

学校编号: 10384

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

学 号: \_\_\_\_\_

UDC: \_\_\_\_\_

## 学 位 论 文

- 一、甜菊 UDPG 糖基转移酶基因的克隆和功能分析
- 二、甜菊肌动蛋白和 EF1 $\alpha$  基因的克隆、序列分析和分子进化研究

马 凌 波

指导教师姓名: 陈睦传 教授 (厦门大学生命科学学院)

申请学位级别: 博 士 学科专业名称: 动物学 (细胞生物学方向)

论文提交日期: 2002 年 10 月 论文答辩日期: 2002 年 10 月

学位授予单位和日期: 厦 门 大 学 2002 年 月 \_\_\_\_\_

答辩委员会主席: 黄维南 研究员 博导 (福建亚热带植物研究所)

评阅人: 吴乃虎 研究员 博导 (中国科学院遗传与发育研究所)

郭仲琛 研究员 博导 (中国科学院植物研究所)

黄维南 研究员 博导 (福建亚热带植物研究所)

张大兵 研究员 博导 (上海农业科学院)

许良树 教授 (厦门大学生命科学学院)

二 0 0 二 年 十 月

# Dissertation

**1. Molecular Cloning and Function Analysis of UDPG  
Glucosyltransferase Gene**

and

**2. Molecular Cloning , Sequence Analysis and evolution of Actin and  
EF1  $\alpha$  Genes in *Stevia rebaudiana***

**Ph. D Candidate:** Ma Lingbo

**Supervisor:** Professor Chen Muchuan, Xiamen University

**Major:** Zoology (Cell biology)

**Specialty:** Cell and Molecular biology

Xiamen University

Oct. 2002

## 目 录

第一部分 甜菊 UDPG 糖基转移酶基因的克隆和功能分析.....	6
摘        要.....	6
Abstract.....	8
文 献 综 述.....	10
一、甜菊生物学的研究历史.....	10
二、甜菊醇和甜菊糖苷的生物合成.....	12
三、甜菊糖苷合成途径中相关酶的研究.....	13
1. HMG-CoA 还原酶 (HMGR) .....	13
2. 黄脂二磷酸合酶 (CPS) 及内贝壳杉烯合成酶 (KS) .....	14
3. Ent-kaurenoic 13-羟化酶.....	14
4. 甜菊糖苷糖基转移酶 (Steviol-Glycoside: Glucosyltransferase) .....	15
四、甜菊糖苷合成的生物学意义.....	16
五、与植物次生代谢产物相关的糖基转移酶基因克隆的研究进展.....	17
I 序 言.....	19
II 材料和方法.....	21
一、材料.....	21
1. 植物材料.....	21
2. 载体及菌株.....	21
3. 主要试剂及酶.....	21
4. 实验中所用的溶液、缓冲液和培养基配方.....	21
5. 本实验所用仪器.....	21
二、方法.....	21
1. 甜菊叶片 cDNA 文库的构建 .....	21
2. 甜菊糖基转移酶基因片段的获得.....	24
3. 甜菊糖基转移酶基因 Gt1 和 Gt2 全长序列的获得.....	25
4. 重组蛋白的表达.....	26
5. 重组蛋白的纯化.....	27

6. 蛋白的功能分析.....	27
7. 试验中所采用的 PCR 扩增产物的回收纯化.....	27
III 结 果.....	29
1. 甜菊叶片 cDNA 文库的构建以及文库质量和库容量的鉴定.....	29
1.1 甜菊叶片总 RNA 的抽提以及 mRNA 的大量分离.....	29
1.2 cDNA 第一链和第二链的合成.....	30
1.3 cDNA 的分步收集和连接包装.....	30
1.4 原始库和扩增库容量以及库质量的鉴定.....	31
2. 甜菊糖基转移酶基因的获得和功能分析.....	31
2.1 糖基转移酶基因片段 GTASE-I 和 GTASE-II 的获得.....	31
2.2 糖基转移酶基因 Gt1 和 Gt2 的 cDNA 全长序列的获得.....	32
2.3 甜菊糖基转移酶 Gt1 及 Gt2 的分子进化关系.....	34
2.4 Gt1 蛋白的表达和纯化.....	35
2.5 Gt1 蛋白的功能分析.....	36
IV 讨 论.....	39
1. 甜菊糖基转移酶 Gt1 和 Gt2 基因克隆的方案选择.....	39
2. 甜菊 Gt1 和 Gt2 基因的序列特征.....	40
3. 甜菊 UDPG 糖基转移酶 Gt1 的特征和功能.....	41
4. 甜菊类黄酮糖基转移酶参与甜菊糖苷合成过程的假说.....	42
V 结 论.....	44
第二部分 甜菊肌动蛋白和 EF1 $\alpha$ 基因的克隆、序列分析和分子进化研究.....	45
摘 要.....	45
Abstract.....	45
I 序 言.....	47
II 材料与方 法.....	50
一、材料.....	50
二、方法.....	50
(一)、甜菊肌动蛋白和 EF1 $\alpha$ 基因的克隆.....	50
(二)、基因结构分析、序列比较及分子系统进化树的构建.....	51

III 结 果.....	53
1. 甜菊肌动蛋白基因的克隆和序列分析.....	53
2. 肌动蛋白的分子进化.....	54
3. 甜菊 EF1 $\alpha$ 基因的克隆和序列分析.....	55
4. 甜菊 EF1 $\alpha$ 基因的分子进化.....	56
IV 讨 论.....	57
V 结 论.....	59
参考文献.....	60
致 谢.....	69

厦门大学博士硕士学位论文摘要库

## 第一部分 甜菊 UDPG 糖基转移酶基因的克隆和功能分析

### 摘 要

甜菊 (*Stevia rebaudiana*) 叶片中富集了约占干重 10-30% 的甜菊糖苷。以二萜类化合物甜菊醇 (Steviol) 为糖苷非糖配基, 根据 13 位上的羟基和 19 位上的羧基上以 O-糖苷键相连的糖基种类及数量不同, 已有至少 8 种糖苷被发现。甜菊糖苷生物合成过程与赤霉素生物合成密切相关。已有研究表明赤霉素合成过程中的一些酶, 在甜菊叶片细胞内的含量及其活性都比较高, 表达方式也与其它植物有较大的差异, 这将导致赤霉素和甜菊糖苷的共同前体物质内贝壳杉烯酸的大量积累。为了避免合成过量的赤霉素, 这些前体物质被转化成为甜菊醇, 并被糖基化形成甜菊糖苷。类黄酮 UDPG 糖基转移酶很有可能在甜菊糖苷的合成过程中起了重要作用, 保证了赤霉素的代谢正常进行。为了证实这一点, 实验克隆得到了甜菊类黄酮 UDPG 糖基转移酶基因, 并对其功能进行了分析。

利用与植物次生代谢产物糖基化相关的 UDPG 糖基转移酶的特征性保守区域, 设计了同源简并引物, 以甜菊基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得甜菊糖基转移酶基因片段 GTASE-I 和 GTASE-II。基因片段包括了 UDPG 糖基转移酶基因的部分特征性序列。与其他同类 UDPG 糖基转移酶基因的氨基酸序列比较, 具有较高的相似性, 达 53% 至 70%, 约 40%-50% 氨基酸序列完全一致。表明获得的基因片段属于 UDPG 糖基转移酶。根据获得的基因片段设计引物, 分别与 cDNA 文库的 T3 和 T7 通用引物配合, 以 cDNA 文库为模板, 扩增获得甜菊糖基转移酶基因 Gt1 和 Gt2 全长的核苷酸序列。获得的甜菊糖基转移酶 Gt1 基因全长 1568 bp (Genbank<sup>TM</sup> 序列号: AF515727), 包括一个 1419bp 的开放阅读框, 编码 473 个氨基酸。Gt2 基因全长 1662bp (Genbank<sup>TM</sup> 序列号: AF548025), 包括一个 1362bp 的开放阅读框, 编码 454 个氨基酸。Gt1 和 Gt2 基因与常见的糖基转移酶基因的相似性分别达 26-46% 和 44-74%。Gt1 和 Gt2 都具有 UDPG 糖基转移酶的 44 个氨基酸的特征性保守序列, 它被认为是 UDP- glucose 的结合区域。实验对 Gt1 基因进行了原核融合表达, 获得的融合蛋白的大小约 55kDa。功能分析表明, 纯化后的 Gt1 融合蛋白以 UDPG 为糖基供体, 能以甜菊醇 (steviol) 以及花青素 (cyanidin)、飞燕草素 (delphinidin)、芍药花素 (peonidin) 和锦葵

花素 (malvidin) 等花色素为糖基受体合成甜菊糖苷和花色素苷。其中, 对花青素的催化活性最高, 对甜菊醇的活性为花青素的 33.5%。结果表明, Gt1 作为甜菊体内的类黄酮糖基转移酶, 具有广泛的底物特异性, 它不仅参与类黄酮的糖基化, 而且能够作用于甜菊醇, 形成甜菊糖苷。在大量的 GA 前体物质被合成, 使甜菊的正常代谢受到了威胁的情况下, 甜菊很有可能利用了细胞内的类黄酮糖基转移酶基因合成惰性的甜菊糖苷。

关键词: 甜菊糖苷; 糖基转移酶; 基因克隆; 功能分析

## Abstract

The pathway for steviol glycoside biosyntheses is shared with that of gibberellins. The highly activity nature and over expression of HMG-CoA reductase, CPS and KS would result in the production of a large amount of mevalonic acid, (-)-copalyl diphosphate and (-)-kaurene, the precursors of GAs and steviol in *stevia rebaudiana* leaves. To avoid the synthesis of an excess of GA, the precursor of which is also *ent*-kaurenoic acid must be converted to steviol, and then glucosylated into steviol glycosides, which accumulated in leaves at concentrations ranging from 10-30% of the leaf, dry weight.

We report here the cloning and characterization of *S. rebaudiana* UDP-glucosyltransferase. Degenerate oligonucleotide primers were designed based on identical or highly conserved amino acid sequences of known flavonoid glucosyltransferase, and used to PCR amplify stevia glucosyltransferase gene fragments GTASE-I and GTASE-II. Two fragments with strong homology to known flavonoid glucosyltransferases were used to design other two primers to amplify 5' and 3' -half cDNA of stevia glucosyltransferase Gt1 and Gt2, respectively. The full-length Gt1 gene is 1568bp in length, with an open reading frame encoding 473 amino acids (Genbank<sup>TM</sup> accession numbers AF515727). The full-length Gt2 gene is 1662bp in length, with an open reading frame encoding 454 amino acids (Genbank<sup>TM</sup> accession numbers AF548025). The predicted amino acid sequences of Gt1 and Gt2 were 26-46% and 44-74% identical to the known UDPG glucosyltransferase respectively. The deduced amino acid sequences of Gt1 and Gt2 were confirmed to have one conserved region of glucosyltransferases, which is the region for the UDPG-glucose binding domain. Plasmid was prepared from recombinant clones and transformed into the *E. coli* BL21 DE3 strain for production of recombinant Gt1. The Gt1 products of in vitro translation, which were ~55 kDa recombinant protein, had anthocyanidins and steviol glucosyltransferase activity. Incubation of the purified recombinant Gt1 with steviol and other aglycones in the presence of UDP-glucose



donor substrate resulted in the formation of the glucosides. Relative active against a range of acceptor substrates, including steviol, cyanidin, delphinidin, peonidin and malvidin, was determined by HPLC analysis. Cyanidin gave the highest rates of glucosylation. The average rate of steviol glucosylation was approximately 33.5% toward that observed for cyanidin. Comparison the activity of the recombinant UDP-glucosyltransferase Gt1 toward a range of acceptor substrates, suggests that it may participate in the synthesis of steviol glycosides. The results support the hypothesis that the flavonoid glucosyltransferases, which have broad substrate specificity, may be not only involving in flavonoid glucosylation but also playing a role to produce the water-soluble steviol-glycosides in *S. rebaudiana*.

KEYWORD: Steviol glycoside; glucosyltransferase; Gene cloning; Function analysis

## 文献综述

甜菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni), 又名甜叶菊, 为菊科(Asteraceae)斯台比亚属(*Stevia*)多年生草本植物, 是 *Stevia* 属 154 个成员中 2 个合成带甜味的甜菊糖苷 (Steviol glycosides) 的种类之一 (Soejarto et al., 1983)。在甜菊叶中富集了约占干重 10-30%的甜菊糖苷, 糖苷以二萜类化合物甜菊醇 (Steviol) 为糖苷非糖配基, 根据 13 位上的羟基和 19 位上的羧基上以 O-糖苷键相连的糖基种类及数量不同, 已发现至少 8 种糖苷(图 1) (Soejarto et al., 1983; Brandle et al. 1998), 其中以 stevioside 和 rebaudioside A 含量最高, 也最为重要。几个世纪以来, 在其原产地巴西、巴拉圭、阿根廷等国, 当地印第安居民一直将其作为一种甜味剂广为使用。由于甜菊糖苷具有高甜度、低热量、无毒性、耐高温、耐酸碱和水溶性好等优点, 现广泛应用于饮料、食品、医药及日用化工等领域, 对糖尿病、肥胖病、龋齿等多种疾病具有较好的预防及辅助治疗作用。1998 年, 一向以注重安全性而著称的美国食品与药物管理局 (FDA) 经过多年的试验论证, 正式批准甜菊糖苷在美国销售和使用。

### 一、甜菊生物学的研究历史

在甜菊的原产地巴拉圭, 甜菊叶几个世纪前就被当地的印地安人作为一种甜味剂食用。1899 年 Bertoni, M. 首次将甜菊载入科学文献, 其后于 1905 年, Bertoni 又较全面地为甜菊作了科学的描述, 他鉴定甜菊为 Compositae (Asteraceae) 科 *Stevia* 属成员, 并将它定名为 *Stevia rebaudiana* Bertoni。

甜菊的化学研究始于 1908 年, 但是那些研究都未能很好的反映甜菊叶片中化学物质的特征。这个领域真正的进步始于 1931 年, Bridel 和 Lavielle 成功地从甜菊叶片中纯化出糖苷晶体, 并命名为 stevioside。此外, 他们还将甜菊糖苷经蜗牛水解液处理后得到一种二萜类糖苷配体, 取名为 steviol (甜菊醇)。以后的研究陆续发现甜菊糖苷以二萜类化合物甜菊醇 (Steviol) 为糖苷非糖配基, 根据 13 位上的羟基和 19 位上的羧基上以 O-糖苷键相连的糖基种类及数量不同, 至少存在 8 种糖苷 (Kinghorn and Soejarto, 1985) (图 1), 其中 rebaudioside A 的甜度是等重量的蔗糖的 320 倍, stevioside 为 110-270 倍, rebaudioside C 为 40-60 倍, dulcoside A 为 30 倍 (Phillips, 1987)。甜菊叶片中的糖苷物质达到了干重的

10%以上, 其中最主要的 4 种糖苷成分在叶片中的含量通常为: dulcoside 占叶片干重 0.3%, rebaudioside C 占 0.6%, rebaudioside A 占 3.8%, stevioside 占 9.1%。这些成分几乎全部集中在叶片, 少量在茎部, 而在根部则未发现 (Brandle and Rosa, 1992)。

图 1 甜菊糖苷的种类和化学结构

Fig.1 The kinds and structures of steviol-glucosides

甜菊糖苷作为甜味剂, 在日本被最广泛使用。现在已经有数十个的专利描述了甜菊糖苷的提取方法。这些方法主要基于溶剂提取, 离子交换, 选择性沉降和吸收光谱等(Phillips 1989)。随着糖苷的商业应用规模越来越大, 甜菊糖苷作为食物添加剂的安全性也受到了人们的关注, 并成为了一个争论的热点 (Bonvie et al., 1997, Pendergast 1991)。Planas 和 Kuc (1968) 报道 5% 的甜菊叶片提取物使 65% 的大鼠不育。随后的研究又证明甜菊糖苷对实验动物无不良影响 (Sinchoole and Marcorelles 1989, Yodyingyuad and Bunyawong 1991)。Pezzuto 等 (1985) 指出尽管甜菊糖苷本身没有诱变作用, 但是它的糖苷配基甜菊醇在沙门氏菌和小鼠实验中表现诱变作用。这一观点得到了 Matsui 等 (1996) 的支持。Kinghorn 和 Soejarto (1985) 以及 Kinghorn(1992) 的两篇文章综述了当时所有甜菊糖苷成分安全性分析的文章后得出人体食用甜菊叶片和甜菊糖苷是安全的结论。然而, 甜菊醇的诱变性以及对人体的影响还不能完全确定 (Procinska 等 1991, Matsui 等 1996)。甜菊糖苷对人体安全性的争论还将继续 (Matsui 等 1996)。

甜菊细胞生物学研究始于 1980 年, 主要来源于厦门大学细胞生物学研究室的研究工作。这些工作主要包括: 陈睦传等 (1983, 1988), 洪维廉等 (1984, 1985, 1987, 1989) 研究了甜菊叶片细胞液泡系、叶绿体和高尔基体超微结构、质体的发育以及甜菊糖苷的亚细胞分布特点; 欧阳学智 (1987) 和谢绍萍 (1987) 分别研究了甜菊细胞中质体的脱分化和分化动态以及甜菊愈伤组织的培养和甜菊糖苷积累的调节; 郭洁 (1988) 研究了花药壁发育的亚显微结构及其功能; 刘丹等 (1988) 研究了微体的超微结构, 发育和过氧化氢酶电镜细胞化学定位; 余求迪等 (1989) 研究了甜菊叶肉细胞脱分化和愈伤组织形成过程中细胞的超微结构、核酸、可溶性蛋白质和过氧化物酶活性及其同工酶的变化, 以及不同激素组

合对愈伤组织形成的影响；李里焜等（1987，1988，1989，1995）研究了叶片细胞的 UDPG 焦磷酸化酶（PPLase）、UDPG:甜菊苷葡萄糖基转移酶（Gtase）和 UDPase 的基本特征，亚细胞分布及活性变化。在综合了国内外和我们的研究成果后，陈睦传等于 1998 年提出了甜菊糖苷在甜菊细胞内的生物合成过程以及合成过程的亚细胞定位。

## 二、甜菊醇和甜菊糖苷的生物合成

图 2 甜菊醇和赤霉素的生物合成途径

Fig.2 Outline of the elements common to the biosynthesis of GA and steviol from GGDP

甜菊醇的生物合成研究始于二十世纪 60 年代。Ruddat 等（1965）和 Bennett 等（1967）先后报道  $^{14}\text{C}$  乙酸和  $17\text{-}^{14}\text{C}$  贝壳杉烯结合到甜菊醇的碳骨架，Hanson 和 White（1968）还进一步提供了甜菊醇经由甲羟戊酸-贝壳杉烯-贝壳杉烯 16-内-19-羧酸合成的依据（图 2）。贝壳杉烯也是赤霉素的前体物质，因此一般认为甜菊醇和赤霉素共享贝壳杉烯合成途径。

异戊烯二磷酸（Isopentenyl diphosphate IPP）作为所有异戊烯酸衍生物的基本单位，通常被认为是由乙酰辅酶 A 经由甲羟戊酸途径（mevalonic acid pathway, MVA pathway）形成的。但是最近的研究表明在高等植物中除了叶绿体中的 MVA 途径外，在细胞质的质体中还有另外一条途径形成异戊烯二磷酸。这就是甲基赤藓糖醇磷酸化途径（methylerythritol phosphate pathway, MEP pathway）。Totte 等（2000）将  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$  葡萄糖加入到培养基中，发现甜菊醇可以经由 MEP 途径合成。

在 MVA 途径中，赤霉素和甜菊醇的合成首先由 HMG-CoA 还原酶（HMG Reductase, HMGR）催化 HMG（ $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酸）CoA 形成甲羟戊酸（mevalonic acid MVA），再进入类异戊二烯途径（Isoprenoid pathway）。在 MEP 途径，葡萄糖在质体中形成 IPP，直接进入类异戊二烯途径。

MVA 或 IPP 经类异戊二烯途径（Isoprenoid pathway）产生牻牛儿牻牛儿二磷酸（geranygeranyl diphosphate, GGDP），从而进入了植物体内赤霉素 gibberellin(GA)的生物合成途径。植物中所有的二萜类物质都是从牻牛儿牻牛儿二磷酸（geranygeranyl diphosphate, GGDP）演变而来的（Bohlmann et al., 1988）。由 GGDP 开始经 CDP 合成酶((-)-copalyl diphosphate synthase, CPS) 环化产生黄

脂二磷酸(copalyl diphosphate, CDP), 再经内贝壳杉烯合酶 (*ent*-kaurene synthase, KS) 再次环化产生内贝壳杉烯 (*ent*-kaurene), 接下来内贝壳杉烯的 C-19 位氧化, 形成内贝壳杉烯醇(*ent*-kaurenol), 内贝壳杉烯醛 (*ent*-kaurenal), 最后产生内贝壳杉烯酸 (*ent*-kaurenoic acid, *ent*-KA)。这三步氧化可能由同一个单加氧酶-细胞色素 P450(cytochrome P450 monooxygenase,)催化。到此为止, 甜菊糖苷非糖配基 steviol 的合成途径开始与赤霉素 (GAs) 合成途径分开。从 *ent*-KA 这个分支点开始, Cyt-P450 参与在 C-7 位单加氧形成内-7-羟-异贝壳杉烯酸 (*ent*-7-Hydroxy kaurenoic acid), 从而继续 GA 的生物合成。而甜菊则可以在 C-13 而非 C-7 位由 *ent*-KA 13-羟化酶 (*ent*-kaurenoic acid 13-hydroxylase) 羟化形成甜菊糖苷的非糖配基 steviol。Steviol 在 13 位的羟基和 19 位的羧基上由甜菊糖苷糖基转移酶 (UDPG: steviol glucosyltransferase) 转糖基后生成了各种类型的糖苷。

### 三、甜菊糖苷合成途径中相关酶的研究

甜菊糖苷合成途径的相关酶除 HMGR, CPS, KS, *ent*-KA 13-羟化酶和糖基转移酶已从甜菊分离获得 (Kim et al.1996a, 1996b; Shibata et al, 1995; Richman et al., 1999) 外, 其余的相关酶尚未以甜菊为材料进行研究。但是通过其它植物赤霉素生物合成过程的研究成果, 我们也可以了解到一些与甜菊糖苷合成相同的酶的特征。

#### 1. HMG-CoA 还原酶 (HMGR)

HMGR(EC 1.1.1.34)催化 HMG-CoA 转变成 MVA-所有类异戊二烯化合物的前体, 这是 MVA 途径的限速步骤。在植物中 HMGR 的活性主要存在于微粒体膜, 线粒体及质体膜上。在甜菊叶片中, 线粒体上酶活性极低, 这与菠菜 *Spinacia (Sp.) oleracea* 和野生菊科植物 *Solidago (So.) altissima* 相似, 但甜菊叶绿体中 HMGR 含量及活性即使在静止期也比以上 2 种植物高得多。其中等量的酶活性是菠菜叶子的 150 倍, *So. altissima* 的 9.6 倍, 等量的叶绿体的酶活则分别是后二者的 300 倍和 8.5 倍。可以看出甜菊体内 MVA 途径代谢十分活跃, 合成了大量的 MVA 这种许多生长及代谢调节物质的前体, 也为甜菊糖苷的大量合成提供了物质基础。

虽然还只获得了粗制的 HMGR, 纯度还达不到测序分析的程度, 但已初步获得了该酶的一些特征。HMGR 主要位于叶绿体的类囊体部分, 是附着于膜上

的酶。Steviol, Steviol-glycosides 及 *ent*-KA 等后续产物对 HMGR 活性无影响, 其它特征如最适 pH (7.5), 与 HMG-CoA 的表观  $K_m$  值 (8.62 $\mu$ M) 与 *So.altissima* 相似 (Kim et al, 1995)。

## 2. 黄脂二磷酸合成酶 (CPS) 及内贝壳杉烯合成酶 (KS)

GAs 的前体 *ent*-kaurene 由 GGDP 经两步环化合成, 中间过程由 CPS、KS 作用, CPS 催化 GGDP 环化形成黄脂二磷酸(CDP), 而 KS 催化黄脂二磷酸(CDP) 环化形成内贝壳杉烯(*ent*-kaurene)。CPS 有多种同工酶, 在玉米、豌豆、和拟南芥中已经获得多个基因 (Ait-Ali et al., 1997; Bensen et al., 1995; Sun and Kamiya, 1994)。而 KS 首先从西葫芦 (*Cucurbita maxima*) 的胚乳中获得纯化, 含量很丰富, 分子量为 81 000, 在拟南芥和西葫芦中都是单拷贝的基因 (Yamaguchi et al., 1996)。KS 的基因在多种植物中已分离(Yamaguchi et al., 1996; Helliwell et al., 1998), 在 *Arabidopsis* 和 *Maize* 中二者的氨基酸序列有 51% 的同源性 (Hedden et al., 1997)。CPS 和 KS 在小麦幼苗定位于发育中的叶绿体中, 在西葫芦胚乳中定位于白色体中, 而在成熟的叶绿体中活性很低 (Richman et al., 1999)。

Richman 等 (1999) 从甜菊叶片 cDNA 文库中分离获得了这两个酶的基因序列, 并进行了原核表达。重组得到的酶都具有相应的酶活性。CPS 基因的全长 2360bp, 编码 787 个氨基酸。与豌豆的 LS 基因、拟南芥的 GA1 基因、玉米的 AN1 基因分别有 51%、46% 和 41% 的相似性。基因具有保守的 DXDD 框。KS 基因全长 2352bp, 编码 784 个氨基酸。与拟南芥的 GA2 基因有 42% 相似性。这两种基因在甜菊体内都有 2 个拷贝数。与其它植物不同的是, 在甜菊叶片中 CPS 和 KS 基因表达量比根尖高得多, 而在拟南芥中 GA1 (即 CPS) 基因的表达即使在表达量高的根尖部分也很难检测出。KS 和 CPS 基因在甜菊成熟叶片中大量的表达, 这一结果与甜菊叶片富集甜菊糖苷而根部缺乏的事实是相符合的。另外, 甜菊的成熟叶片中的 CPS 表达量也远远高于幼嫩的叶片, 这种表达方式也与其它植物大不相同, 这表明 CPS 和 KS 基因在甜菊中的作用已经不仅限于产生 GA 的前体物质, 而且也参与了甜菊糖苷的合成途径。

## 3. Ent-kaurenoic 13-羟化酶

该酶全称为 *ent*-kaurenoic acid, NADPH: oxygen 氧化还原酶。在其它植物如菠菜 *Spinacea oleracea* 和菊科的 *Solidago altissima* 中未发现该酶活性 (Kim et al.

1996)。从赤霉素和甜菊醇生物合成的共同前体 *ent*-KA 开始, 由 Cyt-P450 继续 GAs 的合成, 在 *ent*-KA 的 C-7 位上羟化, 形成 *ent*-7-OH-KA。而甜菊醇是另一种单加氧形式的或称为 13-羟化形式的 *ent*-KA。因此甜菊体内由 *ent*-KA 合成 Steviol 的反应是 GAs 合成途径的另一个分支。与 Cyt-P450 的亚细胞定位不同, *ent*-KA 13 羟化酶定位于叶绿体基质中。微粒体部分和叶绿体类囊体上活性很微弱。分离中有机相中未发现酶活, 表明该酶是存在于叶绿体基质中的可溶性酶。

*ent*-KA 13-羟化酶的催化过程需要 NADPH 和氧气的参与。酶的表观分子量 Mr 约 160,000, 亚单位为 39,000, 表明该酶是由四个一样或相似的亚单位组成的四聚体。最适 pH 为 7.5-7.8。纯化的酶在 370-448nm 有一吸收光谱, 与许多黄素蛋白相似, 加入外源 FAD 可提高酶活 2 倍以上。但它不能作用于 *t*-cinnamic (苯丙烯), resorcinol (间苯二酚), 4-hydroxyphenyl acetate (4-羟苯乙酸) 和 choline (胆碱) 等其它一些可溶性羟化酶底物, 似乎只表现为对 *ent*-KA 的底物专一性。该酶已被纯化提取, 并已测得 N 端部分氨基酸得序列, 与其它得蛋白无明显同源性 (Kim et al., 1996a)。

#### 4. 甜菊糖苷糖基转移酶 (Steviol-Glycoside: Glucosyltransferase)

在甜菊叶片中至少存在三种不同活性的糖基转移酶-GTaseI, GTaseIIA 和 GTaseIIB (Shibata et al., 1995), 其中两种已被部分分离纯化。GTaseI 由 2 个相同的亚单位组成, 分子量为 51 000, 以 Steviol 和 UDPG 为底物, 在 steviol 13 位羟基上转糖基形成 Steviolmonoside, 并对 Steviolmonoside 有较低的活性。而 GTaseIIB 也由两个亚单位组成, 分子量约 61 000, 具有较广泛的底物特异性, 可催化在 Steviol, Steviolmonoside, Steviolbioside 和 Stevioside 上转糖基, 其中对 Steviolbioside 活性最高。糖基的合成顺序可能是首先在 Steviol 的 13-羟基上被 GTaseI 转糖基作用形成 Steviolmonoside, 然后由 GTaseIIB 在葡萄糖基上加第二个糖基形成 Steviolbioside。在 Steviol 的第 13 位羟基上加上 2 个相连的糖基后, 第 19 位的羧基开始接受糖基, 由 GTaseIIB 催化形成 Stevioside, 并继续催化形成 Reb-A (Shibata et al., 1995,1991)。GTaseIIB 是第一个被发现的既可在羟基上又可在羧基上转糖基的糖基转移酶。然而这并不排除有不同功能却具有相同的色谱及电泳特征的两种酶未被分离的可能性。

本研究室李里焜等 (1989) 从甜菊中首次获得纯化了 128 倍的糖基转移酶

(GTaseI和GTaseII),电镜细胞化学定位研究表明GTaseI定位于液泡膜和液泡内;受二价金属离子  $\text{Ca}^{2+}$  激活,受  $\text{Mn}^{2+}$  抑制。

Shibata 等 (1995) 认为这些糖基转移酶很可能是一类在植物中广泛存在的类黄酮 (flavonoid) 类糖基转移酶。在以堪非醇 Kaempferol (4', 5,7-三羟黄酮醇), 乐皮酮 Quercetin (3', 4', 3,5,7-五羟黄酮) 以及氢醌为底物时发现, 甜菊糖基转移酶的催化效率比催化 Steviol 及糖苷类物质高出许多, 其中对堪非醇的催化活性最高。GTaseI 对堪非醇和乐皮酮等底物的亲和性, 酶活, 最适 pH 及分子量都与葡萄柚幼苗获得的黄酮 (flavanone) 7-O-GTaseII (McIntosh et al, 1990) 很相似。从菠菜, 欧芹叶片, 烟草的培养细胞及 *Hippocrepis* 的花瓣等这些不产生甜菊糖苷的植物组织或细胞中的提取物也具有在 Steviol 及 Steviolbioside 上转糖基的活性。

甜菊糖苷糖基转移酶是一类可溶性的酶, 在叶绿体中尚未发现该酶的活性 (Kalinowska et al., 1986; Harzdina et al., 1980)。Shibata 等 (1995) 推测这三种糖基转移酶由于还承担对类黄酮的转糖基作用, 而且对不同底物具有不同的活性, 所以它们可能定位于细胞内的不同部位。由于酶的纯化度不高, 还不清楚其氨基酸顺序, 无法与其它植物的糖基转移酶进行同源性分析, 但它们的转糖基作用很可能直接地导致了甜菊糖苷的大量合成 (Shibata et al., 1995)。

因为 Shibata 等 (1995) 还没有验证已获得的三种 GTase 活性能否合成其余几种糖苷以及是否足以完成体内所有甜菊糖苷的转糖基作用, 因此还不能排除甜菊体内还可能存在其它的或同工的糖苷转移酶。这就需要对甜菊糖苷转移酶在细胞中的含量及亚细胞定位进一步的深入研究。

#### 四、甜菊糖苷合成的生物学意义

Steviol 的前体物质 MVA, IPP, *ent*-KA 也是一些生长及代谢调节物质的前体。由于甜菊叶片占干重 10%-20% 的糖苷的合成需要大量的甜菊醇 (steviol) 骨架, 因此推测甜菊体内 MVA 和 *ent*-KA 等前体的合成量或相应合成酶的含量及活性也必然比其它植物高得多。甜菊叶绿体类囊体上的 HMGR 的高含量和高活性 (Kim et al., 1996) 以及 KS 和 CPS 基因在甜菊成熟叶片中大量的表达 (Richman et al., 1999) 证实了这一点。为了避免 GAs 等生长调节物质的过量产生, 这些前体物



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库