

DOI:10.11931/guihaia.gxzw202501024

盐肤木中 UDP-葡萄糖合成关键 *UGPase* 酶基因的克隆与功能预测

郭志强, 朱亚静, 杨洋, 樊静, 杨冰, 梁宏伟, 陈发菊, 刘文*

(三峡大学 三峡区域植物遗传与种质创新重点实验室/生物技术研究中心, 湖北 宜昌 443002)

摘要: 克隆盐肤木 (*Rhus chinensis*) 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase, UGPase) 家族基因, 探究参与催化 UDP-葡萄糖生物合成的关键基因, 为进一步解析五倍子中没食子单宁的高含量积累机制奠定基础。该研究依托三代转录组数据, 开展基因同源克隆、蛋白序列分析、原核表达及体外酶活分析、基因表达模式分析、启动子克隆及序列分析等。结果表明: (1) 鉴定到 4 个 *RcUGPase* 家族基因, 并对其编码蛋白进行生物信息学分析, 与其他物种的同源基因构建系统进化树, 发现 *RcUGPase1* 与 *RcUGPase3* 分属于 UGPase-A 与 UGPase-B 类型。(2) 克隆到 *RcUGPase1*、*RcUGPase2* 和 *RcUGPase4* 三个基因, 利用 pET28a 载体构建了其重组原核表达载体, 并成功诱导纯化重组蛋白, 体外酶活分析发现 *RcUGPase1* 具有 UGPase 酶催化活性。(3) 五倍子发育早期 (21 d 和 47 d), 体内 *RcUGPase* 酶活性显著上升, 与前人报道的单宁含量的逐渐升高是一致的。(4) 转录组数据显示在五倍子发育早期 (21 d 和 47 d), *RcUGPase1* 的表达显著上调, *RcUGPase2* 的表达下降, *RcUGPase3* 和 *RcUGPase4* 变化不显著。(5) 克隆 *RcUGPase1* 基因上游 2 334 bp 的启动子片段, 预测出其上有多种环境和激素响应元件可能参与上游的调控网络。综上认为, 结合体外酶活、基因表达与五倍子中 *RcUGPase* 酶活性和单宁含量的相关性等结果, 推测 *RcUGPase1* 可能是五倍子中催化 UDP-葡萄糖合成的关键酶基因, 五倍子发育初期 *RcUGPase* 酶活性的上调可能对五倍子中单宁的积累起到重要作用。

关键词: 盐肤木, 五倍子, UGPase, UDP-葡萄糖, 没食子单宁合成

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号:

Cloning and functional prediction of the key *UGPase* genes responsible for UDP-glucose synthesis in *Rhus chinensis*

GUO Zhiqiang, ZHU Yajing, YANG Yang, FAN Jing, YANG Bing,
LIANG Hongwei, CHEN Faju, LIU Wen*

(China Three Gorges University Key Laboratory of Three Gorges Regional Plant Genetics and Germplasm Enhancement/Biotechnology Research Center, Yichang 443002, Hubei, China)

Abstract: The uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase (UGPase) family genes in *Rhus chinensis* were cloned, and the key *UGPase* genes responsible for UDP-glucose biosynthesis were investigated. The study will lay the foundation for further analysis of the mechanisms of gallotannins over-accumulation in Chinese gallnut. This study relied on third-generation transcriptome data to conduct gene homologous cloning, protein sequence analysis, prokaryotic protein expression and *in vitro* enzyme catalytic activity analysis, gene expression pattern analysis,

基金项目: 国家自然科学基金(32370393); 湖北省中央引导地方科技发展专项(2022BGE265)。

第一作者: 郭志强(1997—), 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究, (E-mail) 2411779294@qq.com。

通信作者: 刘文, 博士, 副教授, 研究方向为药用植物天然产物合成调控, (E-mail) liuwen@ctgu.edu.cn。

promoter cloning and sequence analysis, etc.. The results were as follows: (1) Four *RcUGPase* family genes were identified, and their protein sequences were further compared with the homology genes in other species by constructing a phylogenetic tree, which suggested that *RcUGPase1* and *RcUGPase3* belonged to UGPase-A class and UGPase-B class, respectively. (2) *RcUGPase1*, *RcUGPase2*, and *RcUGPase4* were successfully cloned and reconstituted onto pET28a vector, and recombinant proteins were obtained by the prokaryotic expression system. *In vitro* enzyme activity analysis revealed that the *RcUGPase1* had a UGPase enzymatic activity. (3) The *in vivo* UGPase enzyme activity was significantly increased during the early developmental stages of Chinese gallnut formation (21 d and 47 d), when the endogenous contents of gallotannins were gradually gained. (4) During this process, the expression of *RcUGPase1* was dramatically up-regulated, the expression of *RcUGPase2* was down-regulated, and no significant changes were observed on the expression of *RcUGPase3* and *RcUGPase4*. (5) A 2 334 bp promoter sequence upstream of *RcUGPase1* gene was cloned and multiple *cis*-acting elements in response to environments and hormone signaling were predicted. In summary, based on *in vitro* enzyme activity analysis and the correlation between gene expression with *in vivo* UGPase enzyme activity and gallotannins contents, *RcUGPase1* may be the key enzyme gene catalyzing the synthesis of UDP-glucose in *Rhus chinensis*, and the elevated UGPase enzyme activity during the early developmental stages of Chinese gallnut might play a key role in over-accumulation of gallotannins in Chinese gallnut.

Keywords: *Rhus chinensis*, Chinese gallnut, UGPase, UDP-glucose, biosynthesis of gallotannins

盐肤木 (*Rhus chinensis*) 是漆树科 (Anacardiaceae) 盐肤木属 (*Rhus*) 落叶小乔木, 在中国除东北、内蒙古和新疆等地区外广泛分布 (俞德浚等, 1980)。盐肤木在中国有着悠久的药用历史, 其根、叶、花和果实都可以入药, 具有清热解暑、涩肠止泻、散瘀止血和舒筋活络等作用 (吴献等, 2019)。盐肤木是五倍子蚜虫的寄主之一, 其被五倍子蚜虫叮咬后可在幼嫩组织处形成虫瘿又名五倍子, 是中国传统中药。有研究表明, 五倍子有多种药用价值, 如抗龋齿、抗菌、抗炎、助伤愈、抗氧化和抗癌等 (梁正等, 2022)。因富含水解单宁, 五倍子还是全球工业单宁和没食子酸的主要来源之一。盐肤木是脆弱生态环境治理的先锋植物, 且具有吸附与富集土壤重金属的作用, 因此也是良好的土壤修复树种 (王悟敏等, 2022)。在农业上, 盐肤木是优质的蜜源植物, 其嫩枝、叶和花也可做猪饲料且有一定的杀菌作用 (高洁莹等, 2015)。鉴于五倍子在医药、化工、动物饲料、食品添加剂、矿冶和电子等多方面均有重要用途 (张亮亮, 2020), 目前五倍子的原材料供应缺口较大, 如何提高五倍子产能是目前亟待解决的问题。

尿苷二磷酸葡萄糖 (uridine diphosphate glucose, UDP-glucose, UDPG) 广泛存在于植物、动物和微生物细胞中, 作为糖基供体参与多种植物中糖基化反应, 如糖苷、糖蛋白和糖脂的合成, 以及众多糖类如蔗糖、纤维素和半纤维素等的生物合成 (Wang et al., 2011; Ye et al., 2022; Zhang, 2024)。Zhao 等 (2025) 报道了在罗汉果中引入拟南芥蔗糖合酶 (*AtSUS1*) 合成 UDP-葡萄糖, 实现罗汉果醇到罗汉果苷 V 的直接合成, 摆脱了外源添加 UDP-葡萄糖。此外, UDP-

葡萄糖还参与众多次生代谢产物如黄酮类、萜类和类固醇等的糖基化反应(Yonekura, 2009)。而在没食子单宁合成过程中,以没食子酸与UDP-葡萄糖为底物合成 β -葡糖倍苷是植物没食子单宁生物合成的关键第一步反应,并且后续的合成仍需要以 β -葡糖倍苷作为酰基供体以进一步催化生成单宁(Grundhöfer et al., 2001)。因此,UDP-葡萄糖生物合成会间接影响五倍子中没食子单宁的合成与积累。但是,盐肤木中催化UDP-葡萄糖生物合成的关键酶基因尚未见报道,其在调控没食子单宁合成中的作用也不明晰。

在植物的糖代谢途径中,尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase)催化尿苷三磷酸(UTP)与葡萄糖-1-磷酸(Glc-1-P)生成尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)与焦磷酸(PPi),该反应是一个可逆反应(Zhang, 2024)。目前,已在多种植物中分离到了UGPase基因,如水稻(*Oryza sativa*) (Abe et al., 2002)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Meng et al., 2008)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*) (Wang et al., 2011)、大麦(*Hordeum vulgare*) (Klaus et al., 1996)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) (Katsube et al., 1990)、金线莲(*Anoectochilus roxburghii*) (嵇元焯等, 2021)、铁皮石斛(*Dendrobium officinale*) (Chen et al., 2020)和党参(*Codonopsis pilosula*) (李晶等, 2016)等。但是盐肤木中该编码基因还有待进一步研究。

鉴于五倍子是我国重要的林特产品和出口创汇商品,而其富含的没食子单宁是体现其药用价值和工业价值的关键,深入挖掘没食子单宁合成的关键调控基因对于解析五倍子中单宁高含量积累机制以及单宁合成生物学研究具有重要意义。因此,本研究利用同源克隆、序列分析、酶活性分析、表达模式分析及启动子分析等手段,探究盐肤木中催化没食子单宁前体物质UDP-葡萄糖生物合成的关键UGPase基因,为进一步解析没食子单宁的在五倍子中的积累机制提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

本试验所用五倍子材料均来自湖北省宜昌市五峰县。将人工挂虫当天的盐肤木叶翅材料视为第0天材料,依次取第21天、47天、69天、105天时的角倍蚜叮咬产生的五倍子材料,采集五倍子后切开取出其内角倍蚜洗净,置于取样管中并做好记录,于液氮速冻后置于-80℃超低温冰箱保存,用于后续实验。五倍子不同发育时期转录组数据由诺禾致源公司Illumina测序平台完成,并设置3次生物重复。

本试验所用的蛋白原核表达BL21(DE3)感受态细胞购自南京诺唯赞生物技术股份有限公司(C504-02/03)。大肠杆菌DH5 α 感受态为实验室制备保存。

1.2 生物信息学分析

蛋白的氨基酸数目、分子量与等电点均利用ExPASy数据库(<https://www.expasy.org/>)进行预测分析;蛋白跨膜螺旋结构数目利用TMHMM Server v.2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)、TMbase(<https://www.scienceopen.com/document?vid=b094d235-b24c-4d97-b7af-47c68d36f380>)和Transporter Classification Database(<http://www.tcdb.org/>)三个数据库进行预测分析;蛋白的亚细胞定位情况利用3个在线数据库CELLO v2.5(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)、Plant mPLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)和WoLFPSORT(<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)进行预测分析,为了提高预测结果的可信度,数

数据库的参数设置为同时满足：CELLO v2.5 数据库要求可靠评分>2.0、Plant mPLoc 数据库取前二的结果、WoLFPSORT 数据库的置信评分>7；RcUGPase 蛋白的 motif 分析利用 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 预测；利用 PlantCARE 在线网站预测 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测分析启动子序列；使用 MEGA X 软件利用邻接法(Neighbor-joining)构建了目的蛋白的系统进化树，并运用 evolview 在线网站 (<https://evolgenius.info/evolview-v2/>) 对进化树做了可视化处理。

1.3 植物 mRNA 的提取与反转录

使用南京诺唯赞公司的多糖多酚试剂盒 (FastPure[®] Plant Total RNA Isolation Kit, RC401-01) 进行盐肤木叶片总 RNA 提取。提取完成的 RNA 需使用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 的纯度，即要求 A_{260} 与 A_{280} 的比值在 1.9 到 2.1 之间， A_{260} 与 A_{230} 的比值大于 1.5，随后使用 1%浓度的琼脂糖凝胶电泳检测所得 RNA 的是否降解或含有 DNA 残余。对满足要求的 RNA 使用上海碧云天公司的反转录试剂盒(BeyoRT[™] II First Strand cDNA Synthesis Kit, D7168S) 反转录成 cDNA，用于后续的基因克隆。

1.4 原核表达载体的构建及原核诱导表达

利用原核表达载体 pET28a 构建重组表达载体。首先设计了基因的序列扩展引物，并带上 pET28a 表达载体经 *Bam*HI 酶切后的同源臂 (5'端序列为 AGCAAATGGGTCGCGGA, 3'端序列为 CGGAGCTCGAATTCGGA)。以盐肤木叶片总 RNA 反转录成的 cDNA 为模板扩增目的基因片段。将 pET28a 载体用 *Bam*HI 酶切线性化后与回收纯化的目的基因片段进行 in-fusion 重组，对转化的阳性克隆进行 PCR 验证后送测序。将测序正确的 pET28a 重组载体转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌，通过筛选不同 IPTG 浓度 (0、0.5、1 mmol·L⁻¹)、诱导时间 (4~10 h) 与诱导温度 (16 °C 和 37 °C)，进行原核诱导表达。最后利用碧云天公司 His 标签蛋白纯化试剂盒 (P2226) 进行蛋白诱导表达纯化。蛋白质分子量标准 (Protein Marker) 购自碧云天公司 (P0061)。

1.5 UGPase 酶活测定

使用植物尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶活性光谱法定量检测试剂盒 (上海杰美基因, GMS16025) 对 UGPase 蛋白进行酶活测定。利用 Bradford 法对纯化蛋白含量进行定量，以经考马斯亮蓝 G-250 染色后的不同浓度梯度 BSA 溶液在 595 nm 波长下的吸光度绘制标准曲线，将蛋白样品同样经过考马斯亮蓝 G-250 染色后测量 595 nm 下吸光度，根据标准曲线获得未知蛋白浓度。UGPase 酶活测定利用酶标板进行，方法参照试剂盒说明。

1.6 染色体步移(genome-walking)

利用 Genome Walking Kit 试剂盒 (TaRaKa, 6108) 扩增未知的启动子片段，通过同向嵌套的 3 个特异性引物 SP1、SP2、SP3 与简并引物 AP 组合使用进行 TAIL-PCR (Terminal Asymmetric Interlaced PCR)，对特异性产物富集以获得未知启动子序列。染色体步移参考试剂盒说明书方法进行。

2 结果与分析

2.1 盐肤木 UGPase 家族基因的鉴定及编码蛋白质性质分析

根据已知的尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因家族的保守结构域 (PF01704)，从课题组前期的盐肤木叶片组织三代转录组测序数据中检索得到 9 个候选的 unigene 基因。进一步

去冗余,并进行基因克隆验证,最终获得4个 *UGPase* 同源基因并将其分别命名为 *RcUGPase1*、*RcUGPase2*、*RcUGPase3*、*RcUGPase4* (表 1), 其编码蛋白的氨基酸数目分别为 469、635、873 和 625。利用 ExPASy 数据库预测分析发现, 4 个蛋白的分子重量分别为 51.62、70.69、97.23、68.96 kD, 等电点分别为 6.12、8.66、6.45、5.99。利用 TMHMM Serverv.2.0、TMbase 和 Transporter Classification Database 三个数据库预测分析发现, 4 个蛋白的跨膜螺旋结构数目均为 0。同时, 运用 CELLO v2.5、Plant mPLoc 和 WoLFPSORT 三个数据库预测了 4 个蛋白的亚细胞定位情况。综合三个数据库的预测分析结果, 最终得出 4 个蛋白分别定位于细胞质、线粒体、叶绿体和细胞质中。

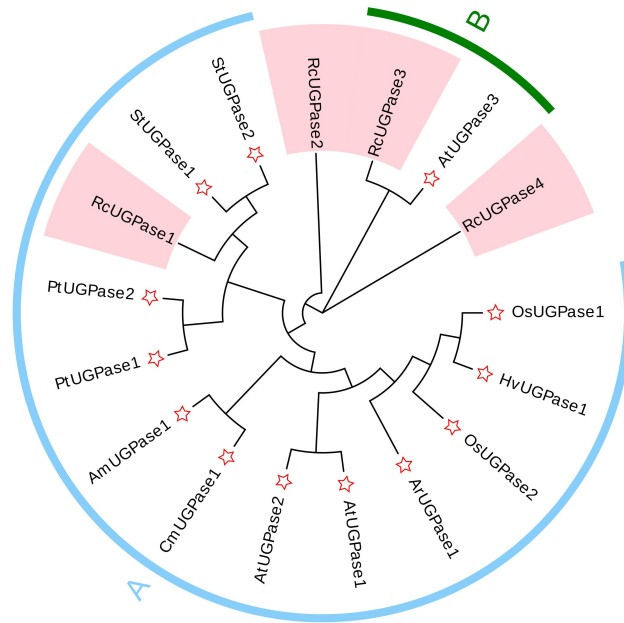
表 1 盐肤木 *UGPase* 家族蛋白的生物信息学分析

Table 1 Bioinformatics analysis of *UGPase* family proteins in *Rhus chinensis*

基因名称 Gene name	氨基酸 Amino acids (aa)	分子重量 Molecular weight (kD)	等电点 Isoelectric point	跨膜螺旋个数 Number of transmembrane helices	亚细胞定位预测 Prediction of subcellular localization
<i>RcUGPase1</i>	469	51.62	6.12	0	细胞质 Cytoplasm
<i>RcUGPase2</i>	635	70.69	8.66	0	线粒体 Mitochondrion
<i>RcUGPase3</i>	873	97.23	6.45	0	叶绿体 Chloroplast
<i>RcUGPase4</i>	625	68.96	5.99	0	细胞质 Cytoplasm

2.2 盐肤木 *UGPase* 基因的聚类分析

以往的研究分别报道了拟南芥、水稻、马铃薯和金线莲等植物中有活性的 *UGPase* 酶 (Katsube et al., 1990; Abe et al., 2002; Meng et al., 2008; 嵇元焯等, 2021), 并且一般认为存在两类 *UGPase* 酶: *UGPase-A* 和 *UGPase-B* (Leszek et al., 2010)。为了进一步明确盐肤木中催化 UDP-葡萄糖合成的关键 *UGPase* 酶, 首先将 4 个盐肤木 *UGPase* 蛋白与 13 个其他物种的具有催化活性的同源蛋白构建了系统进化树。结果显示, *RcUGPase1* 与属于 *UGPase-A* 类的 *StUGPase1*、*StUGPase2* 等亲缘关系最近; *RcUGPase3* 与 *AtUGPase3* 亲缘关系最近, 两者同属于 *UGPase-B* 类型; *RcUGPase2* 和 *RcUGPase4* 与这两类蛋白相对而言同源性较远 (图 1)。



Rc. 盐肤木; At. 拟南芥; St. 马铃薯; Pt. 欧美山杨; Am. 黄芪; Cm. 西瓜; Os. 水稻; Hv. 大麦; Ar. 金线莲。

Rc. *Rhus chinensis*; At. *Arabidopsis thaliana*; St. *Solanum tuberosum*; Pt. *Populus tremula* × *P. tremuloides*; Am. *Astragalus membranaceus*; Cm. *Cucumis melo*; Os. *Oryza sativa*; Hv. *Hordeum vulgare*; Ar. *Anoectochilus roxburghii*.

图 1 盐肤木 RcUGPase 蛋白家族进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of RcUGPase family members

2.3 盐肤木 UGPase 蛋白基序分析

进一步利用 MEME v5.5.5 网络在线数据库对盐肤木中 4 个 UGPase 蛋白以及 13 个其他植物的 UGPase 蛋白序列进行蛋白基序 (motif) 分析。设置 motif 数目为 15 个, 设定大小区间在 5~60 个氨基酸之间。从蛋白 motif 分布规律上看, RcUGPase1 与 AtUGPase1 和 AtUGPase2 等 UGPase-A 类蛋白的较一致, 蛋白基序结构相似度高, 而 RcUGPase3 与 UGPase-B 类蛋白 AtUGPase3 完全一致 (图 2)。以上结果与蛋白序列系统进化分析的结果 (图 1) 一致, 据此我们认为 RcUGPase1 属于 A 类 UGPase 蛋白, 而 RcUGPase3 属于 B 类 UGPase 蛋白, 盐肤木中可能同时存在 UGPase-A 类和 UGPase-B 类 UGPase 酶。

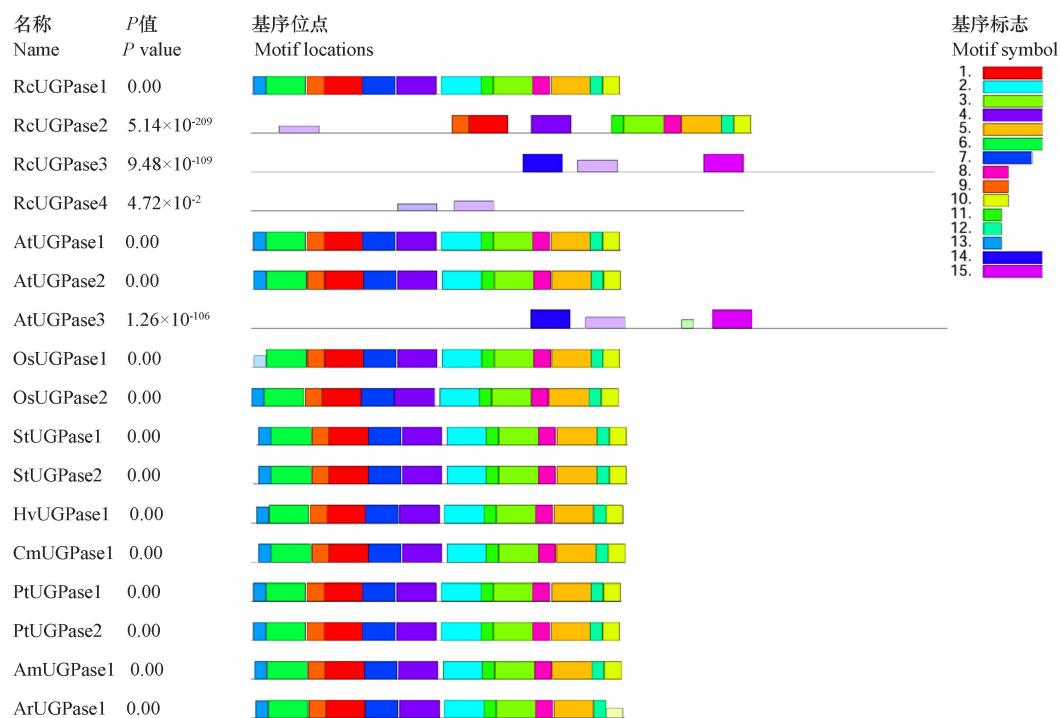
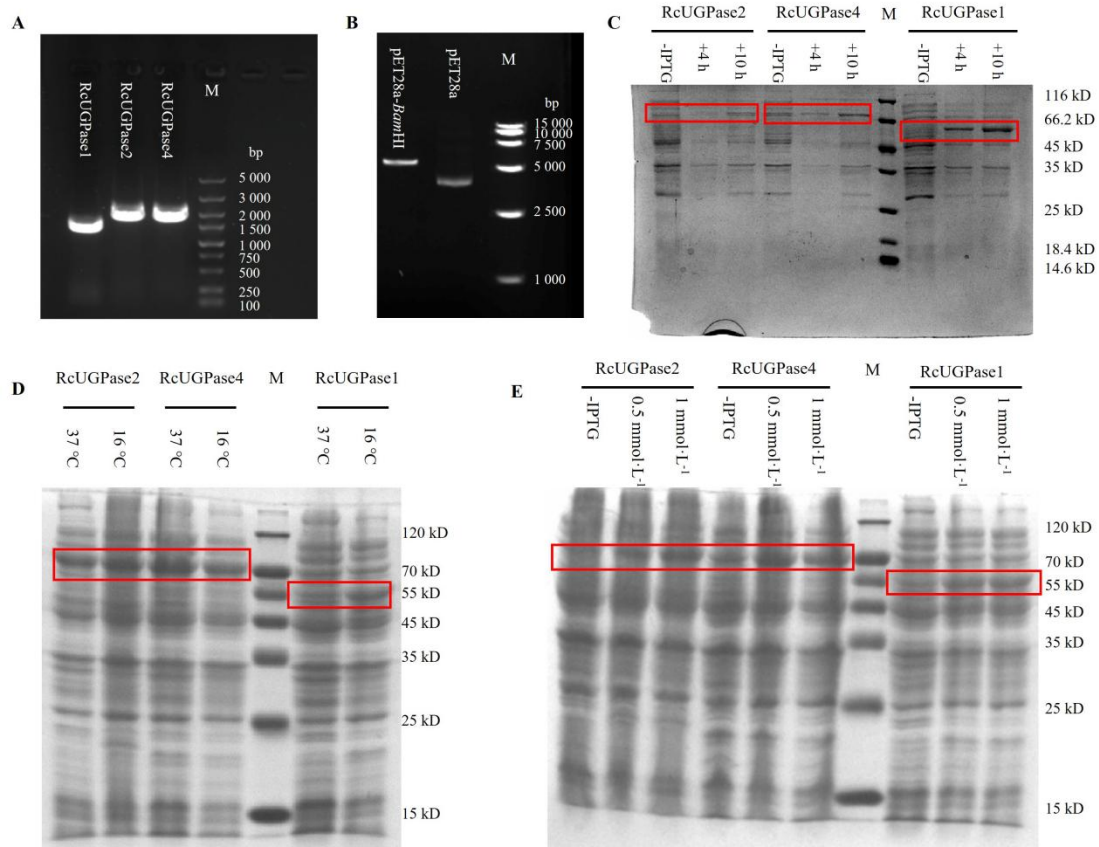


图2 MEME 预测的 UGPase 蛋白基序

Fig. 2 Motifs of UGPase protein predicted by MEME

2.4 盐肤木 UGPase 蛋白原核表达载体的构建与原核诱导表达

为具体验证盐肤木 UGPase 蛋白是否具有 UGPase 酶活性，在上述生物信息学分析的基础上，构建 pET28a 重组表达载体进行原核诱导表达。以盐肤木叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，获得了 *RcUGPase1*、*RcUGPase2* 和 *RcUGPase4* 这 3 个目的基因片段，大小符合预期（图 3: A），而 *RcUGPase3* 未能扩展成功，然后与经 *Bam*HI 酶线性化的 pET28a 载体（图 3: B）进行 in-fusion 重组，测序获得正确的重组载体。然后将 3 个 *RcUGPase* 蛋白的 pET28a 重组载体转化大肠杆菌 BL21（DE3）菌株，并进行原核诱导表达。通过对 IPTG 浓度、诱导温度及时间进行筛选发现，在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度 IPTG、 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 诱导 10 h 条件下成功诱导表达 *RcUGPase1*、*RcUGPase2* 和 *RcUGPase4* 这 3 个重组蛋白（图 3: C-E）。为了进一步分析重组 *RcUGPase* 蛋白是否具有体外 UGPase 酶活性，利用镍柱对诱导的蛋白进行了纯化，并利用光谱法对 3 个重组蛋白 *RcUGPase* 的体外催化酶活性进行了定量分析。结果显示，*RcUGPase1* 重组蛋白的比酶活为 $4.583 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，其他重组蛋白未检测到酶活性。



A. 扩增的目的基因片段； B. pET28a 载体经 *Bam*HI 酶切； C. 诱导时间； D. IPTG 浓度； E. 诱导温度； M. 蛋白质分子量标准。
 A. Amplified target gene fragment; B. pET28a vector digested by *Bam*HI; C. Induction time; D. IPTG concentration; E. Induction temperature; M. Protein marker.

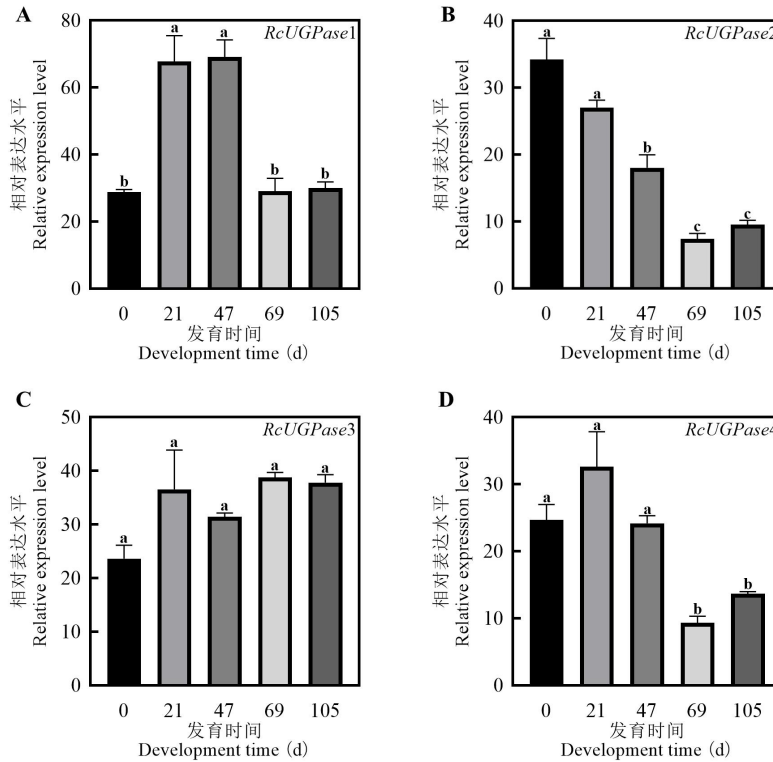
图 3 RcUGPase 蛋白的原核诱导表达

Fig. 3 Prokaryotic expression of RcUGPase proteins

2.5 盐肤木 *UGPase* 家族基因的表达模式分析

为了进一步探究 *RcUGPase* 基因表达量与没食子单宁合成积累的关联性,对课题组前期研究的五倍子不同发育时期 (0、21、47、69、105 d) 转录组数据进行了分析。结果显示, *RcUGPase1* 在五倍子形成的第 21 天和 47 天表达量显著上调,69 d 后回复到正常水平(图 4: A); *RcUGPase2* 的表达随着五倍子的发育整体呈现下降趋势(图 4: B); *RcUGPase3* 的表达变化不显著(图 4: C); 而 *RcUGPase4* 在五倍子发育初期表达变化不显著,69 d 后显著下调(图 4: D)。五倍子发育不同时期 *RcUGPase* 家族基因表达量变化的差异性表明其在五倍子发育过程中具有不同的功能。

此外,前人研究发现在五倍子发育早期,单宁含量急剧增加并达到平台期(Chen et al., 2018),而我们的定量结果显示 *RcUGPase1* 的表达在这一时期显著提高。因此,我们利用植物尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶活性光谱法定量检测试剂盒检测了五倍子发育早期(0、21、47 d)粗蛋白的 *UGPase* 酶活性变化。结果显示,与五倍子形成第 0 天相比,五倍子发育第 21 天和 47 天时五倍子粗蛋白提取物的 *RcUGPase* 酶活性显著提高(图 5)。这表明在五倍子发育初期, *UGPase* 酶活性会显著提高,为下游的没食子单宁酸的生物合成提供底物。

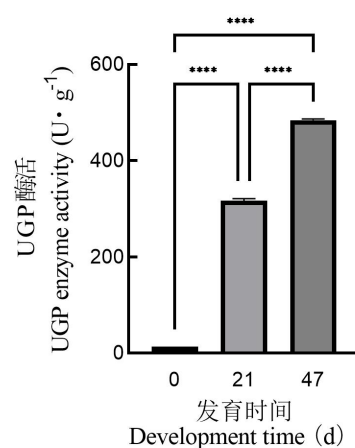


RcUGPase 家族基因在五倍子形成第 0 天、21 天、47 天、69 天和 105 天的 FKPM 值变化情况；误差线代表标准差 ($n=3$)；相同字母表示没有显著性差异，不同字母表示不同发育时间之间具有显著性差异（沃勒-邓肯检测， $P<0.05$ ）。

The FKPM values of *RcUGPase* family genes in Chinese gallnut at 0, 21, 47, 69 and 105 d after formation; error lines represent standard deviations ($n=3$); the same letter indicates no significant difference, and different letters indicate significant differences (Woller-Duncan test, $P<0.05$).

图 4 *RcUGPase* 家族基因在五倍子不同发育时期的表达水平

Fig. 4 Expression levels of *RcUGPase* family genes in different developmental stages of Chinese gallnut



****表示差异极其显著($P<0.001$)。

**** indicates difference is extremely significant ($P<0.001$).

图 5 五倍子发育早期 3 个时期粗蛋白中 UGPase 活性分析

Fig. 5 Analysis of UGPase activities in crude proteins during the early three stages of gallnut development

2.6 *RcUGPase1* 启动子序列的克隆与顺式作用元件分析

为进一步探究 *RcUGPase* 在盐肤木没食子单宁的合成中是如何被上游调控网络调控的，首先利用染色体步移（genome-walking）技术克隆其启动子序列。考虑到蛋白序列同源进化比对显示 *RcUGPase1* 属于 UGPase-A 类；其表达在五倍子发育早期显著上调，与没食子单宁的积累以及体内总 UGPase 酶活性呈正相关且原核表达的重组蛋白具有体外催化活性，我们重点关注了 *RcUGPase1* 蛋白，克隆获得了 *RcUGPase1* 基因 ATG 上游 2 334 bp 的启动子序列。利用 PlantCARE 启动子预测网站对 *RcUGPase1* 启动子的顺式作用元件进行预测分析显示，该启动子片段具有多个增强转录效率的 CAAT-box 及作为转录起始位点的 TATA-box 等真核生物核心启动子元件（表 2）。除此之外，*RcUGPase1* 的启动子还含有大量响应非生物胁迫的顺式作用元件（表 2），例如，光响应元件（Box 4、G-Box、GATA-motif 等），抗氧化响应元件（ARE），干旱响应元件（MBS），抗氧化响应元件（ARE）以及激素响应元件如脱落酸响应元件（ABRE），茉莉酸/茉莉酸甲酯响应元件（CGTCA-motif、TCACG-motif、MYC），赤霉素响应元件（P-box），水杨酸响应元件（TCA-element），乙烯响应元件（ERE）等，以及一些其他胁迫响应元件（STRE、TC-rich repeats）与分生组织特异性元件（CAT-box）。推测该基因的表达可能受到以上途径的调控。

表 2 *RcUGPase1* 启动子的顺式作用元件预测

Table 2 *Cis-acting element prediction of the RcUGPase1 promoter*

元件名称 Name of element	核心序列 Core sequence	元件功能 Function of element
ABRE	ACGTG	脱落酸响应元件 Abscisic acid responsive element
ARE	AAACCA	抗氧化响应元件 Antioxidant responsive element
Box 4	ATTAAT	光响应元件 Light responsive
CAAT-box	CAAT	增强转录 Enhance transcription
CAT-box	GCCACT	分生组织特异性元件 Meristem specific element
CCAAT-box	CAACGG	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件 Methyl jasmonate responsive element
ERE	ATTTTAAA	乙烯响应元件 Ethylene responsive element
G-Box	CACGTT	光响应元件 Light responsive
GATA-motif	AAGATAAGATT	光响应元件 Light responsive
Gap-box	CAAATGAA(A/G)A	光响应元件 Light responsive
I-box	GTATAAGGCC	光响应元件

MBS	CAACTG	Light responsive 干旱诱导的 MYB 结合位点 Drought-induced MYB binding site
MYB	CAACCA	MYB 结合位点 MYB binding site
MYB recognition site	CCGTTG	MYB 识别位点 MYB binding site
MYC	CAXXTG(X=A/T/C/G)	茉莉酸响应元件 Jasmonic acid responsive element
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件 Gibberellin responsive element
STRE	AGGGG	应激反应响应元件 Stress response responsive element
TATA-box	TATA/TATTTAAA/ATATAT	转录起始位点 Transcriptional start site
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	防卫与胁迫响应元件 Defense and stress responsive element
TCA-element	CCATCTTTTT	水杨酸响应元件 Salicylic acid responsive element
TCT-motif	TCTTAC	光响应元件 Light responsive
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应元件 Methyl jasmonate responsive element
chs-Unit 1 ml	ACCTAACCCGG	光响应元件 Light responsive element

3 讨论与结论

中国传统中药材五倍子富含植物水解单宁，使其具有重要的药用价值和工业价值。在倍蚜虫取食之前的盐肤木叶片中，没食子单宁含量仅占干重的 5%，而随着蚜虫刺激下五倍子逐渐发育，没食子单宁含量逐渐上升，最高可达干重的 70% (Chen et al., 2018)。在植物没食子单宁生物合成过程中，UDP-葡萄糖是重要的合成底物，其合成和积累是后续没食子单宁生物合成反应进行的基础。因此，深入挖掘盐肤木中催化 UDP-葡萄糖合成的关键 UGPase 酶并解析其表达调控机制对于进一步阐明五倍子中没食子单宁的高含量积累机制具有重要意义。本研究对盐肤木三代转录组数据进行筛选得到 4 个 *RcUGPase* 候选基因，通过构建蛋白系统进化树、原核诱导表达纯化及体外酶活分析、基因表达模式分析等对 *RcUGPase* 基因的功能进行解析；通过克隆 *RcUGPase1* 基因的启动子序列并对其顺式作用元件进行预测分析，初步揭示了 *RcUGPase1* 基因的候选上游表达调控因子，为进一步阐明五倍子中没食子单宁的合成调控机制奠定了基础。

植物中糖基化是一种常见的修饰方式，广泛参与植物次生代谢物的生物合成与修饰，而 UDP-葡萄糖是植物糖基化中最为常见糖供体之一 (Wang et al., 2019)。研究发现在没食子单宁合成过程中，UDP-葡萄糖作为糖基供体，与没食子酸共同参与没食子单宁合成的关键第一步糖基转移反应，生成 β -葡萄糖倍苷 (Grundhöfer et al., 2001)。因此，催化 UDP-葡萄糖合成的

酶会间接影响没食子单宁的合成和积累。本研究发现,在五倍子发育早期,组织粗酶液中UGPase 酶的活性显著上升,这与以往报道的该阶段没食子单宁的积累趋势(Chen et al., 2018)是一致的,表明该酶与这一时期单宁的快速积累高度相关。进一步对该家族基因的表达量进行分析发现,仅 *RcUGPase1* 的表达在五倍子发育第 21 和 47 天显著高于第 0 天,而其余家族基因表达下调或者变化不显著,表明该基因可能是组织粗酶液中该酶活性上升的主要因素。而体外酶活实验表明 *RcUGPase1* 蛋白具有体外催化合成 UDP-葡萄糖的活性进一步印证了这一结论。这些研究结果表明 *RcUGPase1* 蛋白很可能参与了盐肤木没食子酸单宁合成与积累的过程。

本研究对 *RcUGPase1* 基因启动子进行了克隆与顺式作用元件预测分析,发现了包括茉莉酸、脱落酸等在内的植物激素响应元件。梅丽丽等(2018)对兴安落叶松中 *UGPase* 酶基因启动子进行克隆与分析,也发现了其具有茉莉酸等植物激素响应元件。利用 GUS 报告基因在拟南芥中融合表达该启动子后分析发现,其表达活性受到外源茉莉酸甲酯、赤霉素及低温处理的诱导(梅丽丽等, 2018)。而植物激素茉莉酸是已知的植物应答昆虫胁迫的重要植物激素(Wang et al., 2021)。以往的研究表明,植物在面对昆虫胁迫时会激活茉莉酸通路,并诱导合成一些次生代谢物抵御昆虫伤害(张乐欢等, 2024)。鉴于五倍子是由五倍子蚜虫取食盐肤木时刺激植物组织异常增殖形成的(梁正等, 2022),推测盐肤木中 *RcUGPase1* 基因可能也响应植物激素茉莉酸信号,从而参与调控五倍子中单宁酸的合成和积累。

本研究对盐肤木中 *RcUGPase* 家族基因进行了克隆与功能分析,综合系统进化、体外酶活、表达模式、启动子预测等分析结果, *RcUGPase1* 基因可能对五倍子中没食子单宁高含量积累起到重要作用。但由于目前缺乏合适的盐肤木转基因技术体系,本研究未能在盐肤木中进行候选基因的功能验证。在之后的研究中,可以通过发根农杆菌介导的毛状根转化体系或者原生质体瞬时转化体系进行酶基因的功能验证。

致谢:感谢五峰土家族自治县林业科学研究所桑子阳博士和五峰赤诚生物科技股份有限公司严高红在盐肤木取样中提供的帮助。

参考文献:

- ABE T, NIYAMA H, SASAHARA T, 2002. Cloning of cDNA for UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 105(2/3): 216-221.
- CHEN H, LIU J, CUI K, et al., 2018. Molecular mechanisms of tannin accumulation in *Rhus* galls and genes involved in plant-insect interactions [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 8(1): 9841.
- CHEN J, WANG L, LIANG H, et al., 2020. Overexpression of *DoUGP* enhanced biomass and stress tolerance by promoting Polysaccharide Accumulation in *Dendrobium officinale* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 11: 533767.
- GAO JY, GONG LM, LIU PA, et al., 2015. Research progress in *Rhus* [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 21(8): 215-218. [高洁莹, 龚力民, 刘平安, 等,

2015. 盐肤木属植物研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 21(8): 215-218.]
- GRUNDHÖFER P, NIEMETZ R, SCHILLING G, et al., 2001. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins [J]. *Phytochemistry*, 57(6): 915-927.
- JI YY, WU QL, JIANG QE, et al., 2021. Cloning and expression of *UGPase* gene and its role in polysaccharide synthesis of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 52(12): 3671-3678. [嵇元焯, 吴秋丽, 江晴儿, 等, 2021. 金线莲 *UGPase* 基因克隆与表达及在多糖合成中的作用 [J]. *中草药*, 52(12): 3671-3678.]
- KATSUBE T, KAZUTA Y, MORI H, et al., 1990. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing [J]. *Journal of Biochemistry*, 108(2): 321-326.
- KLAUS E, PER V, ANDRZEJ K, et al., 1996. Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues [J]. *Gene*, 170(2): 227-232.
- LESZEK AK, SABINE K, MALGORZATA W, 2010. Mechanisms of UDP-glucose synthesis in plants [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(4): 191-203.
- LI J, GUO QQ, SUN HF, et al., 2016. Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of *CpUGPase* gene in *Codonopsis Radix* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 47(21): 3876-3883. [李晶, 郭琼琼, 孙海峰, 等, 2016. 党参 *CpUGPase* 基因的克隆、序列分析与原核表达 [J]. *中草药*, 47(21): 3876-3883.]
- LIANG Z, XU Q, ZHANG Q, et al., 2022. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Galla chinensis* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 53(18): 5908-5919. [梁正, 徐强, 张倩, 等, 2022. 五倍子化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 53(18): 5908-5919.]
- MENG M, WILCZYNSKA M, KLECZKOWSKI LA, 2008. Molecular and kinetic characterization of two UDP-glucose pyrophosphorylases, products of distinct genes, from *Arabidopsis* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784(6): 967-972.
- MEI LL, 2018. Cloning and functional analysis of UDP pyrophosphorylase gene promoter from *Larix gmelinii* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University: 23-26. [梅丽丽, 2018. 兴安落叶松 UDP 焦磷酸化酶基因启动子的克隆及功能分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学: 23-26.]
- MEI LL, GUO X, ZHANG Y, et al., 2018. Cloning of promoter sequence of UDP pyrophosphorylase gene from *Larix gmelinii* and construction of binary vector [J]. *Molecular Plant Breeding*, 16(22): 7336-7342. [梅丽丽, 郭鑫, 张尧, 等, 2018. 兴安落叶松 UDP 焦磷酸化酶基因启动子的克隆及双元载体的构建 [J]. *分子植物育种*, 16(22): 7336-7342.]
- WANG Q, ZHANG X, LI F, et al., 2011. Identification of a UDP-glucose pyrophosphorylase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involved in cellulose biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Reports*, 30(7): 1303-1312.
- WANG S, ALSEEKH S, FERNIE AR, et al., 2019. The structure and function of major plant

- metabolite modifications [J]. *Molecular Plant*, 12(7): 899-919.
- WANG WM, HU JY, LIU WS, et al., 2022. Characteristics of manganese accumulation and physiological response of *Rhus chinensis* under manganese stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 42(4): 628-636. [王悟敏, 胡佳瑶, 刘文胜, 等, 2022. 锰胁迫下盐肤木锰富集及生理响应特征 [J]. *西北植物学报*, 42(4): 628-636.]
- WANG Y, MOSTAFA, S, ZENG W, et al., 2021. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16): 8568.
- WU X, XU ZW, XIE LH, et al., 2019. Study on the chemical constituents and antioxidative activities of *Rhus chinensis* Mill. roots [J]. *Medical Research*, 38(1): 1-7. [吴献, 徐章文, 谢丽欢, 等, 2019. 盐肤木根的化学成分及抗氧化活性研究 [J]. *药学研究*, 38(1): 1-7.]
- YE SH, LIU JY, YANG WB, et al., 2022. Identification of *SMS1*, a UGPase protein gene that regulates programmed cell death, cell wall formation and pollen development in rice [J]. *Cereal Research Communications*, 50: 211-218.
- YONEKURA SK, 2009. Functional genomics of family 1 glycosyltransferases in *Arabidopsis* [J]. *Plant Biotechnology*, 26(3): 267-274.
- YU DJ, WU ZY, CUI HB, et al., 1980. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M]. Beijing: Science Press: 100. [俞德浚, 吴征镒, 崔鸿宾, 等, 1980. *中国植物志* [M]. 北京: 科学出版社: 100.]
- ZHANG LH, ZOU CY, ZHU TX, et al., 2024. The role of jasmonic acid in stress resistance of plants: a review [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 40(1): 15-34. [张乐欢, 邹昌玉, 朱天翔, 等, 2024. 茉莉酸在植物抗逆性中的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 40(1): 15-34.]
- ZHANG LL, 2020. Development status of Chinese gallnut industry in China [J]. *Biomass Chemical Engineering*, 54(6): 1-5. [张亮亮, 2020. 五倍子资源加工利用产业发展现状 [J]. *生物质化学工程*, 54(6): 1-5.]
- ZHANG WQ, 2024. An overview of UDP-Glucose pyrophosphorylase in plants [J]. *Tropical Plant Biology*, 18(1): 1-10.
- ZHAO M, LAI D, JIA X, et al., 2025. UDP-glycosyltransferases engineering coupled with UDPG regeneration facilitate the efficient conversion of mogrosin V [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(9): 5341-5352.