与 His 蛋白共表达) 左右有较为明显的纯化条带。*CtUGT25* 蛋白纯化结果显示, 在预测的 70×10^3 Da (*CtUGT25* 与 His 蛋白共表达) 左右有较为明显的纯化条带。所得纯化蛋白浓缩后进行酶活检测。

8 AutoDock Vina 分子对接预测

CtUGT25 与槲皮素、柚皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、高良姜素、2-羟基柚皮素的结合亲和力分别为 -8.2 、 -7.8 、 -7.9 、 -7.9 、 -8.1 、 -7.7 、 -8.3 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 对接

结果如图 5A~G 所示。预测 *CtUGT25* 与上述化合物都具有较好的酶活反应潜力。

CtUGT18 与 2-羟基柚皮素结合亲和力为 -7.8 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 对接结果如图 5H 所示, 预测 *CtUGT18* 与 2-羟基柚皮素具有较好的酶活反应潜力。

将槲皮素、柚皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、高良姜素、2-羟基柚皮素与 *CtUGT25* 进行合并, 结果如图 5I 所示, 发现 *CtUGT25* 具有 2 个活性口袋, 其中槲皮素与 2-羟基柚皮素结合于同一活性口袋中, 柚皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、高良姜素结合于同一活性口袋中。

9 蛋白酶活反应结果

CtUGT25 以柚皮素为底物酶活反应结果如图 6 所示。与空白对照组相比, 酶活反应组在 6.59 min 处有新的峰产生, 二级质谱显示为单-*O*-葡萄糖苷, 推测 *CtUGT25* 可以催化柚皮素的单糖基化, 生成对应的单-*O*-葡萄糖苷产物。

CtUGT25 分别以槲皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、2-羟基柚皮素为底物进行酶活反应, 结果显示, 与空白对照组相比, 酶活反应组分别在 6.66、6.60、6.38、6.78、6.00 min 处有新的峰产生, 二级质谱都显示为单-*O*-葡萄糖苷。推测 *CtUGT25* 可以催化多种类型黄

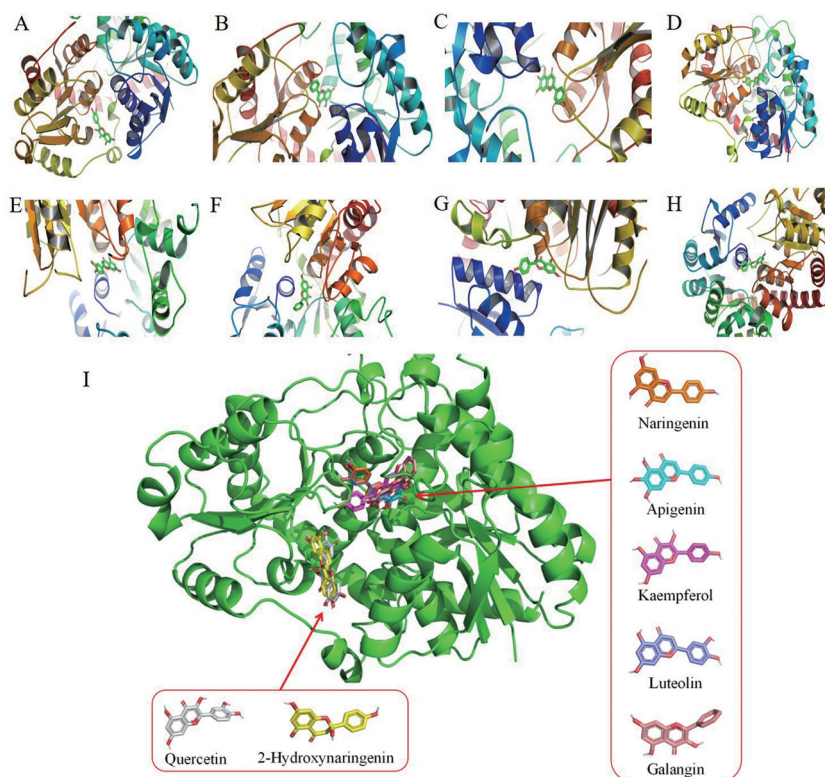


Figure 5 Molecular docking results of *CtUGT25* with quercetin (A), naringenin (B), apigenin (C), kaempferol (D), luteolin (E), galanin (F), 2-hydroxynaringenin (G), and *CtUGT18* with 2-hydroxynaringenin (H), along with the binding site prediction of *CtUGT25* with flavonoids (I)

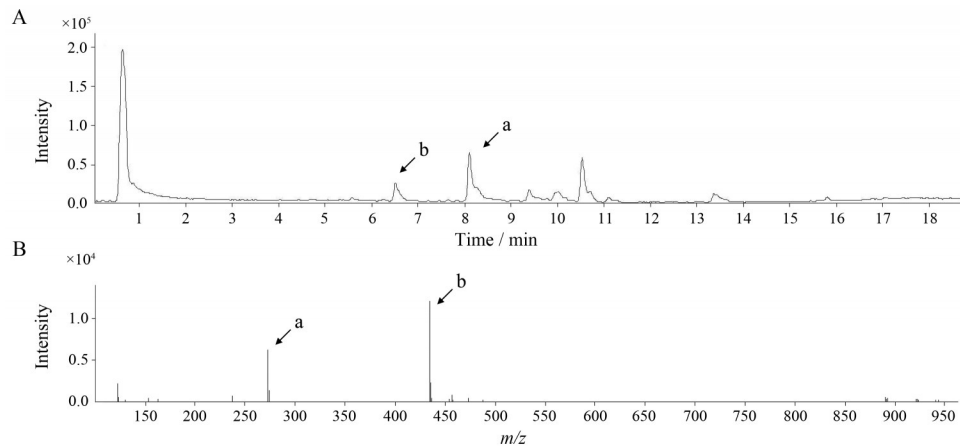


Figure 6 Enzyme activation reaction of *CtUGT25* with naringenin as substrate. A: HPLC analysis of the enzyme activation reaction of *CtUGT25* with naringenin as substrate; B: MS analysis of the enzyme activation reaction of *CtUGT25* with naringenin as substrate. a: Naringenin; b: Naringenin mono-glycosylation product

酮类化合物的单糖基化,生成对应的单-*O*-葡萄糖苷产物。

CtUGT25 以高良姜素为底物酶活实验结果如图 7 所示。与空白对照组相比,酶活反应组在 7.10 min 处有新的峰产生,二级质谱显示为单-*O*-葡萄糖苷;在 5.52 min 处有新的峰产生,二级质谱显示为双-*O*-葡萄糖苷。推测 *CtUGT25* 可以同时催化高良姜素的单糖基化和双糖基化,生成对应的单-*O*-葡萄糖苷和双-*O*-葡萄糖苷产物。

CtUGT18 以 2-羟基柚皮素为底物的酶活反应未检测到相应的糖基化产物。

讨论

由糖基转移酶介导的糖苷化是天然产物如黄酮中最常见的修饰之一,糖苷化可以增加化合物在细胞中的溶解度和稳定性^[22]。糖基转移酶在红花生长发育和次生代谢中扮演着非常重要的角色^[8]。迄今为止,红花体内具体对黄酮成分起末端修饰作用的糖基转移酶

仅有少数报道^[15,16,23,24]。

通过对一些功能尚不明确的植物基因进行时间及空间的表达特征分析,可以在一定程度上提示该基因具有的生理功能^[25]。在番茄^[26]、茶树^[27]、西葫芦^[28]等植物的研究中均有大量报道。在红花中,Wu 等^[25]利用 qRT-PCR 对红花昼夜节律基因 *CtPRR1* 在红花体内时-空间转录水平测定,发现了 *CtPRR1* 对红花中黄酮类化合物昼夜节律积累的负调节作用。Lu 等^[29]对红花花青素还原酶基因 *ANR* 进行表达模式分析,发现其花中表达量最高,在根和茎中表达量最低。Peng 等^[30]发现 HD-Zip 基因家族在红花不同组织中表达量不同。本研究运用 qRT-PCR 的方法,对 *CtUGT18*、*CtUGT25* 在红花植株不同部位、花冠不同发育期中进行了表达特征分析,推测 *CtUGT18* 参与根中的黄酮类化合物次生代谢途径,可能与红花的生长、抗外界胁迫等生理功能相关;*CtUGT25* 则与红花中黄酮积累模式相似,推测其参与了花中黄酮类化合物的生物合成。

过表达技术作为植物体内进行基因功能研究的常

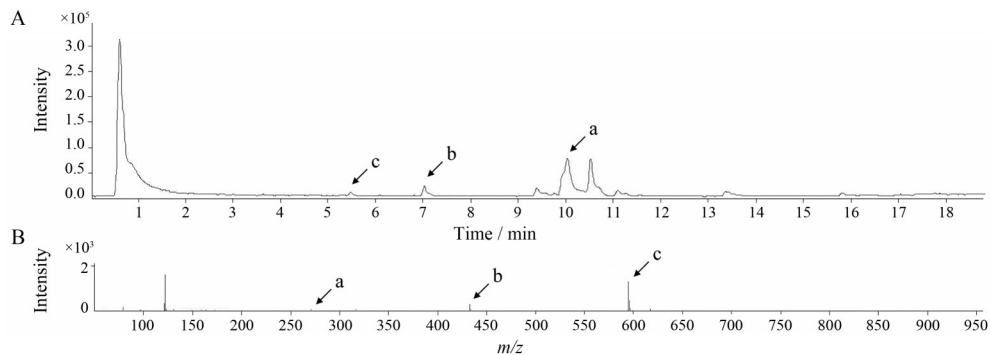


Figure 7 Enzymatic activity reaction of *CtUGT25* with galangin as substrate. A: HPLC analysis of the enzymatic activity reaction of *CtUGT25* with galangin as substrate; B: MS analysis of the enzymatic activity reaction of *CtUGT25* with galangin as substrate. a: Galangin; b: Galangin mono-glycosylation product; c: Galangin double glycosylation product

用方法,技术成熟应用广泛,通过使目的蛋白在植物体内表达量升高^[31],影响相关生理网络,获得相应的植株表型,以探索该基因及蛋白的具体功能,在水稻^[32]、玉米^[33]、拟南芥^[34]、烟草^[35]等植物中均有报道。本研究通过花粉管通道法进行过表达,共获得 *CtUGT18* 过表达植株 7 株, *CtUGT25* 过表达植株 8 株。UPLC-Q-TOF/MS 测定 T1 代花冠黄酮类化合物含量,推测 *CtUGT18* 主要在红花体内参与蒽草苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷的合成; *CtUGT25* 可能具有底物杂泛性并参与了红花中特有的查尔酮苷类 HSYA 等化合物的合成。但 *CtUGT18*、*CtUGT25* 在红花体内是怎样对底物进行糖基化的,还有待进一步探究。

对目的基因进行体外蛋白表达及酶活性研究是红花 UGT 功能研究的一个非常重要的环节。Sui 等^[24]发现了 UGT88B2 可以体外催化山柰酚形成糖基化产物成山柰酚 7-*O*- β -D 葡萄糖醛酸苷; Zhang 等^[23]发现了 3 个 UGT 基因 (UGT84A33、UGT71AE1 和 UGT90A14) 对小檗碱类化合物的催化活性; Xie 等^[15]发现底物杂泛性的糖基转移酶 UGT71E5 可在体外催化 19 个化合物的糖基化反应。本研究使用 AutoDock Vina 分子对接预测两者的糖基转移酶功能,结果显示 *CtUGT25* 对多种黄酮类化合物有较好的酶活反应潜力, *CtUGT18* 对 2-羟基柚皮素有较好的酶活反应潜力。基于预测结果,进一步在体外原核表达蛋白并进行酶活反应,结果显示 *CtUGT25* 蛋白可催化槲皮素、柚皮素、芹菜素、山柰酚、木犀草素、2-羟基柚皮素生成对应的单-*O*-葡萄糖苷产物,同时可催化高良姜素生成对应的双-*O*-葡萄糖苷产物。但是 *CtUGT25* 对上述底物的具体糖基化位点还有待进一步的分析,考虑通过更换载体、定点诱导等方法探究其在红花中的具体作用方式。体外酶活反应中, *CtUGT18* 蛋白的催化结果为阴性,考虑 *CtUGT18* 可能具有严格的底物选择性,其特异性催化底物不在选择的底物范围内;许多植物 UGT 蛋白的体内外功能并不完全一致^[36],考虑 *CtUGT18* 可能在体外利用类黄酮苷元以外的其他化合物作为底物;此外,UGT 蛋白催化的酶活反应常常由于反应条件的改变引起产物的改变^[37],因此也可能是体外酶活反应的条件未达到 *CtUGT18* 蛋白催化的适宜范围内。

本研究分析并验证了 *CtUGT25* 及 *CtUGT18* 在红花体内外的功能,证明 *CtUGT25* 能促进山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷及 HSYA 的积累,可能参与红花中特有的有效成分 HSYA 的生物合成, *CtUGT18* 可能参与山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、蒽草苷的生物合成。 *CtUGT25* 在体外异源表达可以对多种底物进行糖基化修饰。下一步将继续致力于更多 UGT 基因的研究,为最终实现 HSYA 等

红花中高价值黄酮糖苷类成分的体外合成和工业化生产奠定坚实基础。

作者贡献: 郭美丽、高越设计实验并提供资金; 齐书艺、王璐暖参与实验及论文撰写; 何贝轩参与数据分析。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Guo ML, Zhang HM, Zhang MY. Textual research on red flower materia medica [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1996, 19: 202-203.
- [2] He J, Shen Y, Jiang JS, et al. New polyacetylene glucosides from the florets of *Carthamus tinctorius* and their weak anti-inflammatory activities [J]. Carbohydr Res, 2011, 346: 1903-1908.
- [3] Tu YH, Xue YR, Guo DD, et al. *Carthami flos*: a review of its ethnopharmacology, pharmacology and clinical applications [J]. Rev Bras Farmacogn, 2015, 25: 553-566.
- [4] Li D, Ma BZ, Liang YY, et al. Research progress on extraction methods and content determination of hydroxysafflower yellow A in safflower [J]. J China Japan Friendship Hosp (中日友好医院学报), 2018, 32: 39-41.
- [5] Sawada S, Suzuki H, Ichimaida F, et al. UDP-glucuronic acid: anthocyanin glucuronosyltransferase from red daisy (*Bellis perennis*) flowers [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 899-906.
- [6] Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence [J]. Pharmacogenetics, 1997, 7: 255-269.
- [7] Guang NZ, Shuang F, Xiao L, et al. Crystal structures of rhamnosyltransferase UGT89C1 from *Arabidopsis thaliana* reveal the molecular basis of sugar donor specificity for UDP- β -L-rhamnose and rhamnosylation mechanism [J]. Plant J, 2019, 99: 257-269.
- [8] Liu MZ, Wang DD, Qin C, et al. Research progress in understanding the structure, mechanism, and engineering of plant glycosyltransferases [J]. Sci Sin (Vitae) (中国科学: 生命科学), 2019, 49: 1133-1142.
- [9] Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, et al. Glycosyltransferases: managers of small molecules [J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8: 254-263.
- [10] Shao H, He X, Achnine L, et al. Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, 2005, 17: 3141-3154.
- [11] Wang J, Ma XM, Kojima M, et al. Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin *N*-glucosylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 65: 9-16.
- [12] Nagatomo Y, Usui S, Ito T, et al. Purification, molecular cloning and functional characterization of flavonoid C-glycosyltransferases from *Fagopyrum esculentum* M. (buckwheat) cotyledon

- [J]. *Plant J*, 2014, 80: 437-448.
- [13] Wang H, Oman TJ, Zhang R, et al. The glycosyltransferase involved in thurandacin biosynthesis catalyzes both *O*- and *S*-glycosylation [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 84-87.
- [14] Sui SY. Functional Characterization and Biocatalysis of Key Enzymes for Safflower Flavonol Glycoside Biosynthesis (红花黄酮醇苷生物合成关键酶的功能鉴定及生物催化) [D]. Beijing: Central University for Nationalities, 2020.
- [15] Xie KB, Chen RD, Chen DW, et al. Enzymatic *N*-glycosylation of diverse arylamine aglycones by a promiscuous glycosyltransferase from *Carthamus tinctorius* [J]. *Adv Synth Catal*, 2017, 359: 603-608.
- [16] Guo DD, Liu F, Tu YH, et al. Expression patterns of three UGT genes in different chemotype safflower lines and under MEJA stimulus revealed their potential role in flavonoid biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e158159.
- [17] Zhang G. Studies on Chemical Constituents and Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine Safflower (*Flos Carthami*) (红花的化学成分及品质评价) [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2001.
- [18] Jiang JS, He J, Feng ZM, et al. Two new quinochalcones from the florets of *Carthamus tinctorius* [J]. *Org Lett*, 2010, 12: 1196-1199.
- [19] Yin HB, He ZS. A novel semi-quinone chalcone sharing a pyrrole ring *C*-glycoside from *Carthamus tinctorius* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2000, 41: 1955-1958.
- [20] Guo DD, Xue YR, Li DQ, et al. Overexpression of *CtCHS1* increases accumulation of quinochalcone in safflower [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1409.
- [21] He BX, Xue YR, Tu YH, et al. *CtCHS4* induces the accumulation of safflower quinone chalcones in response to methyl jasmonate induction [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 636-645.
- [22] Xiao J, Muzashvili TS, Georgiev MI. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32: 1145-1156.
- [23] Zhang YJ, Xie KB, Liu AJ, et al. Enzymatic biosynthesis of benzyloisoquinoline alkaloid glycosides via promiscuous glycosyltransferases from *Carthamus tinctorius* [J]. *Chin Chem Lett*, 2019, 30: 443-446.
- [24] Sui SY, Guo RM, Xie KB, et al. UGT88B2: a promiscuous *O*-glycosyltransferase from *Carthamus tinctorius* [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12: 440-445.
- [25] Wu JH, He BX, Jia XL, et al. Characterization and function study of circadian rhythm gene *CtPRR1* in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *J Pharm Pract Serv (药实践杂志)*, 2022, 40: 38-43.
- [26] Chen X, Shen CY, Mo FL, et al. Identification of BZR gene family in tomato and expression patterns analysis under abiotic stress [J]. *J Northeast Agric Univ (东北农业大学学报)*, 2021, 52: 9-17.
- [27] Li WX, Lv LT, Tian SY, et al. Identification and expression pattern analysis of ADH gene family in *Camellia sinensis* (L.) [J]. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2022, 20: 93-104.
- [28] Zhang X, Chen JH, Xue YY. Cloning and expression analysis of CpMYB-TRF1 gene in *Cucurbita pepo* [J]. *Plant Physiol J (植物生理学报)*, 2022, 58: 281-293.
- [29] Lu DD, Tan ZW, Li L, et al. Cloning and expression analysis of anthocyanidin reductase gene ANR in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *J Nucl Agric Sci (核农学报)*, 2022, 36: 517-526.
- [30] Peng SP, Zhao L, Wang T, et al. Genome-wide identification bioinformatics and expression analysis of HD-Zip gene family in *Carthamus tinctorius* [J]. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2022. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220223.1114.012.html>.
- [31] Liu YD. Molecular Mechanism of Overexpression *AnGolSI* Improves Cold Tolerance of Tomato (超表达 *AnGolSI* 提高番茄抗冷性的分子机理) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.
- [32] Sun Q. Construction of Expression Vector of *OsCOI* Gene and Genetic Transformation in Rice (水稻 *OsCOI* 基因表达载体构建及其遗传转化) [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2010.
- [33] Song XJ. Isolation and Functional Analysis of a Group C MAPK Gene *ZmMPK7* in *Zea mays* (玉米 C 组促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 基因 *ZmMPK7* 的分离及功能分析) [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2009.
- [34] Hu HQ. Identification of Arabidopsis Glucosyltransferase Gene Involved in Plant Salt Tolerance (拟南芥耐盐相关糖基转移酶基因鉴定) [D]. Jinan: Shandong University, 2010.
- [35] Bai YH. Isolation and Characterization of Anthocyanin-specific Pathway Genes and Transcription Factors in Tobacco (烟草花青素合成相关基因及转录因子基因的克隆与功能验证研究) [D]. Xianyang: Northwest Agricultural and Forestry University, 2012.
- [36] Su XJ, Shen G, Di SK, et al. Characterization of *UGT716A1* as a multi-substrate UDP: flavonoid glucosyltransferase gene in *Ginkgo biloba* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2085.
- [37] Zhao XQ, Wang PQ, Li MZ, et al. Functional characterization of a new tea (*Camellia sinensis*) flavonoid glucosyltransferase [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 2074-2083.