

罗红,陈玉连,侯爱香,等.茯砖茶冠突散囊菌EcUGT88E3基因的克隆、表达及分子特性分析[J].华中农业大学学报,2025,44(6):79-86.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.008

茯砖茶冠突散囊菌EcUGT88E3基因的克隆、表达及分子特性分析

罗红¹,陈玉连²,侯爱香¹,张鑫³,朱洛志⁴,
常云龙¹,夏秀东⁵,夏菠¹,肖愈^{1,4}

1.湖南农业大学食品科学技术学院,长沙410128;2.湖南省农业科学院棉花与蚕桑研究所,长沙410125;
3.宁波大学食品科学与工程学院,宁波315211;4.湖南农业大学园艺学院茶学教育部重点实验室,
长沙410128;5.江苏省农业科学研究院农产品加工研究所,南京210014

摘要 为探究冠突散囊菌UDP-葡萄糖基转移酶EcUGT88E3在调控黄酮糖苷类物质合成中的作用,利用同源序列克隆EcUGT88E3基因,并进行生物信息学分析;构建了pET28a-EcUGT88E3/BL21(DE3)表达系统并优化诱导条件,实现EcUGT88E3基因的异源表达与分离纯化。结果显示:EcUGT88E3基因全长1704 bp,其中5'-UTR为75 bp,3'-UTR为207 bp,完整开放阅读框为1422 bp,编码473个氨基酸。生物信息学预测其编码的蛋白为疏水性蛋白,分子质量为52.03 ku。蛋白结构预测表明EcUGT88E3不具有信号肽和跨膜区特征,属于微粒体定位蛋白,含有GT1及GT-B超家族特征结构域。EcUGT88E3重组蛋白以包涵体形式表达,其原核表达载体在大肠杆菌BL21(DE3)中最佳诱导条件为27℃、0.2 mmol/L IPTG培养4 h。

关键词 茯砖茶;冠突散囊菌;糖基转移酶;基因克隆;生物信息学分析;原核表达

中图分类号 Q78; TS272.5

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2025)06-0079-08

冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*),又称“金花菌”^[1],作为一种在传统茯砖茶微生物发酵过程中具有显著特征性和功能性优势真菌,因其代谢转化在茯砖茶特征风味及滋味品质的形成中发挥重要作用而备受关注。在茯砖茶的生产过程中,冠突散囊菌消耗了大量的可溶性糖,同时分泌丰富的胞外酶,如淀粉酶、蛋白酶和糖基转移酶等^[2],加速了茶叶成分的生物转化,从而提升了茶叶的品质和口感。近年来的研究报道指出,茯砖茶中的黄酮糖苷类物质含量显著高于其他类型的黑茶^[3],这可能与其发酵过程中的优势微生物冠突散囊菌有关。有研究发现,冠突散囊菌发酵白茶能够显著提高甲基橙皮苷、芹菜素-C-戊糖苷、牡荆素-4-O-葡萄糖苷等黄酮糖苷类物质的总量^[4]。此外,采用冠突散囊菌进行生物转化处理荞麦的研究发现,山柰酚-3-O-鼠李糖苷的含量显著上调了14.97倍^[5]。因此,研究冠突散囊菌中调控黄酮糖苷类物质合成的关键基因,有望揭示茯

砖茶发酵过程中黄酮糖苷合成的分子机制,为黑茶产业的可持续发展提供新思路。

糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)作为一类重要的酶类,可以催化黄酮类化合物通过O-糖苷键或C-糖苷键与糖基相连,从而促进黄酮糖苷的高效合成,由于糖的种类、数量、连接位置及连接方式的不同,可以组成各种各样的黄酮糖苷^[6-7]。黄酮类物质作为茶叶中的重要活性成分,具有广泛的生物活性,涵盖抗氧化^[8]、抗炎^[9]、抗肿瘤^[10]等多种健康功效。但是,其通常存在溶解度低、生物利用度差、稳定性低等问题,这在一定程度上限制了其在食品、医药等领域的应用。黄酮糖基化修饰能提高其生物利用度、药效、溶解度、稳定性和药代动力学性质^[11]。例如,槲皮素3-O-葡萄糖苷比槲皮素和芦丁更容易被吸收,槲皮素4-O-葡萄糖苷的生物利用度比芦丁高5倍^[12]。GT利用糖基对苷元进行糖基化时,选用的糖基供体有多种类型,其中尿苷二磷酸-单糖是一

收稿日期:2025-08-24

基金项目:国家自然科学基金项目(32302611);湖南省教育厅科学研究重点项目(24A0158);芙蓉计划青年科技人才项目(2025RC3172)

罗红,E-mail:2749584543@qq.com

通信作者:肖愈,E-mail:yuxiao_89@163.com;夏菠,E-mail:julinomber2@sina.com

种常见类型,以其作为糖基供体的GT被称为尿苷二磷酸糖基转移酶(uridinediphosphate glycosyltransferases,UGTs)^[13-14]。目前,研究人员已从多种植物中发现UGTs及其编码基因,并对其开展了生物信息学与基因工程研究^[15-17],但来源于茶叶发酵关键微生物冠突散囊菌的UGTs基因挖掘、克隆与功能研究尚未见系统报道,因而,克隆、表征冠突散囊菌的UGTs基因并获得其功能蛋白是揭示茯砖茶品质形成分子机制的关键一步。

本研究基于前期冠突散囊菌在茯砖茶发酵过程中的转录组分析,成功克隆糖基转移酶EcUGT88E3基因,并通过生物信息学分析对其序列特性、结构域组成和潜在生物学功能进行预测和分析。此外,通过构建pET28a-EcUGT88E3原核表达系统,实现EcUGT88E3基因在大肠杆菌中的异源表达,并成功获得纯化的重组蛋白,旨在为后续研究其在冠突散囊菌代谢及茯砖茶发酵过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)分离自湖南益阳茶厂茯砖茶,保藏于湖南农业大学食品微生物实验室。

1.2 引物的设计与合成

基于冠突散囊菌转录组分析结果,确定目标基因EcUGT88E3后,采用Snapgen软件设计引物,引物由生工生物工程股份有限公司合成。具体引物序列如下:正向引物(FP):5'-TCCATAAAATAGAG-CAAGCATCTTG-3';反向引物(RP):5'-TGG-TACGACACTCGGCTTACC-3'。

1.3 冠突散囊菌总RNA的提取与EcUGT88E3的克隆

采用Fungal Total RNA Isolation Kit试剂盒(Sangon Biotech,上海生工生物)提取冠突散囊菌的总RNA,运用Reverse Transcription Kit试剂盒(Sim-gen,杭州新景生物)进行逆转录,从而获得冠突散囊菌cDNA。以冠突散囊菌cDNA为模板对EcUGT88E3基因进行PCR扩增,反应体系为:引物(10 μmol/L)各1 μL,2×E-Taq PCR Master Mix 25 μL,用ddH₂O补充至50 μL。PCR反应条件为:95 °C预变性30 s;95 °C变性30 s,62 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,35个循环;72 °C延伸10 min。

1.4 EcUGT88E3基因生物信息学分析

利用Cell-PLoc2.0进行亚细胞定位预测,借助TMHMM Server 9进行跨膜结构域分析,采用Ex-PASy-ProtParam计算理化参数,利用SignalIP 4.1检测信号肽,通过ExPASy-ProtScale进行亲水性分析,借助NCBI中的Conserved domains数据库进行保守区域分析;采用SOPMA预测二级结构元件;运用SWISS-MODEL构建三级结构模型。

1.5 EcUGT88E3基因原核表达分析

将构建和鉴定正确的重组质粒pET28a-EcUGT88E3和空载体质粒pET28a分别转化到大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)中。参照原核表达诱导的常规方法^[18],培养含有pET28a-EcUGT88E3重组质粒的大肠杆菌,具体步骤如下:阳性转化子经含卡那霉素的LB平板筛选后,接种于5 mL含100 mg/L氨苄青霉素的LB液体培养基,37 °C、200 r/min振荡培养至OD_{600 nm}为0.5~0.6。立即将菌液转移至15 °C环境冷却30 min,随后加入IPTG至终浓度1 mmol/L进行诱导。同时设置未加IPTG的对照菌液,所有样品在27 °C、200 r/min条件下诱导表达6 h。

菌体處理及蛋白检测方法如下:在4 °C条件下以6 000 r/min离心10 min收集菌体,随后使用预冷的PBS缓冲液(pH 7.4)洗涤菌体沉淀。将洗涤后的菌体重悬于PBS缓冲液中,进行冰上超声破碎20 min(250 W,超声1.5 s,间隔3.0 s),超声完成后,将样品在4 °C、8 000 r/min条件下离心10 min,分别收集上清液和沉淀物。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测目的蛋白的表达情况和可溶性,设置空载体转化菌作为阴性对照。

1.6 EcUGT88E3基因原核表达条件优化

依据本文“1.5”所述方法,培养携带pET28a-EcUGT88E3重组质粒的大肠杆菌。分别采用0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mmol/L的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)对pET28a-EcUGT88E3重组菌进行6 h的诱导处理,以探究诱导剂IPTG浓度对EcUGT88E3重组蛋白表达的影响;将含有最适IPTG诱导浓度的重组质粒菌液分别置于17、22、27、32、37 °C的培养条件下,以200 r/min的转速进行6 h的诱导处理,以探究诱导温度对EcUGT88E3重组蛋白表达的影响;在最适IPTG诱导浓度、最佳诱导温度、200 r/min的培养条件下进行诱导处理6 h,每隔

1 h 收集细胞, 以探究诱导时间对 *EcUGT88E3* 重组蛋白表达的影响。按照本文“1.5”的方法进行 SDS-PAGE 分析, 以未诱导组作为试验对照。

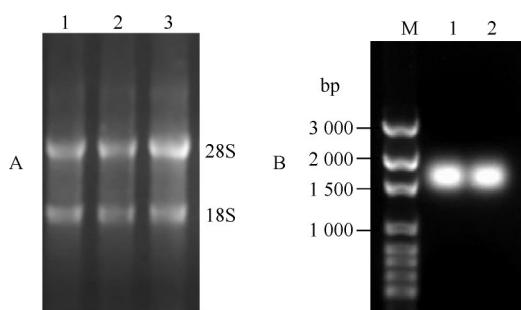
1.7 重组蛋白的纯化

收集诱导表达后的菌体, 使用 PBS 缓冲溶液进行重悬, 在冰浴环境中处理 1 h 促进溶解, 期间每隔 15 min 轻柔混匀 1 次, 并利用超声波进行破碎处理。接着, 将破碎后的液体在 4 ℃ 条件下以 15 000 r/min 的速度离心 15 min, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 去除残留细胞和细胞碎片以防堵柱, 收集上清使用已经洗涤过的 Ni-NTA 树脂纯化目的蛋白。收集样品进行 SDS-PAGE 电泳分析与蛋白浓度的测定, 置于 -80 ℃ 保存。

2 结果与分析

2.1 *EcUGT88E3* 基因的克隆

提取冠突散囊菌的总 RNA, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1A), 电泳图谱显示了清晰的带型, 28S 最亮、18S 其次。采用 Nanodrop 仪器测定冠突散囊菌总 RNA 纯度, 经计算, A₂₆₀/A₂₈₀ 的值为 1.8~2.2, 说明总 RNA 的完整性较好, 可以进行反转录。以反转录的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得预期大小的特异条带(1 704 bp), 表明成功从冠突散囊菌 cDNA 中扩增出 *EcUGT88E3* 基因(图 1B)。



A: 冠突散囊菌总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测; B: 冠突散囊菌 *EcUGT88E3* 基因 PCR 扩增产物的电泳图(M: DNA Marker100; 泳道 1~2: *EcUGT88E3* 基因的 PCR 扩增产物)。A: Electrophoresis of total RNA from *Eurotium cristatum*; B: PCR analysis of *EcUGT88E3* gene in *Eurotium cristatum*(M:DNA Marker100; Lane 1 and 2: PCR amplification products of *EcUGT88E3* gene).

图 1 冠突散囊菌总 RNA 提取与 *EcUGT88E3* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 Total RNA extraction from *Eurotium cristatum* and PCR amplification of the *EcUGT88E3* gene

2.2 冠突散囊菌 *EcUGT88E3* 基因分子特性分析

UDP-葡萄糖基转移酶 *EcUGT88E3* 的氨基酸序

列的理化分析结果显示: 该蛋白分子式为 C₂₃₂₅H₃₇₀₀N₆₀₄O₆₉₇S₂₄, 理论分子质量为 52.03 ku, 蛋白由 473 个氨基酸组成, 包括 54 个负电荷和 40 个正电荷氨基酸(表 1); 预测等电点为 5.21, 不稳定系数为 45.00, 脂肪系数为 95.08, 总平均亲水性得分为 0.003, 因此推测 *EcUGT88E3* 整体表现为疏水性蛋白(图 2A)。信号肽预测结果显示, *EcUGT88E3* 的信号肽平均值为 0.165, 未发现明显的信号肽序列, 提示 *EcUGT88E3* 蛋白不具有分泌功能(图 2B)。采用 TMHMM 预测冠突散囊菌 *EcUGT88E3* 中的跨膜区可知, TMHs 值为 0, 不具有跨膜结构域, 且其 N 端前 60 位氨基酸中跨膜螺旋残基的数量极低(<1), 进一步证明了 *EcUGT88E3* 的 N 端无信号肽(图 2C)。基于 Cell-PLoc2.0 的预测结果显示, *EcUGT88E3* 主要定位于微粒体中(图 2D), 该定位与真核细胞中蛋白质和次级代谢产物糖基化修饰的主要场所内质网相联, 意味着 *EcUGT88E3* 可能参与冠突散囊菌内质网相关的糖基化途径。保守结构域预测结果显示, *EcUGT88E3* 包含 GT1 及 GT-B 超家族(5~462)、UDPGT(265~438)、Yjc(242~456) 以及 MGT 等多个保守功能域(310~462)(图 2E), 说明 *EcUGT88E3* 属于 GT1 家族, 具有 GT-B 结构, 能够催化糖基转移反应, 促进糖苷键的形成。

利用 SOPMA 在线分析软件预测 *EcUGT88E3* 的二级结构, 获得以下组成: α 融合(40.93%)、无规则卷曲(43.88%)、β 折叠(15.19%), 不含 β 转角(图 3A)。用 SWISS-MODEL 同源建模的方法预测分析 *EcUGT88E3* 的三级结构, 结果显示该蛋白由 α 融合、β 折叠和无规则卷曲组成, 与二级结构预测结果吻合(图 3B)。

2.3 *EcUGT88E3* 重组蛋白的原核表达与可溶性表达验证

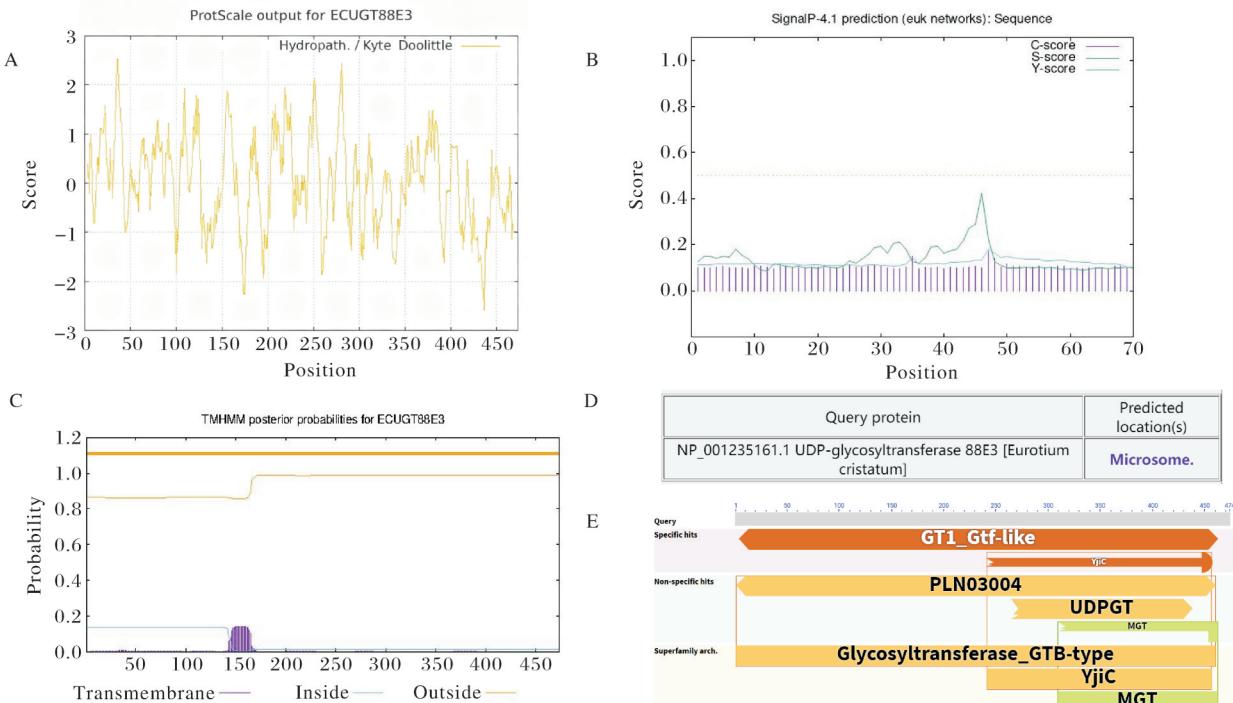
将 *EcUGT88E3* 基因插入到原核表达载体 pET28a 酶切位点 *Bam*H I 和 *Not* I 处, 并进行双酶切验证连接效果(图 4)。双酶切验证电泳结果显示, 出现了 5.3 kb(载体)和 1.7 kb(目的基因)2 条特异性条带, 表明重组质粒 pET28a-*EcUGT88E3* 构建成功, 满足后续转化表达要求。

将重组载体转化至 BL21(DE3) 菌株后, 对诱导表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示: 全裂解液泳道(泳道 2、3)有明显的条带, 并与目的条带大小(56 ku)相符, 空载体对照(泳道 1)无此条带, 证明重组质粒 pET28a-*EcUGT88E3* 在大肠杆菌中实现了异

表1 EcUGT88E3蛋白氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of EcUGT88E3 protein

名称 Name	氨基酸数量 Quantity	占比/% Percentage	名称 Name	氨基酸数量 Quantity	占比/% Percentage
丙氨酸 Ala(A)	41	8.60	赖氨酸 Lys(K)	24	5.10
精氨酸 Arg(R)	16	3.40	蛋氨酸 Met(M)	16	3.40
天冬酰胺 Asn(N)	18	3.80	苯丙氨酸 Phe(F)	17	3.60
天冬氨酸 Asp(D)	20	4.20	脯氨酸 Pro(P)	29	6.10
半胱氨酸 Cys(C)	8	1.70	丝氨酸 Ser(S)	33	7.00
谷氨酰胺 Gln(Q)	16	3.40	苏氨酸 Thr(T)	37	7.80
谷氨酸 Glu(E)	34	7.20	色氨酸 Trp(W)	6	1.30
甘氨酸 Gly(G)	27	5.70	酪氨酸 Tyr(Y)	10	2.10
组氨酸 His(H)	9	1.90	缬氨酸 Val(V)	31	6.50
异亮氨酸 Ile(I)	26	5.50	吡咯赖氨酸 Pyl(O)	0	0.00
亮氨酸 Leu(L)	56	11.80	硒半胱氨酸 Sec(U)	0	0.00



A:亲水性/疏水性预测Hydrophobicity/hydrophilicity prediction; B:信号肽预测Signal prediction; C:跨膜区预测Transmembrane domains prediction; D:亚细胞定位预测Subcellular localization prediction; E:保守结构域预测Conserved domain prediction.

图2 EcUGT88E3的基本信息

Fig. 2 Basic information about EcUGT88E3

源表达(图5)。进一步分析显示,目标蛋白主要存在于沉淀(泳道6、7)中,上清(泳道4、5)中未见,说明目标蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式存在。

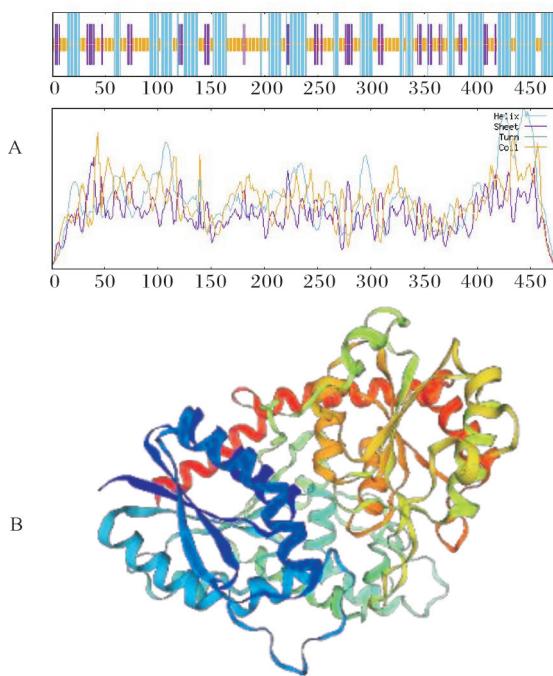
2.4 重组蛋白诱导条件的优化

通过SDS-PAGE检测不同浓度IPTG对pET28a-EcUGT88E3重组蛋白表达的影响,结果表明,0.2 mmol/L的IPTG可使pET28a-EcUGT88E3重组蛋白的表达量达到最高,当IPTG浓度超过0.2 mmol/L时,对该重组蛋白表达量的提升无显著

影响(图6A)。培养温度优化结果显示,27 °C时重组蛋白的表达量最高(图6B)。诱导时间筛选试验表明,重组蛋白的表达量在诱导时间为4 h时达到最高(图6C)。综上,重组蛋白EcUGT88E3的最佳诱导条件为0.2 mmol/L IPTG、27 °C、诱导4 h。

2.5 重组蛋白的分离纯化

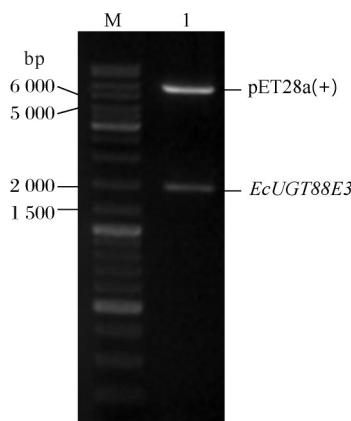
根据上述确定的最佳表达条件,进行重组蛋白的大量诱导表达。采用超声破碎方法裂解细胞后,经离心获得蛋白粗提物,随后进行Ni-NTA亲和层



A: 冠突散囊菌 *EcUGT88E3* 基因编码的蛋白质二级结构预测(蓝色: α 螺旋; 黄色: 无规则卷曲; 紫色: β 折叠; 绿色: β 转角); B: *EcUGT88E3* 蛋白三级结构。A: Prediction of the secondary structure of the protein encoded by the *EcUGT88E3* gene in *Eurotium cristatum* (blue: alpha helix; yellow: irregular curl; purple: beta fold; green: beta corner); B: Tertiary structure of *EcUGT88E3* protein.

图3 *EcUGT88E3* 蛋白的二级结构与三级结构

Fig. 3 Secondary and tertiary structure of the *EcUGT88E3* protein

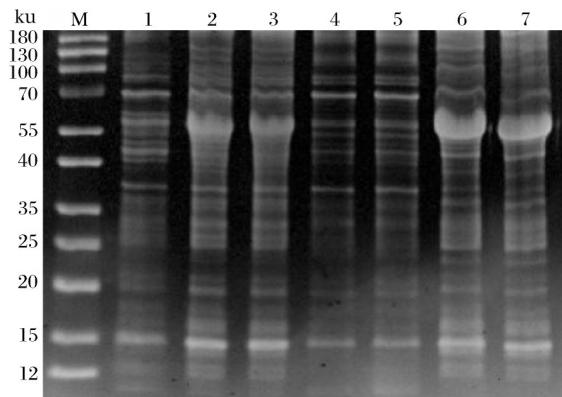


M: DNA Marker; 池道 1: 重组质粒双酶切产物。M: DNA Marker; Lane 1: Recombinant plasmid double digestion product.

图4 重组表达质粒 pET28a-*EcUGT88E3* 双酶切电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of pET28a-*EcUGT88E3* digest

析纯化。利用重组蛋白的 His 标签特性, 将粗提物上样至 Ni 柱后, 用咪唑进行洗脱。SDS-PAGE 检测结果显示: 通过 400 mmol/L 咪唑洗脱, pET28a-



M: 蛋白 Marker; 池道 1: 空载体对照; 池道 2 和 3: 全裂解液; 池道 4 和 5: 裂解液上清; 池道 6 和 7: 裂解液沉淀。M: Protein Marker; Lane 1: Empty vector control; Lane 2 and 3: Whole lysate; Lane 4 and 5: Lysate supernatant; Lane 6 and 7: Lysate precipitate.

图5 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*EcUGT88E3* 的 SDS-PAGE 蛋白电泳

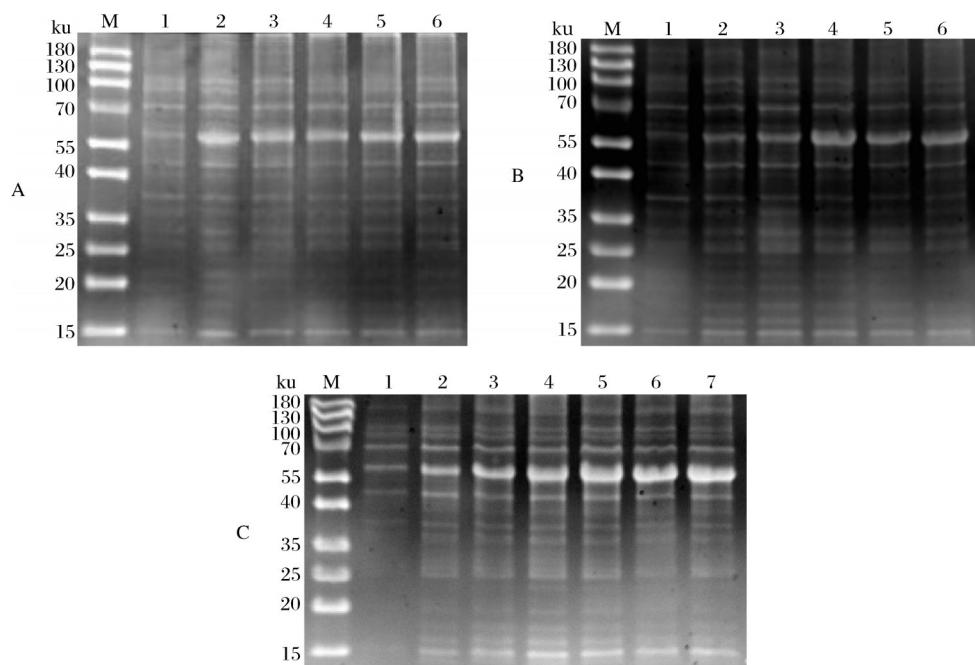
Fig. 5 SDS-PAGE of *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*EcUGT88E3*

EcUGT88E3 重组蛋白被成功洗脱, 获得纯度较好的重组蛋白(图7)。

3 讨 论

冠突散囊菌作为茯砖茶发酵过程中的优势微生物, 通过分泌多种酶促使茶叶成分转化^[19], 其分泌的 UGTs 在茯砖茶黄酮糖苷形成过程中的作用显著。笔者所在课题组在前期研究中发现黑茶经冠突散囊菌代谢转化后, 芹菜素-7-O-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷、芹菜素-8-C-葡萄糖苷、芹菜素-6-C-葡萄糖苷等的含量分别是未发酵黑茶的 2.11、6.86、2.21、2.59 倍^[20]。本研究从课题组前期冠突散囊菌转录组数据中筛选出 1 个糖基转移酶编码基因 *UGT88E3*, 采用 RACE 方法成功克隆该基因, 并将其命名为 *EcUGT88E3*。

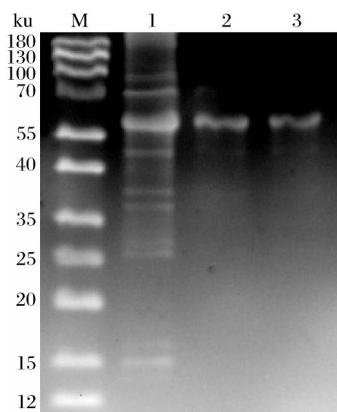
生物信息学分析结果显示, *EcUGT88E3* 基因编码 473 个氨基酸, 分子质量为 52.03 ku, *EcUGT88E3* 蛋白含有 GT1 及 GT-B 超家族特征结构域, 在 CAZy 数据库中属于 GT1 家族蛋白, GT1 家族主要催化糖分子向特定受体的转移。植物中 GT1 家族成员的氨基酸序列分析结果表明, 大多数家族成员在 C 末端有 1 个相对保守的 PSPG 盒, 由 44 个氨基酸残基组成, 可能代表糖基转移酶和尿苷二磷酸-单糖供体之间的识别和结合位点, 具有催化糖苷键形成的功能^[21]。蛋白结构分析结果显示, *EcUGT88E3* 不含跨膜结构和信号肽, 是定位在微粒体上的疏水性蛋白。



A:不同IPTG浓度(M:蛋白Marker;泳道1:重组载体未诱导;泳道2:0.2 mmol/L;泳道3:0.4 mmol/L;泳道4:0.6 mmol/L;泳道5:0.8 mmol/L;泳道6:1.0 mmol/L);B:不同诱导温度(M:蛋白Marker;泳道1:重组载体未诱导;泳道2:17 °C;泳道3:22 °C;泳道4:27 °C;泳道5:32 °C;泳道6:37 °C);C:不同诱导时间(M:蛋白Marker;泳道1:重组载体未诱导;泳道2:1 h;泳道3:2 h;泳道4:3 h;泳道5:4 h;泳道6:5 h;泳道7:6 h)。A: Different IPTG concentrations (M: Protein Marker; Lane 1: Recombinant vector not induced; Lane 2: 0.2 mmol/L; Lane 3: 0.4 mmol/L; Lane 4: 0.6 mmol/L; Lane 5: 0.8 mmol/L; Lane 6: 1.0 mmol/L); B: Different induction temperatures (M: Protein Marker; Lane 1: Recombinant vector uninduced; Lane 2: 17 °C; Lane 3: 22 °C; Lane 4: 27 °C; Lane 5: 32 °C; Lane 6: 37 °C); C: Different induction time (M: Protein Marker; Lane 1: recombinant vector not induced; Lane 2: 1 h; Lane 2: 2 h; Lane 3: 3 h; Lane 4: 4 h; Lane 5: 5 h; Lane 6: 5 h; Lane 7: 6 h).

图6 不同诱导条件下重组蛋白的表达情况

Fig. 6 Effect of different induction conditions on the expression of prokaryotic recombinant protein



M:蛋白Marker;泳道1:未纯化的蛋白;泳道2:400 mmol/L咪唑洗脱的蛋白;泳道3:400 mmol/L咪唑洗脱的蛋白。M: Protein Marker; Lane 1: Unpurified protein; Lane 2: Protein eluted with 400 mmol/L imidazole; Lane 3: Protein eluted with 400 mmol/L imidazole.

图7 Ni-NTA纯化pET28a-EcUGT88E3蛋白

微粒体主要来源于内质网,在真核细胞中,内质网是蛋白质合成、折叠、糖基化修饰和转运的关键场

所^[22],这表明EcUGT88E3很可能参与内质网介导的糖基化修饰过程,对茶叶基质的形成起着重要调控作用。

pET-28a含有T7强启动子,可驱动外源基因在宿主中表达,调控蛋白的表达水平,提高基因异源表达效率^[23]。本研究成功构建了pET28a-EcUGT88E3表达系统,并在大肠杆菌BL21(DE3)中诱导表达,SDS-PAGE结果表明目的蛋白EcUGT88E3以包涵体的形式存在。为了提高EcUGT88E3蛋白的表达量,对重组蛋白诱导条件进行优化。结果显示,pET28a-EcUGT88E3重组蛋白最佳诱导条件为27 °C、0.2 mmol/L IPTG培养4 h,优化后的诱导温度27 °C与冠突散囊菌的最适发酵温度(28 °C)高度吻合,这一发现表明EcUGT88E3基因的表达模式可能与该菌株特有的温度适应性生长特性密切相关。

本研究中的EcUGT88E3是首个从冠突散囊菌这一重要茯砖茶发酵微生物中表征的UGT基因,对

EcUGT88E3 基因开展克隆、分子特性分析及原核表达, 将有助于未来筛选产酶活性高的冠突散囊菌, 通过调控发酵条件诱导其高表达, 从而定向提升茯砖茶中特定功能黄酮糖苷的含量, 实现茯砖茶品质的精准调控与提升。后续将基于冠突散囊菌体系, 解析 *EcUGT88E3* 基因对糖苷类物质生物合成的调控机制。

参考文献 References

- [1] 张来, 曾云燕, 李倩, 等. 冠突散囊菌菌丝提取物抑菌活性研究[J]. 食品安全导刊, 2023(2): 107-110. ZHANG L, ZENG Y Y, LI Q, et al. Study on the antibacterial activity of the extracts from the mycelium of *Eurotium cristatum* [J]. China food safety magazine, 2023(2): 107-110 (in Chinese with English abstract).
- [2] 陈如扬, 樊子依, 潘一玲, 等. 冠突散囊菌对植物酚类物质的生物转化及生物活性的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(8): 193-201. CHEN R Y, FAN Z Y, PAN Y L, et al. *Eurotium cristatum* biotransformation plant phenolic compounds and affects their biological activities: a review [J]. Food research and development, 2022, 43(8): 193-201 (in Chinese with English abstract).
- [3] CHENG L Z, WANG Y F, ZHANG J R, et al. Integration of non-targeted metabolomics and E-tongue evaluation reveals the chemical variation and taste characteristics of five typical dark teas [J/OL]. LWT, 2021, 150: 111875 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111875>.
- [4] 孙红玉, 陈义琴, 石琳琳, 等. 不同产地金花白茶滋味代谢物组成及差异分析[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(16): 177-184. SUN H Y, CHEN Y Q, SHI L L, et al. Taste metabolite composition and differences of Jinhua white tea from different origins [J]. Food research and development, 2023, 44(16): 177-184 (in Chinese with English abstract).
- [5] XIAO Y, WU X, YAO X S, et al. Metabolite profiling, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of buckwheat processed by solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* YL-1 [J/OL]. Food research international, 2021, 143: 110262 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110262>.
- [6] GUO C X, LI J Y, WANG Y, et al. Functional characterization of a *Stevia rebaudiana* flavonoid glycosyltransferase [J/OL]. Enzyme and microbial technology, 2025, 190: 110708 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2025.110708>.
- [7] 张红城, 吴正双, 高文宏, 等. 黄酮类化合物改性方法的研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 256-261. ZHANG H C, WU Z S, GAO W H, et al. Research progress on modification methods for flavonoids [J]. Food science, 2011, 32(3): 256-261 (in Chinese with English abstract).
- [8] JOO Y, SEO Y H, LEE S, et al. Antioxidant and tyrosinase-inhibitory activities and biological bioactivities of flavonoid derivatives from *Quercus mongolica* pollen [J]. Molecules, 2025, 30(4): 794.
- [9] MA X W, CHEN Y, LI L L, et al. Efficient utilization of Shuanghuanglian medicine residues by microbial transformation with flavonoid glycosides-hydrolyzing strains [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2025, 16: 1553399 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.3389/fmcb.2025.1553399>.
- [10] WANG W B, CHENG H B, GU X L, et al. The natural flavonoid glycoside vitexin displays preclinical antitumor activity by suppressing NF- κ B signaling in nasopharyngeal carcinoma [J]. Onco targets and therapy, 2019, 12: 4461-4468.
- [11] XIAO J B, MUZASHVILI T S, GEORGIEV M I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids [J]. Biotechnology advances, 2014, 32(6): 1145-1156.
- [12] WANG W Y, SUN C X, MAO L K, et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: a review [J]. Trends in food science & technology, 2016, 56: 21-38.
- [13] 周洛兵, 申甲一, 曾碧容, 等. 女贞叶中一条糖基转移酶的基因克隆、生物信息学分析及原核表达[J]. 化学与生物工程, 2024, 41(4): 31-39. ZHOU L B, SHEN J Y, ZENG B R, et al. Gene cloning, bioinformatics analysis, and prokaryotic expression of a glycosyltransferase from *Ligustrum lucidum* Ait. leaves [J]. Chemistry & bioengineering, 2024, 41(4): 31-39 (in Chinese with English abstract).
- [14] 王媛媛, 刘云清, 徐晶宇, 等. 葡萄 UDP-糖基转移酶家族的全基因组表征、进化和表达分析[J]. 食品科学, 2025, 46(14): 134-146. WANG Y Y, LIU Y Q, XU J Y, et al. Genome-wide characterization, evolution and expression profiling of the UDP-glycosyltransferase family in grapes (*Vitis vinifera*) [J]. Food science, 2025, 46(14): 134-146 (in Chinese with English abstract).
- [15] PANDEY R P, GURUNG R B, PARAJULI P, et al. Assessing acceptor substrate promiscuity of YjiC-mediated glycosylation toward flavonoids [J]. Carbohydrate research, 2014, 393: 26-31.
- [16] ZHANG W J, ZHANG X J, LIANG L, et al. SaUGTs regulate YE-induced phytoalexins homeostasis in *Sorbus aucuparia* suspension cells [J/OL]. BMC plant biology, 2025, 25(1): 952 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06877-0>.
- [17] VYAS P, SRIVASTAVA P, SRIVASTAVA G, et al. UGT73FB1 contributes to scaffold-selective biosynthesis of triterpenoid glucosyl esters in saponin-rich bark of arjuna tree [J/OL]. The plant journal, 2025, 122(1): e70128 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.1111/tpj.70128>.
- [18] 梁英英. 灰树花 UDP 葡萄糖基转移酶 GFUGT88A1 的克隆表达与功能研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022. LIANG Y Y. Heterologous expression and functional roles of a UDP-glycosyltransferase GFUGT88A1 in *Grifola frondosa* [D]. Zhenji-

- ang: Jiangsu University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [19] YI J P, HAN Y X, LI X, et al. Dynamic changes in the phenolic profile, enzymatic, and antioxidant activity of grape skin during solid-state fermentation by *Eurotium cristatum* [J/OL]. Journal of food science, 2025, 90(3) : e70095 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.70095>.
- [20] XIAO Y, HE C, CHEN Y L, et al. UPLC - QQQ - MS/MS-based widely targeted metabolomic analysis reveals the effect of solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* on the dynamic changes in the metabolite profile of dark tea [J/OL]. Food chemistry, 2022, 378: 131999 [2025-08-24]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131999>.
- [21] VOGT T, JONES P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family [J]. Trends in plant science, 2000, 5(9): 380-386.
- [22] GHEMRAWI R, KREMESH S, MOUSA W K, et al. The role of ER stress and the unfolded protein response in cancer [J]. Cancer genomics & proteomics, 2025, 22(3): 363-381.
- [23] 张莹, 韩晓静, 蔡逸安, 等. 解淀粉芽孢杆菌内源启动子的筛选及表达碱性果胶酶的应用研究 [J]. 微生物学报, 2023, 63(4) : 1575-1586. ZHANG Y, HAN X J, CAI Y A, et al. Screening of endogenous promoters of *Bacillus amyloliquefaciens* and application of them in the expression of alkaline pectinase [J]. Acta microbiologica sinica, 2023, 63(4) : 1575-1586 (in Chinese with English abstract).

Cloning, expression, and molecular characterization of *EcUGT88E3* gene in *Eurotium cristatum* from Fuzhuan brick tea

LUO Hong¹, CHEN Yulian², HOU Aixiang¹, ZHANG Xin³, ZHU Mingzhi⁴,
CHANG Yunlong¹, XIA Xiudong⁵, XIA Bo¹, XIAO Yu^{1,4}

1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Institute of Cotton and Sericulture, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China;

3. College of Food Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

4. Ministry of Education Key Laboratory of Tea Sciences/College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

5. Institute of Agro-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract To explore the role of the UDP-glucosyltransferase *EcUGT88E3* of *Eurotium cristatum* in regulating glycosylation of flavonoids, the *EcUGT88E3* gene was cloned with homologous sequence cloning method and analyzed with bioinformatics. The pET28a-*EcUGT88E3*/BL21 (DE3) expression system was constructed and the induction conditions were optimized to achieve heterologous expression and purification of the *EcUGT88E3* gene. Results showed that the full-length *EcUGT88E3* gene was 1 704 bp, with a 75 bp of 5'-UTR, 207 bp of 3'-UTR. The complete open reading frame (ORF) was 1 422 bp, encoding 473 amino acids. Bioinformatics predicted that the encoded protein is a hydrophobic protein with molecular weight of 52.03 ku. The prediction of protein structure indicated that *EcUGT88E3* lacks signal peptide and transmembrane domain, and belongs to a microsomal-targeted protein containing GT1 and GT-B superfamily domains. The recombinant *EcUGT88E3* protein was expressed as inclusion bodies, with a molecular weight consistent with that predicted. The optimal induction conditions for the pET28a-*EcUGT88E3* prokaryotic expression vector in *E. coli* BL21 (DE3) were 27 °C and 0.2 mmol/L IPTG for 4 hours.

Keywords Fuzhuan brick tea; *Eurotium cristatum*; glycosyltransferase; gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

(责任编辑:葛晓霞)