



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104404065 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201410671420. 2

(22) 申请日 2014. 11. 21

(71) 申请人 中国科学院天津工业生物技术研究所

地址 300308 天津市滨海新区天津空港经济区西七道 32 号

(72) 发明人 孙媛霞 戴隆海 张江生 门燕
朱玥明

(51) Int. Cl.

C12N 15/54(2006. 01)

C12N 9/10(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12P 33/20(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

罗汉果糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种罗汉果糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 及所述基因 *UGT74AC1* 编码的糖基转移酶在合成罗汉果甜甙 I E 中的应用。糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 具有 SEQIDNO. 1 所示的核苷酸编码序列及 SEQIDNO. 2 所示的多肽序列。利用本发明的罗汉果糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 在大肠杆菌中表达, 重组的糖基转移酶 *UGT74AC1* 能催化罗汉果醇 (Mogrol) 与 UDP- 葡萄糖进行反应生成罗汉果甜甙 I E (Mogroside I E)。本发明的糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 可应用于人工合成罗汉果甜甙 I E。同时, 该基因在转基因技术改造罗汉果以提高罗汉果甜甙含量方面具有重要的应用价值。

1. 一种核苷酸序列,其特征在于所述的核苷酸序列来自下组:
 - (1) 具有如 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列;
 - (2) 与 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列不同但是编码 SEQ ID NO. 2 所示的多肽序列的核苷酸序列;
 - (3) 与序列 SEQ ID NO. 1 所示序列同源性 $\geq 85\%$ (较佳地 95%),且具有催化罗汉果醇生产甜甙 I E 活性的核苷酸序列;
 - (4) 在高严谨条件下可以与序列表 SEQ ID NO. 1 限定的序列杂交的核苷酸序列
 - (5) 与(1)(2)(3)任一所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列。
2. 一种多肽序列,其特征在于所述多肽序列选自下组:
 - (1) 具有如 SEQ ID NO. 2 所示的多肽序列;
 - (2) SEQ ID NO. 2 所示的多肽序列经过取代、缺失或者添加一个或者几个氨基酸且具有催化罗汉果醇生成甜甙 I E 活性的由(1)衍生的多肽序列;
 - (3) 多肽序列与 SEQ ID NO. 2 所示多肽序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 95%),并且具有催化罗汉果醇生成甜甙 I E 活性的由(1)衍生的多肽序列。
3. 一种重组表达载体,其特征在于该表达载体含有权利要求 2 所述的核苷酸序列。
4. 按照权利 3 所述的重组表达载体,其特征在于它是 pET21-UGT74AC1。
5. 一种基因工程化的宿主细胞,其特征在于它是转化、转导了权利 3 中所述表达载体或者基因组上整合了权利 2 所述核酸序列的宿主细胞及其后代细胞。
6. 按照权利 5 所述的宿主细胞,其特征在于所述的宿主细胞是细菌细胞、真菌细胞、动物细胞或者植物细胞及这些宿主细胞的后代。
7. 按照权利 6 所述的宿主细胞,其特征在于所述的宿主细胞是大肠杆菌细胞 Rosetta gami (DE3)。
8. 权利 1 所述的核苷酸序列、权利要求 2 所述的氨基酸残基序列和权利 3 所述的重组表达载体应用于表达糖基转移酶 *UGT74AC1*。
9. 利用权利要求 8 表达的糖基转移酶 *UGT74AC1* 进行酶反应催化罗汉果醇与 UDP- 葡萄糖反应生成罗汉果甜甙 I E。
10. 反应体系为: 50 mM Tris-HCL, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM 罗汉果醇, 1 mM UDP- 葡萄糖和 100 μ g 纯化的 *UGT74AC1* 蛋白,在 30 $^{\circ}$ C 条件下,反应 4 h。

罗汉果糖基转移酶基因 UGT74AC1 及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地是涉及一种新的糖基转移酶 *UGT74AC1* 及其在催化罗汉果醇生成罗汉果甜甙 I E 中的应用。

背景技术

[0002] 罗汉果为葫芦科藤本落叶植物罗汉果 (*Siraitia grosvenorii* Swingle) 的成熟果实,是我国所特有的珍贵药用和甜料植物,1977 年以来一直收录于中华人民共和国药典,作为常用中药使用。卫生部 and 中医药管理局将罗汉果列入第一批“既是药品又是食品的品种名单”。罗汉果味极甜、性凉、无毒,具有止咳润肺、化痰补血、润肠通便、祛瘀等功能 (Prakash, Indra, and Venkata Sai Prakash Chaturvedula. Additional New Minor Cucurbitane Glycosides from *Siraitia grosvenorii*. *Molecules* 19.3 (2014): 3669-3680.)。

[0003] 罗汉果甜甙是罗汉果中的主要活性物质,是一种高甜度、低卡路里的理想天然甜味剂,此外还具有降血糖、抗氧化、抗癌、抗病毒等作用 (Chiu, Chun-Hui, et al. Biotransformation of Mogrosides from *Siraitia grosvenorii* Swingle by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of agricultural and food chemistry* 61.29 (2013): 7127-7134.)。罗汉果甜甙是葫芦烷型四环三萜类化合物,自上世纪 70 年代以来,国内外学者对其进行了大量研究,并先后从罗汉果中分离获得了罗汉果甜甙 I E、II E、III E、IV E、V E 和赛门甙等 20 多种甜甙。这类物质除少数外,均为极甜或微甜成分,其中罗汉果甜甙 V 是罗汉果中含量最高的成分,其甜度在水中浓度为万分之一时,是 5% 蔗糖水溶液的 425 倍 (Kasai R, Nie R L, Nashi K, et al. Sweet Cucurbitane Glycosides from Fruits of *Siraitia siamensis* (chi-zi luo-han-guo), a Chinese Folk Medicine (Organic Chemistry) [J]. *Agricultural and biological chemistry*, 1989, 53(12): 3347-3349.)。罗汉果甜甙化学结构复杂,目前还不能化学合成,只能从罗汉果中提取获得。同时,由于罗汉果对生长环境要求苛刻,仅限于广西北部等少数地区生成,且果实生长周期长,甜甙含量低,果实产量受自然环境影响大,无法满足市场需求,因此亟待探索提高罗汉果甜甙的新方法。

[0004] 糖基转移酶 (Glycosyltransferase) 是生物体内广泛存在的一大类酶,它将活性的糖供体如 UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖等转移到糖受体如三萜类、黄酮类、苯丙酯类等化合物的 -COOH、-OH、-NH₂ 等基团上形成糖苷 (Das, Shibendu Sekhar, et al. Purification and characterization of a betanidin glucosyltransferase from *Amaranthus tricolor* L catalyzing non-specific biotransformation of flavonoids. *Plant Science* 211 (2013): 61-69.)。糖基化是生物体内常见的具有重要意义的生化反应之一,通过糖基化改变糖受体的稳定性、水溶性、生物活性以及在细胞内的运输及定位,另外,通过糖基化还能降低或者去除内源及外源性物质的毒性 (Richman, Alex, et al. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the

synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. The Plant Journal 41.1 (2005): 56-67.)。罗汉果甜甙共同的前体物质是罗汉果醇,其 3 号碳和 24 号碳上连接的羟基分别可以被糖基化并通过 β -1 \rightarrow 6 糖苷键生成相应的罗汉果甜甙 I E 和罗汉果甜甙 I A,或 3 号碳和 24 号碳上连接的羟基同时被糖基化生成罗汉果甜甙 II E。此外,罗汉果醇 3 号碳和 24 号碳羟基上连接的葡萄糖分子的 2 号位羟基和 6 号位羟基又都可继续被糖基化,从而生成最多含有 6 个葡萄糖基的罗汉果甜甙 VI。糖基化修饰是罗汉果甜甙生物合成途径中最后一步反应,糖基化的程度决定了罗汉果甜甙的品质。目前罗汉果甜甙糖基化修饰机理目前还是一片空白,发现并明确罗汉果甜甙糖基化修饰过程中关键糖基转移酶对罗汉果育种及通过代谢工程技术生成罗汉果甜甙具有重要的意义。

[0005] *UGT74AC1* 是罗汉果糖基转移酶家族中的一员,在之前的转录组研究中发现了包括 *UGT74AC1* 在内的可能参与罗汉果甜甙合成途径中的的大量糖基转移酶编码基因 (Tang, Qi, et al. An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis. BMC genomics 12.1 (2011): 343.),但是并不明确这些糖基转移酶是否真的与罗汉果甜甙的合成有关。现有的文献检索表明,国内外尚未有任何有关糖基转移酶 *UGT74AC1* 在催化甜甙合成的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一是提供从罗汉果转录组数据库中挖掘到的糖基转移酶基因 *UGT74AC1*, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1, 所编码的多肽序列如 SEQ ID NO:2。具体是以罗汉果果肉为原料,经液氮碾磨后,利用 Trizol 试剂提取罗汉果总 RNA,然后以提取的 RNA 为模板逆转录获得罗汉果的总 cDNA。获得总 cDNA 后,再利用特定的引物通过 PCR 扩增获得糖基转移酶 *UGT74AC1* 编码基因。

[0007] 本发明的目的之二是提供一种糖基转移酶 *UGT74AC1* 的表达与纯化方法。具体是将获得的糖基转移酶 *UGT74AC1* 通过 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切与同样经 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切处理的大肠杆菌表达质粒进行连接,重组质粒经测序验证正确后,再转化导入到大肠杆菌 Rosetta gami (DE3) 中,构建重组大肠杆菌。挑取重组大肠杆菌单菌落接种至 5 mL LB 培养基中,在 37℃、200rpm 条件下,培养过夜。按照 1% 的接种量,将种子液接种于 100 mL 培养基中,在 37℃、200rpm 条件下,培养 2-3 h。当菌体浓度 OD600 达到 0.6-0.8 时,添加终浓度为 0.1 mmol 的 IPTG,同时降低培养温度至 16℃,摇床转速降低至 150 rpm,诱导时间为 20h。然后通过离心收集菌体,经超声破碎后再次离心收集破碎液上清并按照 GE 公司提供的组氨酸标签重组蛋白纯化手册上的相关操作纯化目的蛋白 *UGT74AC1*。

[0008] 本发明的目的之三是提供一种利用糖基转移酶 *UGT74AC1* 催化罗汉果醇生成甜甙 I E 的方法。具体的是在酶反应体系中加入 50 mM Tris-HCL, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM 罗汉果醇, 1 mM UDP-葡萄糖和 100 μ g 纯化的 *UGT74AC1* 蛋白,在 30℃ 条件下反应 4 h。

[0009] 采用以上技术方案,本发明提供了一种糖基转移酶 *UGT74AC1* 及其在催化罗汉果醇生成罗汉果甜甙 I E 中的应用。实验证明,糖基转移酶 *UGT74AC1* 可在大肠杆菌中高效可溶性表达,并且可以以罗汉果醇和 UDP-葡萄糖为底物,催化生成罗汉果甜甙 I E。该基因的

发现同时也为利用基因工程菌改造罗汉果以提高罗汉果甜甙的含量提供了重要的理论基础。

附图说明

[0010] 图 1 构建的重组大肠杆菌表达载体 pET21-*UGT74AC1* 的物理图谱

图 2 表达了重组质粒 pET21-*UGT74AC1* 的大肠杆菌菌体、破碎上清、沉淀及纯化产物的 SDS-PAGE 电泳图；

图 3 为 *UGT74AC1* 反应产物的高效液相色谱(HPLC)图谱；

图 4. 糖基化产物的质谱图谱。

具体实施方式

[0011] 下面结合附图和具体实施案例对本发明的具体实施方式做详细叙述。以下实施方式仅用于说明本发明,但不用于限制本发明的使用范围。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干种变动和改进。这些都属于本发明的保护范围。以下实施案例中未注明具体实验方法,通常按照常规条件,例如 Sambrook 等的分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或者按照相关试剂制造厂商所提供的建议。

[0012] 实施例 1、糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 的克隆与原核表达载体的构建

以罗汉果果肉为原料,按照 TRIzol (Invitrogen, USA) 试剂盒上的操作步骤提取罗汉果总 RNA,然后以提取获得的总 RNA 为模板,利用 First Strand cDNA Synthesis Kit (Ferments, USA) 逆转录获得罗汉果的总 cDNA。根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库上公布的罗汉果糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 的 DNA 序列,设计一对特异性引物 UGT74AC1-F:CGCCATATGCACCACCACCACCACATG

GAGAAAGGCGATACGCATATT 和 UGT74AC1-R:CGGAATTCTCAA

GTTTGCTTGAGCATGGCCAC 扩增 *UGT74AC1* 全序列。将获得的 *UGT74AC1* 先经过 *NdeI* 和 *EcoRI* 酶切之后,与同样经 *NdeI* 和 *EcoRI* 双酶切处理的 pET21a 进行连接构建表达载体 pET21-*UGT74AC1* (附图 1)。

[0013] 实施例 2、大肠杆菌重组菌株的构建及目的蛋白的表达与分离纯化

将测序正确的表达载体 pET21-*UGT74AC1* 转化导入大肠杆菌表达菌株 Rosetta gami (DE3),转化子再经过菌落 PCR 验证重组质粒 pET21-*UGT74AC1* 已进入大肠杆菌表达菌株 Rosetta gami (DE3) 后用于重组蛋白 *UGT74AC1* 的表达。在添加了相应浓度的氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素和链霉素的 LB 培养基中接种适量大肠杆菌转化子,37℃,220 rpm 过夜培养。然后将过夜培养物按 2:100 的比例接种到新鲜的含有相应抗生素的 LB 培养基中,37℃,220 rpm 培养至菌体 OD₆₀₀ 为 0.6-0.8。然后加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mM,在 16℃,150 rpm 下培养 16-20h 诱导目的蛋白的表达。诱导完成后,6000 rpm 离心 10 min 收集菌体,然后将菌体悬浮与 Buffer A (25 mM Tris-HCl,150 mM NaCl,30 mM Imidazole, PH=7.2) 中,于 4℃ 条件下对菌体进行超高压破碎。将大肠杆菌细胞破碎液在 15000 rpm 条件下离心 60 min,收集上清并加入到预先用 Buffer A 平衡好的镍琼脂糖柱中,按照 GE 蛋白纯化手册上的操作,用 Buffer B (25 mM Tris-HCl,150 mM NaCl,250 mM Imidazole, PH=7.2) 对目的

蛋白进行梯度洗脱。目的蛋白的纯度经 SDS-PAGE 检测达到电泳纯(附图 2),可用于后续的酶活测定。

[0014] 实施例 3、*UGT74AC1* 酶活的测定

在 2 mL 的 EP 管测定 *UGT74AC1* 的酶活。反应体系为:1 mM UDP-葡萄糖,0.2 mM 罗汉果醇,100 μ g *UGT74AC1* 蛋白,50 mM Tri-HCl (PH 7.2),30℃条件下反应 4 h。然后用等体积的乙酸乙酯萃取反应产物 3 次,合成萃取产物并用氮气吹干。最后将产物溶解于色谱级甲醇中,经 0.22 μ m 的滤膜处理后用于 LC-MS 分析。

[0015] 实施例 4、酶反应产物的 LC-MS 鉴定

利用 HPLC 对酶反应产物进行分析,液相系统为 Agilent 1260 系统,色谱柱为 Welch Ultimate C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),进样量为 20 μ L,紫外检测器,检测波长为 210 nm。流动相为乙腈和水,梯度运行方法为:0-20 min,23% 乙腈;20-60 min,50% 乙腈。HPLC 结果显示(附图 3)*UGT74AC1* 能够催化罗汉果醇生成一个新的产物峰,该产物出峰时间为 36.10 min,且出峰时间与罗汉果甜甙 I E 标准品的出峰时间是一致的。当用表达了空载体 pET21 的大肠杆菌所提取的总蛋白与罗汉果醇进行反应并利用同样的液相色谱检测条件进行检测时,在 36.10 min 处没有新产物生成。

[0016] 质谱仪为 Bruker-microTOF-II, ESI 离子源,负离子模式。优化后的离子条件为:离子喷雾电压为 4500V;毛细管温度为 400℃,干燥气体为氮气,流速为 6 mL/min,干燥温度为 180℃。质谱结果显示(附图 4)*UGT74AC1* 蛋白与罗汉果醇的反应产物在 36.10 min 处的离子碎片包括(m/z , 637 $[M-H]^-$, 683 $[M-H+HCOOH]^-$ and 751 $[M-H+TFA]^-$),这与甜甙 I E 标准品的质谱结果是一致的,以上结果表明 *UGT74AC1* 能够催化罗汉果醇与 UDP-葡萄糖反应生成罗汉果甜甙 I E。

[0017] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。使用本发明中发现的罗汉果糖基转移酶基因 *UGT74AC1* 可以以罗汉果醇和 UDP-葡萄糖为底物催化生成罗汉果甜甙 I E。需要理解的是,本发明并不局限于上述所述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围做出各种变形或者修改,这并不影响本发明的实质内容。

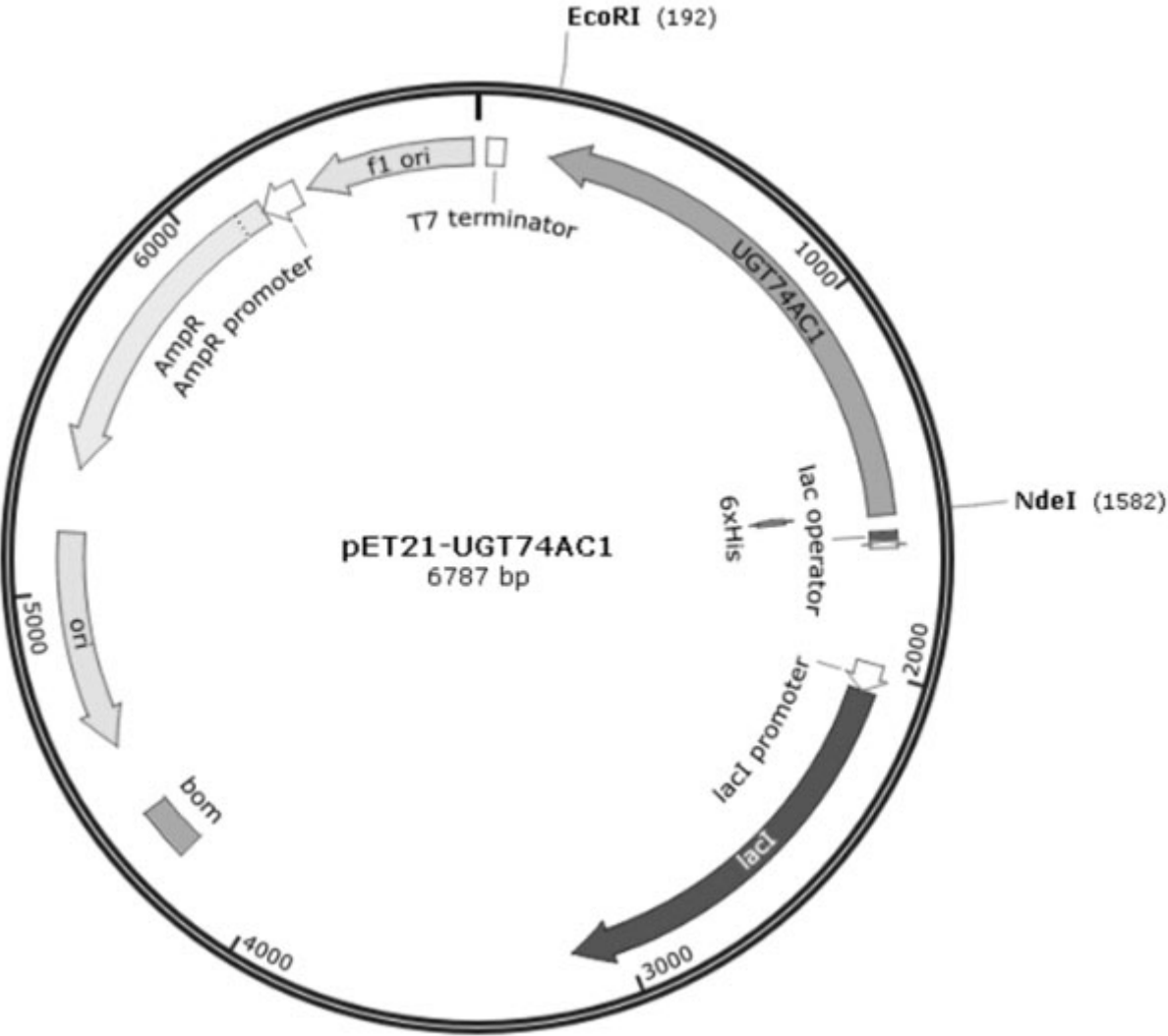


图 1

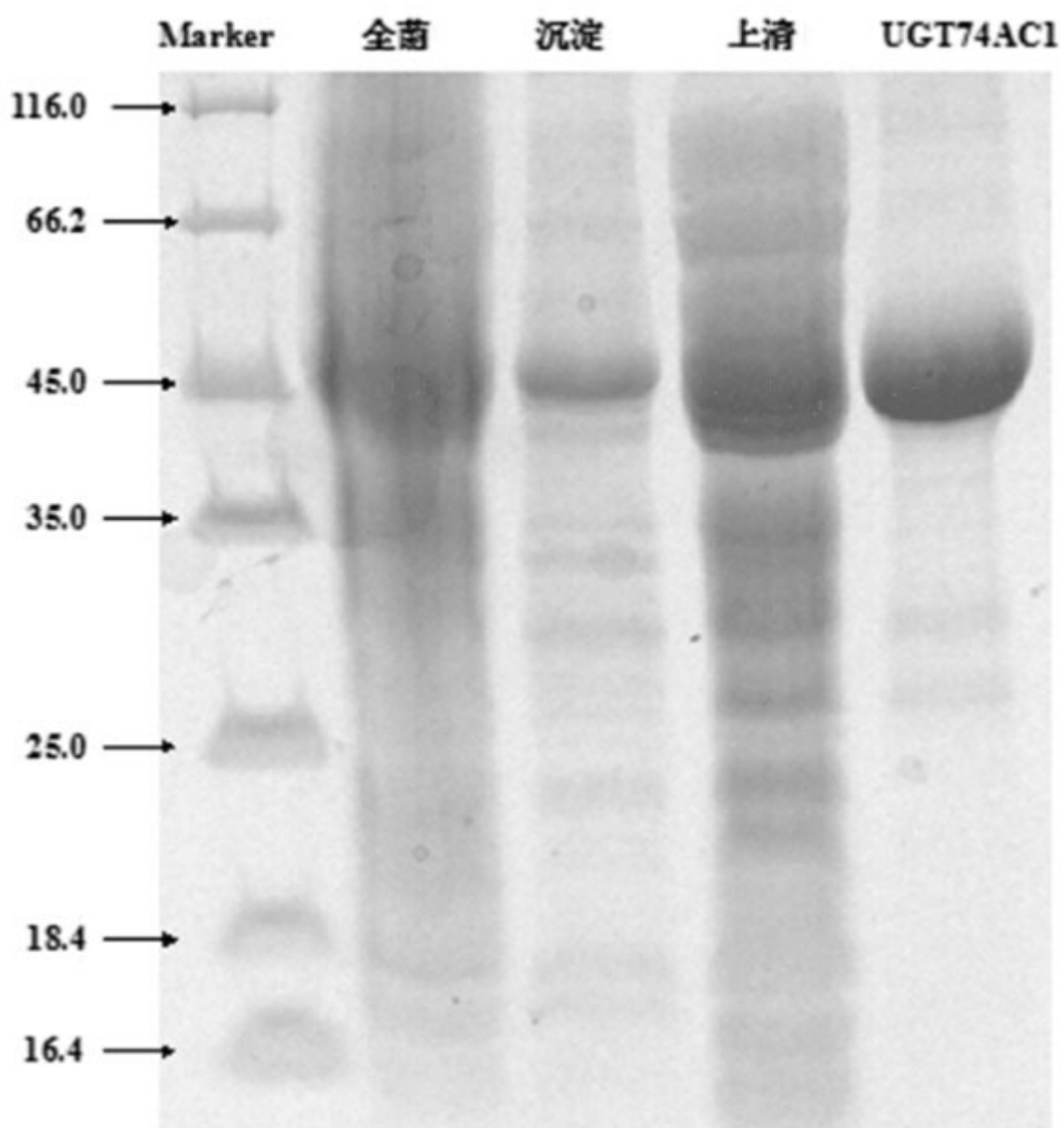


图 2

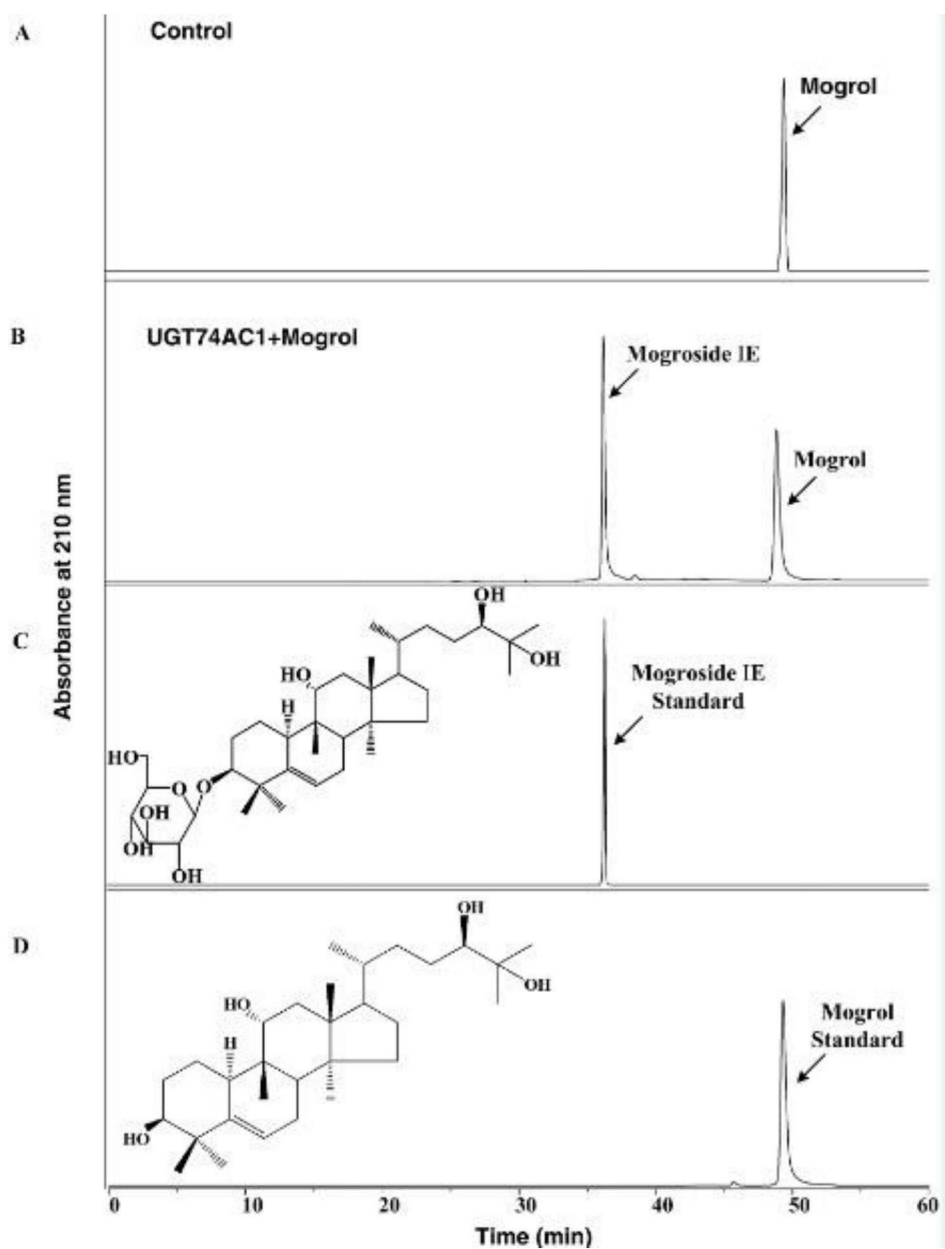


图 3

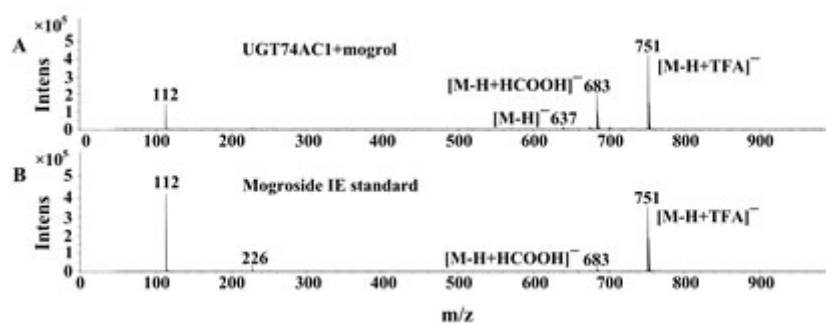


图 4