

doi:103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 01. 028

# UGT75B1、UGT71B6、UGT71C5 酶活性及酶反应动力学分析

岑咏一, 刘震, 李旭锋, 杨毅

(四川大学生命科学学院与生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

**摘要:** 运用 PCR 扩增获得了属于尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(UGT)家族 UGT75B1、UGT71B6、UGT71C5 的 cDNA 序列, 构建了三种基因的 GST 融合表达载体, 使用大肠杆菌对三种基因进行原核表达, 从裂解液上清中获得具有活性的目的蛋白. 分别以 ABA、对氨基苯甲酸作为反应底物, 通过高效液相色谱法, 测定三种蛋白的酶活力. 结果发现除了 UGT75B1 对对氨基苯甲酸表现出很高的活性以外, 另外两种蛋白仅表现出了低水平的活性. 三种蛋白对 ABA 都表现出了活性, UGT71B6 具有最高的酶活力. 对 UGT75B1、UGT71B6、UGT71C5 三种蛋白对 ABA 的作用进行了体外酶反应动力学分析, 测定出它们的  $K_m$  值分别为: 0.73、0.43 和 0.45mM. 以上结果说明 UGT75B1 对对氨基苯甲酸的活性明显高于 ABA, 对氨基苯甲酸是其专一底物. UGT71B6 和 UGT71C5 对 ABA 都有较高的活性, 两者  $K_m$  值差距不大.

**关键词:** 高效液相色谱(HPLC); 拟南芥; 尿苷二磷酸糖基转移酶(UGT); 糖基转移酶(GT)  
**中图分类号:** Q55      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0169-06

## HPLC determination of activity of UGT75B1、UGT71B6、UGT71C5 and the kinetic analysis

CEN Yong-Yi, LIU Zheng, XIA Li-Fen, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-Environment of Ministry of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** The cDNA sequences of UGT75B1, UGT71B6, UGT71C5 were cloned by PCR method and then were constructed into glutathione S-transferase gene fusion vector PGEX-6P-1. All of the plasmids were transformed into E. coli strain BL21 individually for recombinant protein expression. Recombinant UGTs were purified from supernatant of cell lysates. To investigate the activity of recombinant UGTs, HPLC was employed to determine their activity to catalyze ABA and p-aminobenzoic acid. The results showed that only UGT75B1 presented strong p-aminobenzoic acid acylglucosyltransferase activity and the others had lower activity. All of the recombinant UGTs had ABA-GE activity. However, UGT71B6 performed highest activity. Analysis of Michaelis-Menten kinetics of UGT75B1, UGT71B6 and UGT71C5 indicated that their  $K_m$  was 0.73, 0.43 and 0.45 mM, respectively. In conclusion, our investigations demonstrate that UGT75B1 has higher p-aminobenzoic acid acylglucosyltransferase activity

收稿日期: 2014-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(31171586)

作者简介: 岑咏一(1987-), 男, 四川成都人, 硕士, 研究方向为植物遗传和分子生物学. E-mail: 307594214@qq.com

通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@vip.sina.com

than ABA-GE activity. It seems that p-aminobenzoic acid is the specific substrate of UGT75B1. In comparison, UGT71B6 and UGT71C5 with similar  $K_m$  perform higher ABA-GE activity.

**Key words:** High performance liquid chromatography (HPLC); *Arabidopsis thaliana*; UDP glycosyltransferase (UGT); Glycosyltransferase(GT)

## 1 引言

糖基转移酶(GT)的功能是催化糖基从供体物质转化到受体物质上,其作用目标非常广泛.作为一个巨大的多源基因家族,它的分类是根据它的氨基酸序列相似性、催化底物的特异性以及保守序列的存在与否确定的<sup>[1]</sup>.迄今为止已经确定了94个不同的糖基转移酶家族的存在.这些糖基转移酶成员之间的一级结构相似性很低,但是它们的二级结构和三级结构却惊人的相似<sup>[2]</sup>.其中GT1家族的大部分成员能够将活性的尿苷二磷酸葡萄糖的糖基部分转移到受体分子上,从而调节这些受体分子的生物活性,可溶性,以及在细胞以及组织之间的通透性,因此将GT1单独归类为尿苷二磷酸糖基转移酶(UGT)超家族<sup>[3]</sup>.迄今为止,已经在模式植物拟南芥中发现了超过100种属于这个超家族的基因,根据保守氨基酸序列,这些在拟南芥中的基因被划分成了14个不同的组<sup>[4]</sup>.在对UGTs功能的研究当中,发现UGTs能以植物激素作为糖基受体,以UDP葡萄糖作为糖基供体,从而调节激素的活性,贮存及其运输<sup>[5]</sup>.因此,研究UGTs对植物激素的作用对于揭示植物对自身生长发育的调控具有重要意义.

而在前人的研究中,共有8种对ABA有糖基化作用的UDP糖基转移酶被鉴定了出来.其中UGT75B1和UGT84B1具有较高的活性,而只有UGT71B6能够识别天然结构的ABA<sup>[6]</sup>.然而UGT71B6的表型实验却没有得到预期的结果,转基因植株只出现了很轻的脱落酸缺陷型相关表型.对转基因植株的ABA和产物的分析表明,ABA-GE在转基因植物中大量累积,而ABA的水平却没有发生较大变化,因此可能存在其他UGT基因对UGT71B6基因的作用进行补偿<sup>[7]</sup>.UGT71C5很有可能就参与了这一过程,而UGT75B1虽然之前有文献报道了它对对氨基苯甲酸有较高的活性<sup>[8]</sup>,作为一种多功能酶,不排除该酶对ABA调控同样起着重要的作用.

在本实验室之前的研究中,严金平等通过酵母双杂交的方式筛选与谷氨酰tRNA合成酶相互

作用蛋白质,发现UDP糖基转移酶可能参与了植物逆境应答<sup>[9,10]</sup>,刘震等的后续研究中证实了UGT71C5具有催化ABA糖基化生成ABA-GE的能力<sup>[11]</sup>.本文在前期研究的基础上,对可能参与ABA糖基化反应的三种UGT基因进行了体外酶活测定,并对三种蛋白对ABA的活性进行了体外酶动力学分析以进行分析比较,取得了一系列重要的发现,为进一步揭示UGT基因对ABA的作用方式奠定了基础.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)RLD生态型,由本实验室保存;大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和BL21由本实验室保存;PGEX-6P-1表达载体由本实验室保存;各种限制性内切酶和Prime STAR高保真DNA聚合酶均购自Takara公司;高效连接酶V2购自TOYOBO公司;Taq DNA聚合酶与琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒均购自Transgen公司;引物合成、载体测序委托华大基因进行;BCA试剂盒;ABA及对氨基苯甲酸购自Sigma公司;其他常规试剂订购于长征化工有限公司.

### 2.2 方法

2.2.1 载体构建及重组蛋白的原核表达 根据目的基因的序列特性,使用引物设计软件Primer Premier 5.0设计基因特异性引物,引物序列见表1,以拟南芥cDNA为模板扩增即可获得目的基因片段.然后按照表1中的对应的酶对片段和PGEX-6P-1载体进行酶切连接,然后转化至DH5 $\alpha$ 中,通过菌落PCR鉴定阳性克隆,然后送至华大基因进行测序.

将构建成功的载体从DH5 $\alpha$ 中提取出来,转化至表达菌株BL21中,通过菌落PCR鉴定阳性克隆后,将表达菌进行扩大培养,当 $A_{600nm}$ 达到0.6~1.0时,使用1mM的IPTG,在20 $^{\circ}$ C的温度下诱导24h.破碎裂解菌体后,使用GST填料柱对粗蛋白进行纯化,纯化出来的蛋白使用SDS-PAGE来进行检测<sup>[12]</sup>,并使用BCA试剂盒对蛋白浓度进行测定.之后通过BandScan5.0软件分析了各组蛋白纯度,以校正浓度测定结果.

表 1 扩增目的基因的引物

Tab. 1 Primers for coding target gene

引物名称	引物序列	限制性内切酶
UGT75B1 上游	5'-CGGAATTCATGGCGCCACCGCATTTTCTA- 3'	<i>EcoR</i> I
UGT75B1 下游	5'-CCGCTCGAGTTACTTTACTTTTACCTCCTCTGC- 3'	<i>Xho</i> I
UGT71B6 上游	5'-CGGGATCCATGAAAATAGAGCTAGTATTCATTC- 3'	<i>Bam</i> H I
UGT71B6 下游	5'-CCGCTCGAGCTAGCTTTCAGTTTCCGACCAA- 3'	<i>Xho</i> I
UGT71C5 上游	5'- CGGGATCCATGAAGACAGCAGAGCTCA- 3'	<i>Bam</i> H I
UGT71C5 下游	5'- ACGCGTCGACTCAAAAGTGATCCCAAG- 3	<i>Sal</i> I

2.2.2 重组蛋白对 ABA 及对氨基苯甲酸的酶促反应样品制备 每 200 $\mu$ L 分析混合物中, 包含了 2 $\mu$ g 的重组蛋白, 50mM Tris-HCl pH = 7.0, 5mM 的 UDP 葡萄糖, 14mM 的 2-巯基乙醇, 以及 1mM 的(±)-ABA 或者 1mM 的对氨基苯甲酸, 分析混合物在 30 $^{\circ}$ C 下孵育 1h, 使用 20 $\mu$ L 240mg/mL 的三氯乙酸终止反应, 并速冻于液氮中, 在-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存<sup>[6,13]</sup>.

2.2.3 酶动力学分析反应样品制备 每 200 $\mu$ L 分析混合物中, 包含了 2 $\mu$ g 的重组蛋白, 50mM Tris-HCl, pH=7.0, 5mM 的 UDP 葡萄糖, 14mM 的 2-巯基乙醇, 并按 0.05mM、0.1mM、0.5mM、1mM、2.5mM 浓度梯度加入 ABA 配制成反应液, 每个浓度梯度分三组, 分别在 30 $^{\circ}$ C 孵育 8, 16, 24min, 使用 20 $\mu$ L 240mg/mL 的三氯乙酸终止反应, 并速冻与液氮中, 在-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存<sup>[14]</sup>.

2.2.4 高效液相色谱分析 使用的色谱柱为 Kromasil C18 反相色谱柱 (250mm  $\times$  4.6mm, 5 $\mu$ m), 在测定重组蛋白对 ABA 活性时使用水-甲醇作为流动相, 流动相中都加入了 2.5mL/L 的乙酸和 0.4ml/L 的三乙胺, 以 10%~100% 的甲醇溶液进行梯度洗脱. 根据观测到的 ABA-GE 的具有最大紫外吸收的波长, 把检测值的检测波长设为了 270nm. 流速为 1ml/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 洗脱时间 20min. 重组蛋白对对氨基苯甲酸的活性检测则使用水-乙腈作为流动相, 流动相中加入了 0.1% 的三氟乙酸, 以 10%~20% 的乙腈溶液进行梯度洗脱, 根据所观测到的对氨基苯甲酸葡萄糖酯的最大紫外吸收波长, 检测波长设为了 295nm, 流速柱温不变, 洗脱时间 10min.

## 3 结果

### 3.1 原核表达及纯化

蛋白以 GST 融合蛋白的形式表达出来, 加上

26kD 的 GST 标签, 其分子量大小分别为 78.81kD, 79.84kD, 78.65kD. 表达产物上清液纯化后的 SDS-PAGE 电泳结果见图 1. SDS-PAGE 电泳结果表明重组蛋白在 20 $^{\circ}$ C 下使用 1mM IPTG 诱导 20h, 能够在上清中得到大量的融合蛋白. 使用 BCA 法测定了各融合蛋白的浓度后, 使用 BandScan5.0 分析了各组蛋白纯度. 分析结果见图 2.

### 3.2 标准曲线的制备

配制浓度为 0.01mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.5mM, 1mM 的 ABA-GE 标准品以及对氨基苯甲酸葡萄糖酯标准品溶液, 以标准品浓度 (c, mM) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线. 得到的回归方程为:  $A(\text{ABA}) = 23.883 \times 10^6 c + 1.2146 \times 10^4$ ;  $A(\text{p-aminobenzoic acid}) = 7.181 \times 10^6 c + 6.695 \times 10^3$ , 回归方程相关系数  $R^2 > 0.99$ , 表明峰面积与浓度之间具有良好的线性相关性.

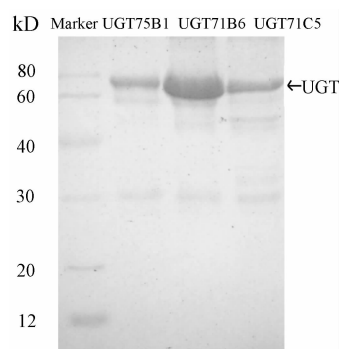


图 1 重组 UGT 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant UGTs

### 3.3 目的基因对 ABA 及对氨基苯甲酸的体外酶活分析

通过高效液相色谱, 产物和底物被成功分离开来. 分离结果见图 3, 图 3A 是 UGT 对 ABA 酶活性的高效液相色谱分析, 可以看到 ABA-GE 的出峰时间在 16min 左右, ABA 的出峰时间在 19min 左右. 图 3B 是 UGT 对对氨基苯甲酸酶活性的高效液相

色谱分析, 可以看到对氨基苯甲酸葡萄糖酯出峰时间在 5.5 min 左右, 对氨基苯甲酸出峰时间在 8min 左右. 之后对各个酶反应比活性进行计算, 结果见表 2. 三种蛋白对 ABA 都表现出了糖基化活性, 但是 UGT71B6 对 ABA 的活性比另外两种蛋白大致高出了 2 倍左右. UGT75B1 对对氨基苯甲酸表现出了很高的活性, 是对 ABA 活性的 6 倍左右, 远远超过了其对 ABA 的活性, 这证实了 UGT75B1 以对氨基苯甲酸为其专一性底物, 而对 ABA 的调控可能不起主要作用. 而 UGT71B6 和 UGT71C5 对对氨基苯甲酸的活性则很低, 其中 UGT71B6 只达到了 UGT75B1 的 1/9 左右, UGT71C5 达到了 UGT75B1 的 1/7 左右.

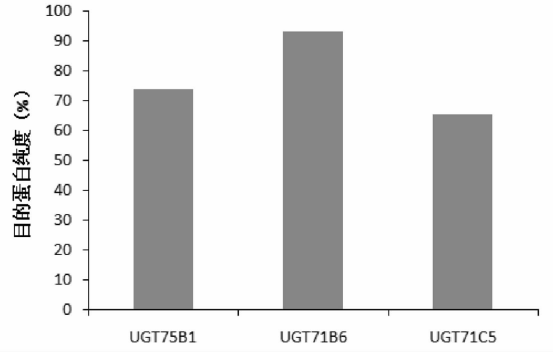


图 2 重组 UGT 蛋白的纯度分析

Fig. 2 purity analysis of the recombinant UGTs

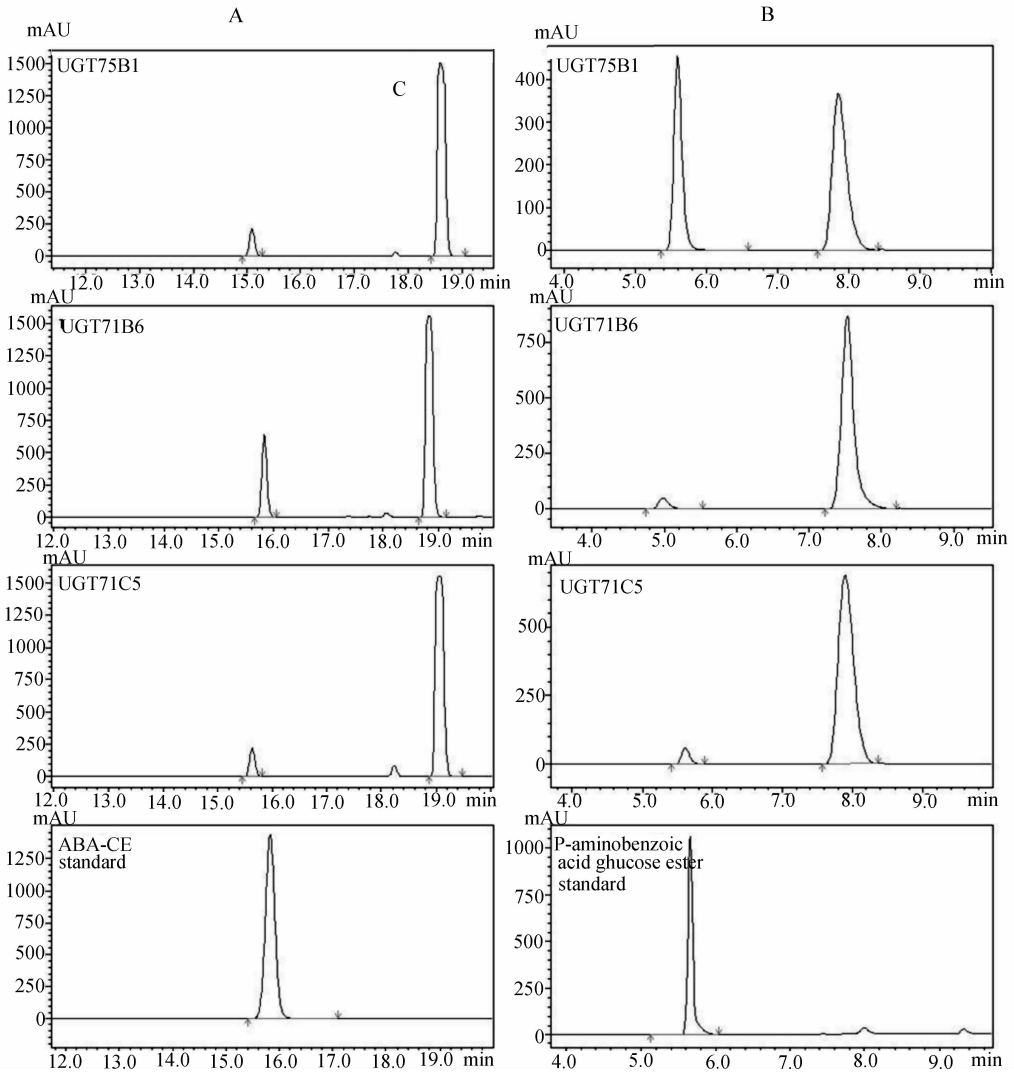


图 3 HPLC 色谱分析结果

A: 重组蛋白对 ABA 糖基化作用 B: 重组蛋白对对氨基苯甲酸糖基化作用

Fig. 3 The result of HPLC analysis

A: ABA-GE activity of recombinant protein; B: p-aminobenzoic acid acyl-glucosyltransferase activity of recombinant protein

### 3.4 对 ABA 的酶反应动力学分析

根据不同孵育时间 ABA-GE 生成量的情况绘制时间与产物生产量的直线求出在该底物浓度下的反应初速度, 再根据各组浓度与反应初速度的关系双倒数作图法求得相应蛋白的  $K_m$  值. 反应初速度测定和双倒数作图参见图 4. UGT75B1, UGT71B6 和 UGT71C5 的  $K_m$  值分别为 0.73mM,

0.43mM, 0.45mM. UGT75B1 的亲合力明显不如 UGT71B6 和 UGT71C5, 而后两者差距不大.

表 2 重组蛋白的比活性

Tab. 2 specific activity of recombinant protein

底物	比活性(nkat/mg)		
	UGT71C5	UGT75B1	UGT71B6
ABA	2.20	4.92	2.58
p-aminobenzoic acid	12.91	1.38	1.89

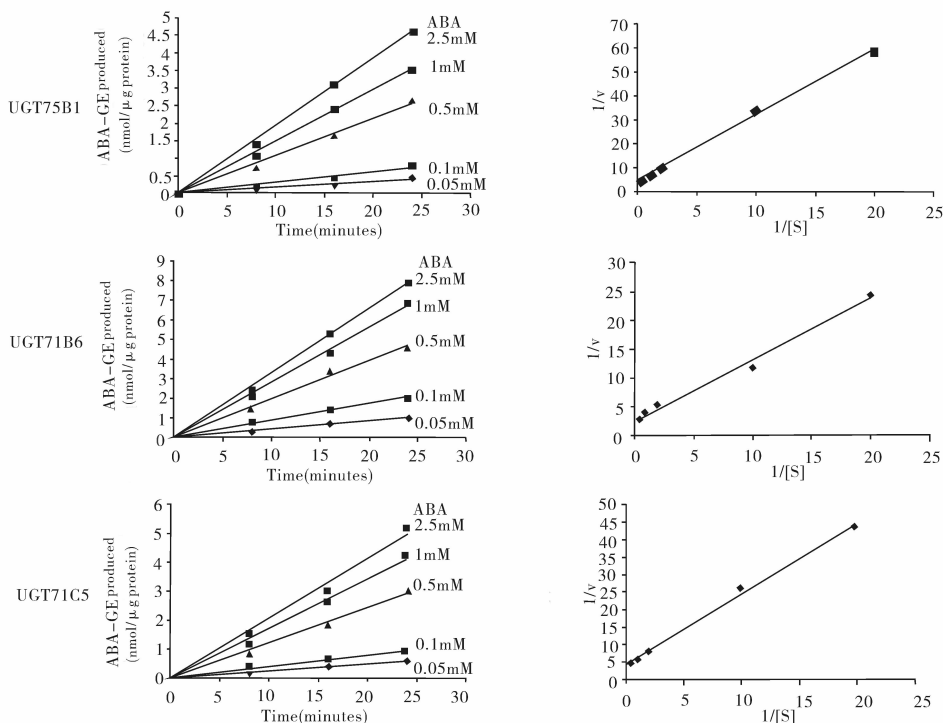


图 4 反应初速度测定以及双倒数作图

左: 反应初速度测定; 右: 双倒数作图

Fig. 4 Determination of initial velocities and Lineweaver-Burk plot

Left: Determination of initial velocities; right: Lineweaver-Burk plot

## 4 讨论

在对 UGTs 的一级结构研究中, 发现在其羧基末端具有一个由 44 个氨基酸组成的保守序列, 这部分保守序列行使的功能是与糖基供体结合. 这一段保守序列的编码序列可以在动植物、真菌细菌的基因组中发现, 是鉴定一种糖基转移酶是否属于 UGT 超家族成员的标志<sup>[15]</sup>. 而 UGTs 的氨基末端则具有高度的可变性, 通常被认为是糖基化反应的受体识别区域<sup>[8]</sup>. 现在已知的对 ABA 具有糖基化作用的蛋白共有 9 个, 对这些蛋白的序列分析发现在它们的 N 端不存在高度保守区域, 这一现象说明尽管这些蛋白在体外都能够催化 ABA 形成 ABA-GE, 但在植物体内可能会有不同的

最适底物<sup>[11]</sup>. 而 UGT75B1 被报道了对对氨基苯甲酸存在较高的活性, 但同时 ABA 的活性也较高<sup>[6,8]</sup>. 而 UGT71B6 与 UGT71C5 同属于 Group E, 该组中存在蛋白对苯甲酸衍生物存在活性反应<sup>[16]</sup>. 考虑到 UGT71B6、UGT71C5 与同组中具有苯甲酸衍生物活性的蛋白的高度同源性, 可能同样对苯甲酸衍生物起着作用, 有必要对比一下三者对对氨基苯甲酸的活性. 本研究根据基因序列设计了相应的引物, 扩增出了三种基因, 进而使用 PGEX-6P-1 构建了 GST 标签融合重组表达载体, 转入大肠杆菌表达菌株 BL21 进行原核表达, 通过优化原核表达条件以及纯化系统, 获得了有活性的重组蛋白. 由于底物与产物的最大紫外吸收波长较为接近, 直接使用紫外分光光度法存在干扰, 故使用高效液相色谱

谱进行产物分离,对酶活进行测定.通过对三种蛋白酶活进行对比研究,发现三种蛋白虽然都对 ABA 具有活性,但是 UGT71B6 对 ABA 具有较高的活性.而 UGT75B1 虽然表现出了明显的活性,但该酶对对氨基苯甲酸的活性远比对 ABA 的活性更高,这证实了 Aymerick Eudes 等人的研究,说明 UGT75B1 很可能不参与对 ABA 的调节,而与叶酸合成途径相关.之后使用双倒数作图法进行酶动力学分析,发现 UGT71B6 与 UGT71C5 对 ABA 的  $K_m$  值差别不大,证明两者在对 ABA 的亲合力上相差不大.因此,UGT71C5 与 UGT71B6 对 ABA 的糖基化具有相同的作用.

在本实验室前期的研究中,对 UGT71C5 进行了一系列表型实验,发现 UGT71C5 的过表达会使拟南芥出现 ABA 合成缺失突变体的表型特征,例如种子休眠水平降低、水分散失加快等,并且在分子水平上,影响了一些受 ABA 调控的基因 mRNA 表达水平<sup>[9]</sup>.之后又通过体外活性分析证实了 UGT71C5 对 ABA 的作用<sup>[11]</sup>.这说明 UGT71C5 可能参与了 ABA 的内稳态调节.而通过糖基化作用,可以使小分子物质的活性发生改变,并且易于贮存和运输.本实验通过对与 ABA 具有活性的 UGT 蛋白进行体外活性分析,结果发现 UGT71B6 对 ABA 的体外酶活性较高,然而酶动力学对比分析却表明 UGT71B6 和 UGT71C5 两种蛋白与 ABA 的亲合力大小却差别不大,这进一步说明了 UGT71B6 与 UGT71C5 在体内可能存在着补偿作用.而 UGT71B6 与 UGT71C5 在体内协同调节 ABA 的方式尚不明确,需要进一步的研究.

#### 参考文献:

- [1] Yonekura-Sakakibara K. Functional genomics of family 1 glycosyltransferases in Arabidopsis [J]. Plant Biotechnol, 2009, 26: 267.
- [2] Coutinho P M, Deleury E, Davies G J, *et al.* An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases [J]. Mol Biol, 2003, 328: 307.
- [3] Mackenzie P I, Owens I S, Burchell B, *et al.* The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence [J]. Pharmacogenetics, 1997, 7 (4): 255.
- [4] Li Y, Baldauf S, Lim E K, *et al.* Phylogenetic analysis of the UDP glycosyltransferase multigene family of Arabidopsis thaliana [J]. Biol Chem, 2001, 276: 4338.
- [5] Vogt T, Jones P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family [J]. Trends Plant Sci, 2000, 5: 380.
- [6] Lim E K, Doucet C J, Hou B, *et al.* Resolution of (+)-abscisic acid using an Arabidopsis glycosyltransferase [J]. Tetrahedron: Asymmetr, 2005, 16: 143.
- [7] Priest D M, Ambrose S J, Vaistij F E, *et al.* Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in Arabidopsis thaliana [J]. Plant J, 2006, 46: 492.
- [8] Eudes A, Bozzo G G, Waller J C, *et al.* Metabolism of the Folate Precursor p-Aminobenzoate in Plants: glucose ester formation and vacuolar storage [J]. Biol Chem, 2008, 283(22): 15451.
- [9] 马章焱, 祝丹丹, 严金平, 等. 拟南芥中与 At-GluRS 相互作用蛋白质的初步研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45: 100.
- [10] Yan J P, He H, Zhang J J, *et al.* Overexpression of UDP-glucosyltransferase 71C5 increases glucose tolerance in Arabidopsis thaliana [J]. Russ J Plant Physl, 2010, 57(6): 875.
- [11] 刘震. 拟南芥尿苷二磷酸糖基转移酶(UGT71C5)对脱落酸(ABA)内稳态调节的分析 [D]. 成都: 四川大学生命科学学院, 2013: 1.
- [12] Cartwright A M, Lim E K, Kleanthous C, *et al.* A Kinetic Analysis of Regiospecific Glucosylation by Two Glycosyltransferases of Arabidopsis thaliana domain swapping to introduce new activities [J]. J Biol Chem, 2008, 283(23): 15724.
- [13] Lim E K, Charlotte J D, Li Y, *et al.* The Activity of Arabidopsis Glycosyltransferases toward Salicylic Acid, 4-Hydroxybenzoic Acid, and Other Benzoates [J]. Biol Chem, 2002, 4: 586.
- [14] David M P, Rosamond G J, David A A, *et al.* The use of abscisic acid analogues to analyse the substrate selectivity of UGT71B6, a UDP - glycosyltransferase of Arabidopsis thaliana [J]. FEBS LETT, 2005, 579: 4454.
- [15] Paquette S, Moller B L, Bak S. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases [J]. Phytochemistry, 2003, 62: 399.
- [16] Sarah A O, Soren B, Birger L M, *et al.* Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling [J]. Phytochemistry, 2009, 70: 325.