

‘赤霞珠’葡萄果实中儿茶素没食子酰基化转移酶蛋白的纯化与鉴定

钱玉梅^{1,2}, 李红侠¹, 李秀丽¹, 吴 萧¹, 王 晴¹, 陈 焯¹, 高贵珍^{1*}

(¹宿州学院生物与食品工程学院, 安徽宿州 234000; ²安徽农业大学·茶树生物学及资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要:【目的】对参与‘赤霞珠’葡萄果实中催化1-*O*- β -D-没食子酰葡萄糖(1-*O*- β -D-glucogallin, β G)和表儿茶素(Epigallocatechin, EGC)生成表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin-3-gallate, EGCG)相关儿茶素没食子酰基化转移酶(epicatechin: 1-*O*-galloyl- β -D-glucose *O*-galloyltransferase, ECGT)蛋白进行纯化与鉴定。【方法】以安徽萧县葡萄园种植的‘赤霞珠’葡萄果实为材料, 采用丙酮沉淀、硫酸铵分段盐析、亲和柱层析、羟基磷灰石柱层析及Superdex200凝胶过滤色谱方法对ECGT酶蛋白进行分离与纯化, 基于高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)技术测定以上各步纯化后获得的ECGT酶蛋白的比活力, 并采用SDS-PAGE(SDS-Polyacrylamide Gelelectrophoresis, SDS-PAGE)电泳对Superdex200凝胶过滤色谱纯化后获得酶蛋白进一步分离与纯化, 然后基于高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术(HPLC-electrospray ionization mass spectrometry, HPLC-ESI-MS/MS)对目的条带(55 ku, 28 ku)进行鉴定; 另外, 进一步采用定量反转录-聚合酶链式反应(quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术对预测的ECGT酶蛋白相关基因及其上游3个糖苷转移酶基因(glucosyltransferase *GT*_{1,3})果实不同发育时期的表达水平进行研究。【结果】以上蛋白纯化技术均能有效纯化ECGT酶蛋白, 获得的ECGT酶蛋白比活力分别为0.32、3.14、11.78、31.80和88.82 U·mg⁻¹, 纯化倍数分别为9.81、36.81、99.38和277.56倍, 酶活总回收率分别为83.33%、4.64%、0.96%和0.13%。对酶蛋白2条目的条带鉴定结果表明, 丝氨酸羧基转移酶-类酰基转移酶家族中一条酶蛋白(XP_002272116.1)比对的分值均最高。此酶蛋白的相关基因*SCPL*及其上游相关3个基因*GT*_{1,3}表达均与‘赤霞珠’葡萄果实发育呈显著负相关。【结论】‘赤霞珠’葡萄果实存在ECGT酶蛋白, 属于SCPL类酰基转移酶家族, 且可能以基因簇的方式行使其功能。

关键词: ‘赤霞珠’葡萄; SCPL类酰基化转移酶; 纯化与鉴定

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)08-1132-12

Purification and identification of galloyltransferase involved in catechin metabolism in ‘Cabernet Sauvignon’ grape

QIAN Yumei^{1,2}, LI Hongxia¹, LI Xiuli¹, WU Xiao¹, WANG Qing¹, CHEN Ye¹, GAO Guizhen^{1*}

(¹School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, Anhui, China; ²Anhui Agricultural University/State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: 【Objectives】The aim of this paper focuses on identification and purification of the galloyltransferase involved in catalyzing EGC and β G to generate EGCG in ‘Cabernet’ grape, named ECGT. 【Methods】The berries of ‘Cabernet Sauvignon’ grape were picked from the Experimental Grape Garden of Xiao County for identifying ECGT and its gene expression. Firstly, the fine precipitated powder was collected by vacuum filtration based on acetone precipitation, then it was dissolved in Tris-HCl buf-

收稿日期: 2019-07-24 接受日期: 2020-06-06

基金项目: 安徽省自然科学基金(1908085MC100); 安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2017A441); 宿州学院教授(博士)科研启动基金项目(2016jb02; 2016jb06); 宿州学院自然科学重点项目(2017yzd11); 宿州学院科研平台(2017ykf05); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810379040)

作者简介: 钱玉梅, 女, 副教授, 博士, 主要从事植物次生代谢及其调控的研究。Tel: 0557-2871037, E-mail: qianym306@126.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: gaogz.usz@163.com

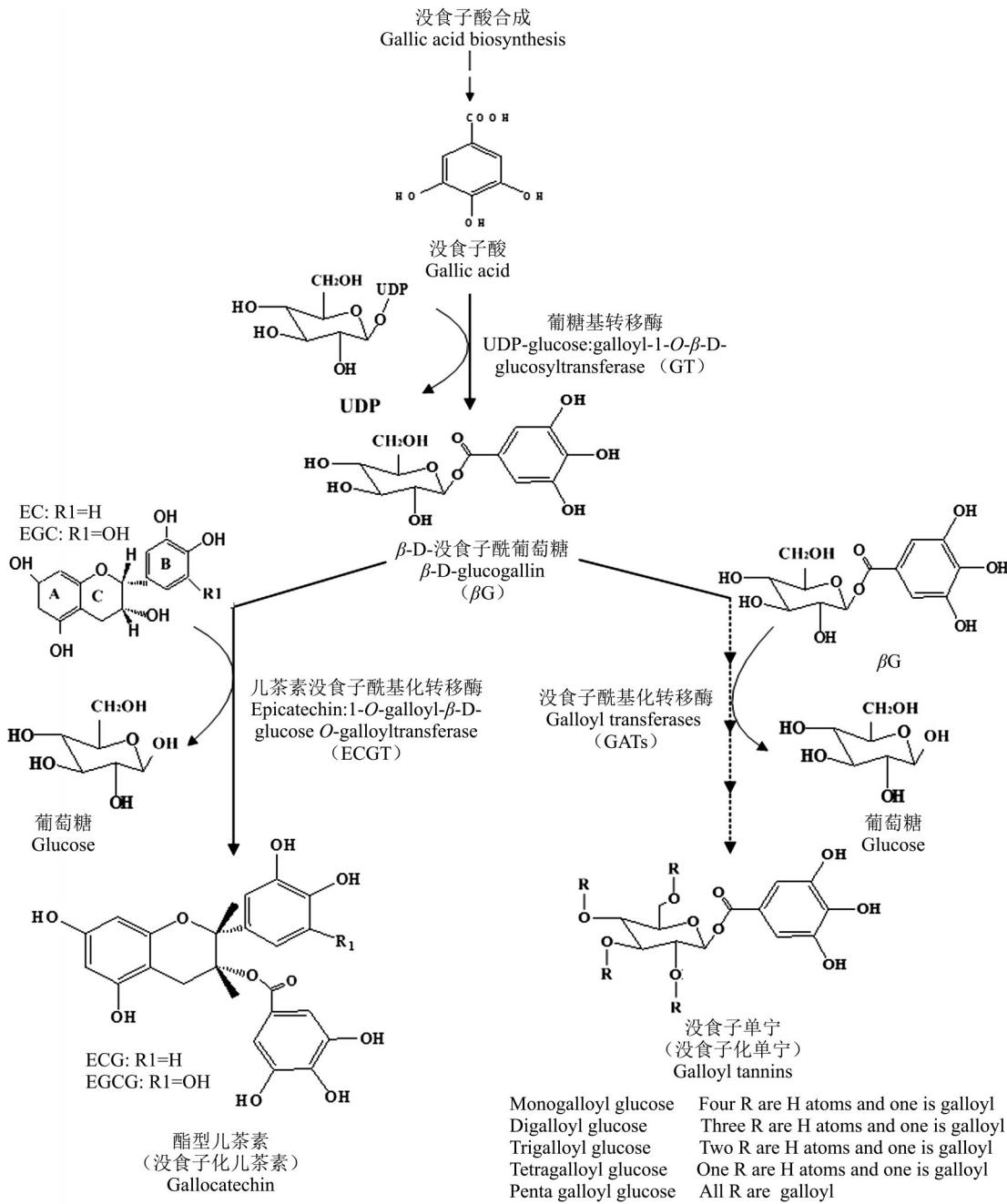
fer for ECGT crude enzyme extraction after centrifuging at $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ for 15 min at $4\ ^\circ\text{C}$; ECGT protein was then purified by ammonium sulfate fraction, affinity column chromatography, hydroxyapatite chromatography, and Superdex 200 gel filtration chromatography based on its enzyme activity analyzed by HPLC. Secondly, the protein strips (55 ku, 28 ku) were achieved by SDS-Polyacrylamide Gelelectrophoresis (SDS-PAGE) and identified by HPLC-ESI-MS/MS, and subsequently, the functional annotations of proteins were conducted by Mascot search engine (Matrix Science, London, UK; version 2.3.02) and Blast2GO program against the database of NR (the non-redundant protein database), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) and COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Thirdly, qRT-PCR was used to detect the expression level of genes including *ECGT* and *3 VvGT₁₋₃* in fruits at different developmental stages.【Results】The specific activity of ECGT in the crude enzyme extraction was $0.32\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, and compared with crude enzymes, the specific activity was 3.14, 11.78, 31.80 and $88.82\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively, via ammonium sulfate precipitation, ConA-affinity chromatography, hydroxyapatite chromatography and a Superdex 200 column. The purification-folds were 9.81-fold, 36.81-fold, 99.38-fold and 277.56-fold; the enzyme activity yields were 83.33%, 4.64%, 0.96% and 0.13%. According protein score, a protein SCPL acyltransferase (XP_002272116.1) was the highest; the expressions of *SCPL* and *3 GT₁₋₃* were all negatively correlated with fruit development.【Conclusion】The ECGT activity was detected in ‘Cabernet Sauvignon’ grape, and its gene belonged to *SCPL* family. In addition, its function may be performed as gene cluster.

Key words: ‘Cabernet Sauvignon’ grape; *SCPL* acyltransferases; Purification and identification

葡萄和葡萄酒中含有丰富的次生物质,主要包括黄烷-3-醇单体及它们的聚合物原花色素(proanthocyanidins, PAs, 又称缩合单宁)、水解单宁、酚酸、花色素及其苷类和黄酮醇等多酚类化合物^[1-2]。这些多酚类物质与葡萄酒的感官特征如色泽、口感和味感特征及其贮藏稳定性密切相关^[3-4],且赋予了葡萄和葡萄酒预防心血管疾病和抗癌等多种生物活性^[5-7]。大量研究表明植物次生代谢产物合成途径常发生酰基化、糖苷化、羟基化和甲基化等衍生化修饰,这些衍生反应,不仅改变酚类化合物的生理活性、极性和稳定性,另外还能降低或去除内源和外源物质的毒性,提高植物的抗性^[8-9]。同样,在葡萄80多种酚类物质中也存在没食子酰基化儿茶素(酯型儿茶素)、没食子酰基化葡萄糖(没食子单宁)、糖苷化黄酮醇和没食子酰基化酚酸等衍生物^[10]。酯型儿茶素主要以单体和聚合体两种状态存在,其单体主要在果实发育的早期积累,然而在葡萄果实发育后期,这些单体多以PAs积累在果实的种子和果皮中;没食子单宁是没食子与葡萄糖生成的一类多没食子酰基化葡萄糖,与鞣花单宁共同构成植物水解单宁家族,此类物质与PAs共同增加了葡萄果实和葡萄酒的收敛性及涩味^[11-13]。

植物多酚没食子酰基化修饰具有类似的生化过程(图1)。大量研究表明,没食子单宁形成是连续的没食子化过程,首先 β -D-葡萄糖由葡糖基转移酶(UDP-glucosyltransferases, GTF)催化形成单没食子酰基葡萄糖即 β G,然后 β G由没食子酰基化转移酶(galloyl transferases, GATs)催化形成1,6-没食子酰基葡萄糖、1,2,6-没食子酰基葡萄糖等一系列多没食子酰基化葡萄糖,其中 β G是没食子的酰基供体^[14-15]。催化有关没食子单宁形成的GATs酶蛋白最早由Gross^[16-17]从橡树叶中发现,并有效地纯化出来,随后又对漆树^[18]、大花蔷薇^[19]的没食子单宁合成途径进行了深入的研究,但此酶相关基因一直未见报道。

同样, β G也可由ECGT催化儿茶素形成酯型儿茶素,有关ECGT酶蛋白最早在茶叶中发现,通过酶蛋白纯化手段对此酶蛋白进行有效纯化,并预测此酶蛋白属于SCPL家族^[20]。有关SCPL基因参与多酚物质没食子酰基化最早由IKEGAMI和AKAGI等关注,此基因表达与柿果实PAs积累呈正相关^[21-22]。随后,TERRIER和CARRIER等预测葡萄SCPL基因可能也具有催化PAs前体即酯型儿茶素合成的功能,从而促进了葡萄果实中PAs的积



Source of the picture: <http://vm-trypanocyc.toulouse.inra.fr/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-7448&detail-level=3>.

图 1 酯型儿茶素合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of the galloylated catechins

累^[23-24]。最近 Bontpart 等基于同源进化分析发现, 12 个 *SCPL* 基因可能参与葡萄果实酰基化修饰, 其中 7 个 *SCPL* 基因和 3 个葡萄糖基转移酶相关基因 (*VvGT*) 共同位于第 3 染色体的邻近位置, 这些基因在 *MybPA* 过表达根毛中同时被上调, 推测它们可能以基因簇行使功能^[23,25]。有关 3 个 *VvGT* 功能已经被验证, 能催化没食子糖苷化反应产生 βG^[26-27],

然而葡萄果实中是否存在 ECGT 酶蛋白一直未见报道。笔者以安徽省萧县葡萄种植基地栽培的酿酒葡萄‘赤霞珠’果实为材料, 利用“酶学分析-蛋白质纯化-蛋白质肽链的 HPLC-ESI-MS/MS 分析”策略对参与酿酒葡萄果实中的 ECGT 酶蛋白进行纯化和鉴定, 并进行果实发育相关基因特异性表达研究, 旨在为探讨葡萄多酚没食子酰基化修饰的分子

机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

以安徽萧县酿酒葡萄种植园(东经 116°93', 北纬 34°18')栽培的酿酒葡萄‘赤霞珠’果实为材料,6月25日采摘‘赤霞珠’果实置于-20℃冰箱用以酶蛋白纯化,采摘幼果期(5月25日)、硬核期(6月9日)、膨大期(7月6日)、转色期(7月24日)和成熟期(9月7日)的果实,置于-80℃冰箱用以基因表达特异性的研究。标准品 EGC(编号:E3768)和 EGCG(编号:50299)均购于 Sigma 公司,为色谱纯, β G 由公司(Advanced Technology and Industrial Company, Hong Kong, China)专门合成,纯度 \geq 90%;水不溶性交联聚乙烯吡咯烷酮 PVPP、甲醇、乙酸和乙腈为色谱纯,乙酸乙酯、丙酮、硫酸铵和抗坏血酸等为分析纯,均购于上海国药集团化学试剂有限公司;亲和柱层析(Concanavalin A(ConA) chromatography)、羟基磷灰石柱层析(TYPE I)及 Superdex 200 的填料均购于伯乐公司;植物 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 RT Primer mix 等均购于 TaKaRa 公司。

1.2 缓冲溶液的配制

50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲溶液(pH 5.0):准确称取醋酸钠和醋酸配制 50 mmol·L⁻¹ 的母液,然后混合调 pH 至 5.0。

粗酶提取缓冲液:1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0),0.2 mol·L⁻¹ 硼酸缓冲溶液(pH 7.5)及去离子水按照体积 1:1:2 的比例混匀。

酶活反应缓冲溶液:为 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)。准确称取磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制 0.1 mol·L⁻¹ 母液,然后混合调 pH 至 6.0。

1.3 试验材料的预处理

将置于-20℃的葡萄果实制备成丙酮粉,具体操作参照刘亚军^[28]的方法。

1.4 目的酶蛋白的纯化

1.4.1 粗酶液的制备 取 20 g 丙酮粉,加入 500 mL 粗酶提取缓冲液[含 2 g 不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)和 5 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇]研磨至匀浆,于 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清液即为粗酶液。预留 0.5 mL 样品置于-20℃冰箱中储存,用 1.5 mL 的反应体系进行 ECGT 酶活反应。

1.4.2 硫酸铵分级沉淀纯化目的酶蛋白 盐析法为常用的蛋白分离和纯化技术,其中 (NH₄)₂SO₄ 是应用较为广泛的中性盐。采用 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀技术对粗酶液中 ECGT 酶蛋白进行纯化。具体操作如下,依次向粗酶液加入 (NH₄)₂SO₄ 获得 0~20%、20%~40%、40%~60%、60%~80% 和 80%~100% 饱和度的沉淀,分别用 50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲溶液(pH 5.0)将以上沉淀溶解后置于 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液即为 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀纯化获得目的酶液,均预留 0.5 mL 样品置于-20℃冰箱中储存,用 1.5 mL 的反应体系进行 ECGT 酶活性反应。为了提高 ECGT 酶蛋白回收率,收集 30%~70% (NH₄)₂SO₄ 饱和度沉淀,用于 ConA 亲和柱层析纯化 ECGT 酶蛋白。

1.4.3 ConA 亲和柱层析纯化目的酶蛋白 用 50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲液(pH 5.0)将收集获得的 30%~70% 硫酸铵饱和度沉淀溶解,并 0.45 μ m 膜过滤后,滤液加载于亲和柱,收集具有活性目的酶蛋白。预留 0.5 mL 样品置于-20℃冰箱中储存,用 200 μ L 的反应体系进行 ECGT 酶活性反应。

ConA 亲和柱层析条件:参照刘亚军^[28]的方法,稍有改动。亲和柱(ConA-Sepharose 4B chromatography; 10 cm×1.6 cm),流速为 2.0 mL·min⁻¹;流动相 A: 50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲液(pH 5.0)含 0.5 mol·L⁻¹ NaCl,流动相 B: 50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲液(pH 5.0)含 0.5 mol·L⁻¹ α -D-甲基葡萄糖苷;收集 100% B 相洗脱的酶蛋白用于羟基磷灰石柱层析纯化 ECGT 酶蛋白。

1.4.4 羟基磷灰石柱层析纯化目的酶蛋白 将 ConA 亲和柱层析纯化获得酶蛋白溶液用 0.45 μ m 膜过滤后,滤液加载到羟基磷灰石柱上,分别收集 0~30%、30%~50%、50%~70%、70%~100% B 相洗脱的酶蛋白,并预留 0.5 mL 样品置于-20℃冰箱中储存,用 200 μ L 的反应体系进行 ECGT 酶活性反应。

羟基磷灰石柱层析条件:采用高压层析系统,流速为 1.2 mL·min⁻¹;流动相 A: 50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲液(pH 5.0),B 相:用 50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲液(pH 5.0)含 300 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄,再调 pH 至 5.0;用 A 相平衡 5 个柱体积后加载蛋白样品,再用 A 相冲洗 5 个柱体积。为了提高 ECGT 酶蛋白回收率,收集 50%~100% B 相洗脱酶蛋白,用于 Superdex 200 凝胶柱层析纯化 ECGT 酶蛋白。预留 0.5 mL 样品置于-20℃冰箱中储存,用 200 μ L

的反应体系进行 ECGT 酶活性反应。

1.4.5 Superdex 200 凝胶柱层析纯化目的酶蛋白 将收集羟基磷灰石柱层析 50%~100% B 相洗脱的酶蛋白进行超滤浓缩后加载到 Superdex 200 凝胶柱。每分钟收集 1 管,进行超滤浓缩后用 10 μL 的反应体系进行 ECGT 酶活性反应。

Superdex 200 凝胶柱层析条件:层析仪为高压层析系统;层析柱为 Superdex 200 凝胶柱(50 cm \times 1.6 cm);流速为 1.0 mL \cdot min $^{-1}$,流动相为 50 mmol \cdot L $^{-1}$ 醋酸缓冲液(pH 5.0)。

1.4.6 SDS-PAGE 电泳分离与纯化目的酶蛋白 采用 SDS-PAGE 对 Superdex 200 凝胶柱层析后获得未检出酶活性蛋白和酶活性最强部分的蛋白变性处理后进行 SDS-PAGE 电泳纯化,并用考马斯亮蓝 R250 进行染色观察分析。SDS-PAGE 电泳操作具体见 Liu 等^[20]的方法。

1.5 HPLC-ESI-MS/MS 酶蛋白鉴定分析

萃取 SDS-PAGE 电泳纯化酶蛋白目的条带置于蛋白质胶酶解溶液并进行 HPLC-ESI-MS/MS 检测,将产生的数据通过 Mascot 鉴定软件在蛋白库搜索与之对应的相关蛋白。此步检测分析由华大基因(BGI, Shenzhen, China)完成,具体操作参照华大基因有关蛋白胶点鉴定说明书。

1.6 目的酶蛋白反应产物的检测方法

1.6.1 ECGT 酶活性反应体系 反应缓冲溶液为 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.0),以下反应体系包括 0.38 mmol \cdot L $^{-1}$ EGC, 0.8 mmol \cdot L $^{-1}$ βG , 4 mmol \cdot L $^{-1}$ 抗坏血酸,粗酶或硫酸铵分级沉淀获得酶蛋白反应为 1.5 mL 体系加入目的酶蛋白若干(蛋白总量有 0.55 mg);Con A 亲和柱层析和羟基磷灰石柱层析获得酶蛋白反应为 200 μL 体系加入目的酶蛋白若干(蛋白总量有 0.074 mg);Superdex200 凝胶柱层析纯化获得酶蛋白为 10 μL 反应体系加入目的酶蛋白若干(蛋白总量有 0.003 7 mg)。由于 βG 标准品残留少量的没食子酸(gallic acid GA),另外,纯化获得酶蛋白含有具有水解 βG 产生 GA 的酶蛋白。因此,本实验 ECGT 酶反应体系底物 βG 均过量,并以 ECGT 酶反应产物 EGCG 生成量判断酶活性。

1.6.2 ECGT 酶活性反应的条件及其产物的提取 将 1.5 mL 和 200 μL 反应体系混匀,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅,反应 30 min;酶反应产物用 2 倍体积的乙酸乙酯萃取,旋转蒸发去除乙酸乙酯,用 100 μL 色谱甲

醇溶解反应产物,过 0.22 μm 膜后检测;10 μL 反应体系混匀,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅,反应 10 min,用 5 μL 5 mol \cdot L $^{-1}$ HCl 终止反应,过 0.22 μm 膜后直接检测。

1.6.3 ECGT 酶活性反应产物的检测 采用 HPLC 法检测,具体条件参照刘亚军^[28]的方法,洗脱程序稍加改动。洗脱梯度为:0~3 min,流动相 B 相由 1%~10%;3~10 min, B 相 10%~30%;10~20 min, B 相 30%~40%;20~25 min, B 相 40%~100%。

1.7 儿茶素没食子酰基化相关基因表达水平的分析

参照 NCBI 官网(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)登录的 3 个糖苷转移酶基因(*VvGT1-3*)和鉴定 ECGT 酶蛋白相关 SCPL 基因的开放阅读框架(Open Reading Frame ORF)信息,以 *VvEF1 α* (翻译延伸因子基因)作为内参基因^[29],利用 Prime premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物(表 1),对 ECGT 酶蛋白相关 SCPL 及其上游 3 个 *VvGT1-3* 基因在不同发育果实中表达水平进行分析。对不同发育时期‘赤霞珠’果实的总 RNA 提取及 qRT-PCR 检测具体参照 Qian 等^[30]的方法。

表 1 儿茶素没食子酰基化修饰相关基因 qRT-PCR 的引物
Table 1 Primers for qRT-PCR of genes involved in catechin galloylation in grape fruit

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences (5'→3')	基因登录号 GenBank accession
<i>VvEF1α</i>	F: GAACTGGGTGCTTGATAGGC R: AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA	XP_002284924.1
<i>VvGT$_1$</i>	F: TTGAAGGGACACGTGTGAAG R: GAAACAAACAGGTTGCGTGA	gi 363805185
<i>VvGT$_2$</i>	F: ATTTTGATGTAGCGTAAAATAAG R: TGGGTGACAAAAGTAGGGAAA	gi 363805187
<i>VvGT$_3$</i>	F: TGAGTATGGTGCTGGTTTGC R: ACGCTACATCGTACTCCTG	gi 363805189
SCPL	F: GAATCCCCAGAACCAACCCG R: TGCACCTCGACCAATAITTTACA	XP_002272116.1

1.8 相关软件

本实验运用 Chem Draw Ultra7. 0 和 Microsoft Office Visio Professional 2003 作图,并利用 Origin 8.0 软件进行数据处理及方差分析。

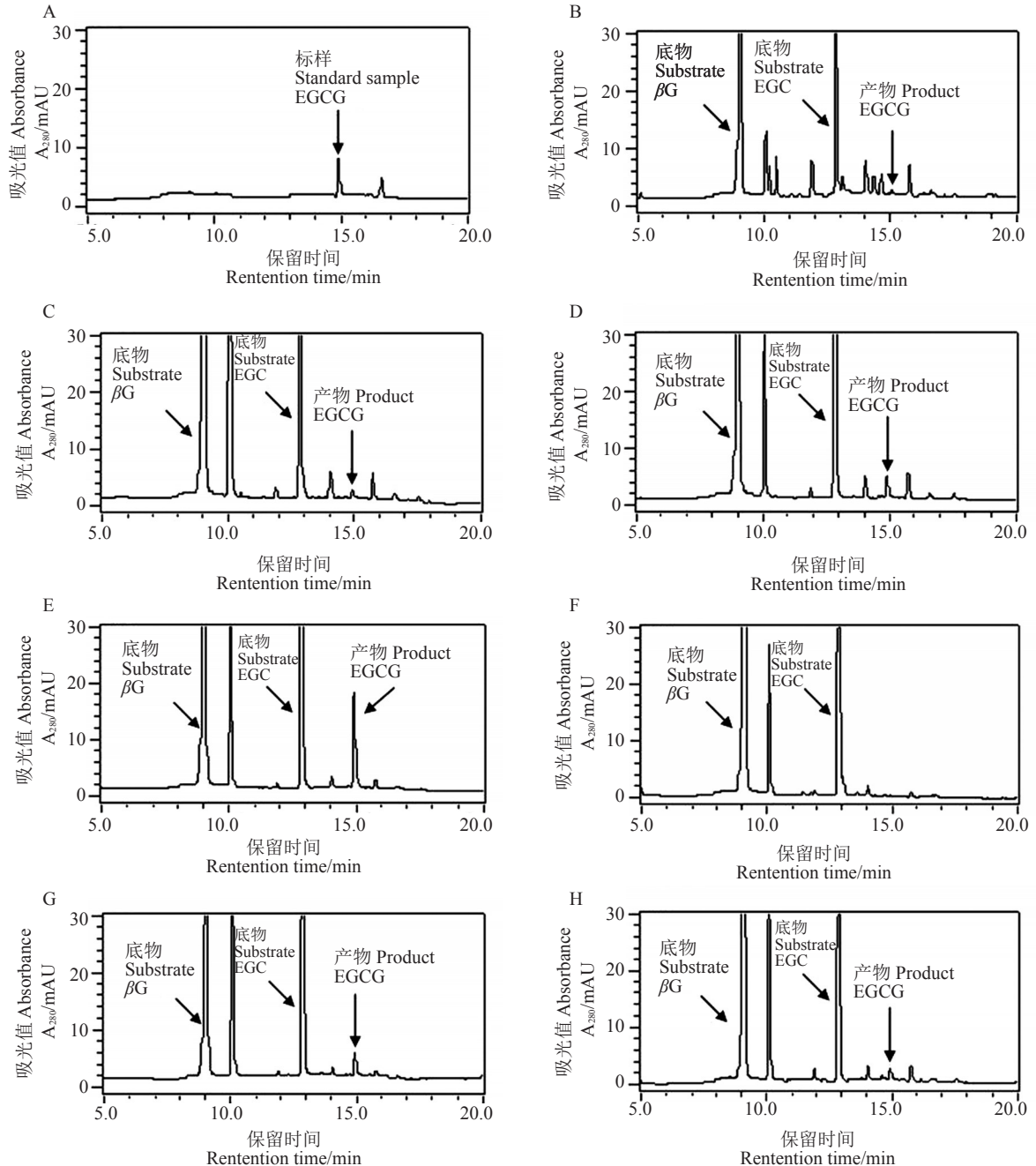
2 结果与分析

2.1 硫酸铵分级沉淀纯化目的酶蛋白

基于 ECGT 酶活性反应产物 EGCG(图 2-A)生成量判断,粗酶液中含有 ECGT 酶蛋白(图 2-B)。以加热灭活的酶蛋白(40%~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱

和度沉淀获得酶蛋白)反应为对照(图 2-F), ECGT 酶蛋白在中性盐(NH₄)₂SO₄ 不同饱和度分级沉淀中均具有活性, 其中 40%~60% (NH₄)₂SO₄ 饱和度沉淀的蛋白中 ECGT 酶活性最强(图 2-E), 20%~40% 以及 60%~80% (NH₄)₂SO₄ 饱和度沉淀的蛋白中 ECGT 酶活性次之(图 2-D, 图 2-G), 0~20% 以及 80%~

100% (NH₄)₂SO₄ 饱和度沉淀的蛋白中 ECGT 酶活性最弱(图 2-C, 图 2-H)。另外从图 2-B 至图 2-H 可见, 在两个底物 βG 和 EGC 之间 10.1 min 左右均有一个明显的峰, 此物质为 GA, 来自于标准品残留少量的 GA 及纯化获得酶蛋白水解 βG 产生的 GA。



A. ECGT 标品; B. 粗酶原液; C. 0~20%硫酸铵饱和度; D. 20%~40%硫酸铵饱和度; E. 40%~60%硫酸铵饱和度; F. 40%~60%硫酸铵饱和度沉淀蛋白加热灭活即死酶对照; G. 60%~80%硫酸铵饱和度; H. 80%~100%硫酸铵饱和度。

A. ECGT standard sample; B. Extraction; C. 0-20% ammonium sulfate fraction; D. 20%-40% ammonium sulfate fraction; E. 40%-60% ammonium sulfate fraction; F. Control treatment with boiled protein of 40%-60% ammonium sulfate fraction; G. 60%-80% ammonium sulfate fraction; H. 80%-100% ammonium sulfate fraction.

图2 硫酸铵分级沉淀纯化后 ECGT 酶活性的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analyses of ECGT enzyme assay extracts with protein after purification *via* ammonium sulfate fractions

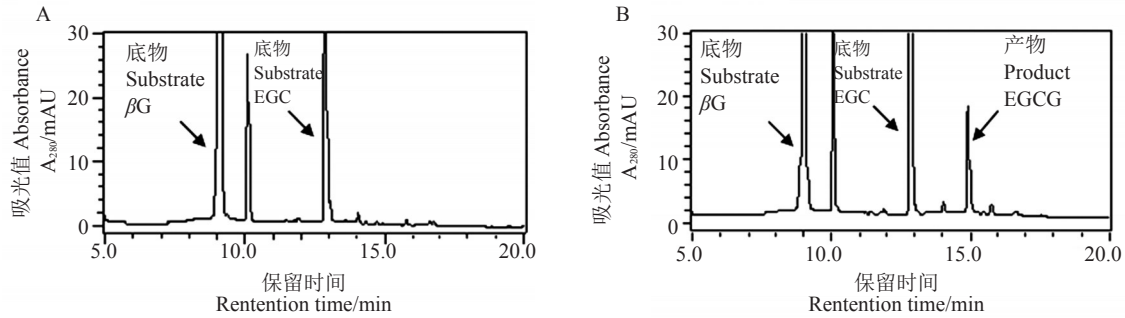
2.2 ConA亲和柱层析纯化目的酶蛋白

以加热灭活的酶蛋白(ConA亲和柱层析纯化获得酶蛋白)反应为对照(图3-A),基于产物EGCG的生成量可判断,亲和层析后获得的ECGT酶活性

进一步增强(图3-B),表明亲和柱层析能有效纯化ECGT酶蛋白。

2.3 羟基磷灰石柱层析纯化目的酶蛋白

由图4可知,以加热灭活的酶蛋白(50%~70%

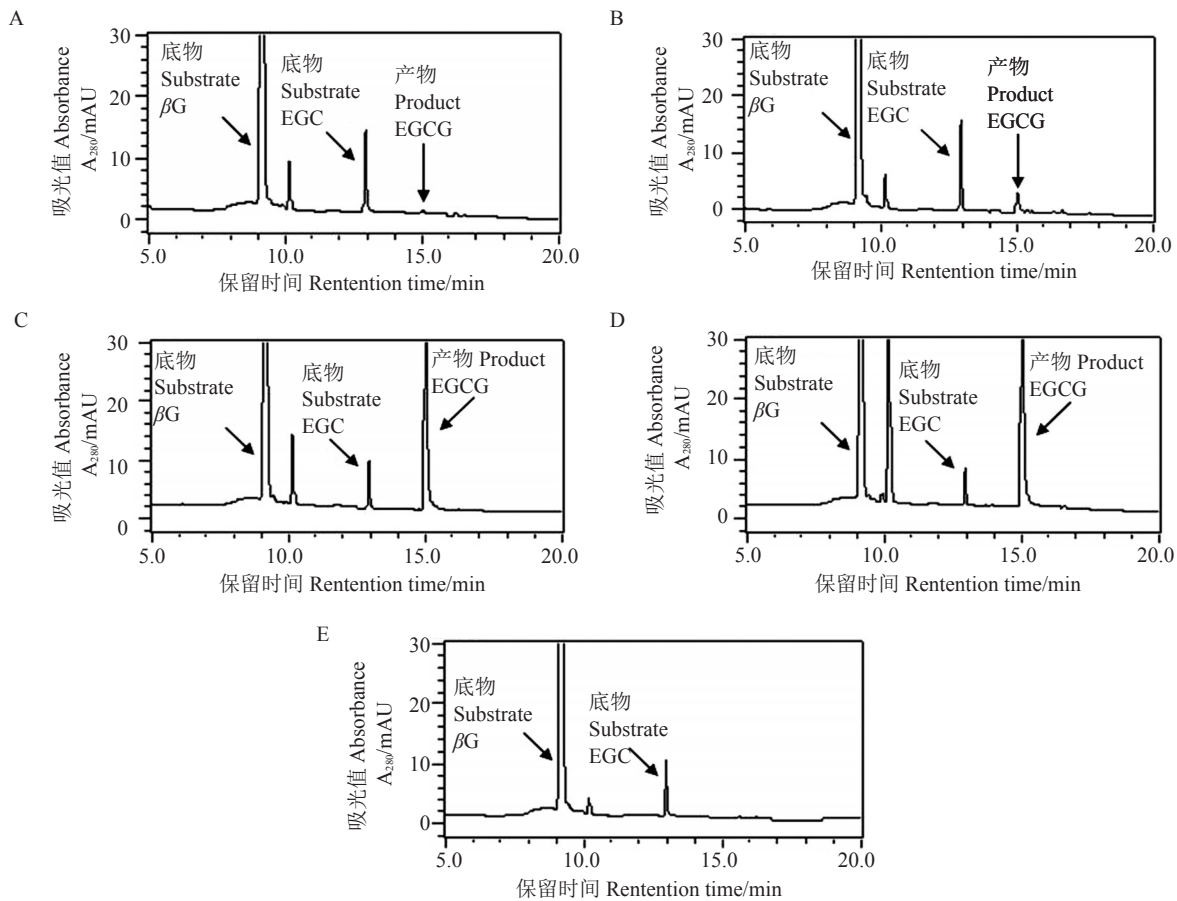


A. 亲和柱层析纯化后 ECGT 死酶对照;B. 亲和柱层析纯化后 ECGT 酶反应。

A. ECGT enzyme assay extracts of control treatment with boiled protein after purification via affinity chromatography; B. ECGT enzyme assay extracts with protein after purification via affinity chromatography.

图3 ConA亲和柱层析纯化后ECGT酶活性的HPLC分析

Fig. 3 HPLC analyses of ECGT enzyme assay extracts with protein after purification via ConA-affinity chromatography



A. 0~30% B相洗脱;B. 30%~50% B相洗脱;C. 50%~70% B相洗脱;D. 70%~100% B相洗脱;E. 50%~70% B相洗脱蛋白 ECGT 死酶对照。

A. 0-30% B phase elution; B. 30%-50% B phase elution; C. 50%-70% B phase elution; D. 70%-100% B phase elution; E. ECGT enzyme assay extracts of control treatment with boiled protein of >50%~70% B phase elution.

图4 羟基磷灰石柱层析纯化后ECGT酶活性的HPLC分析

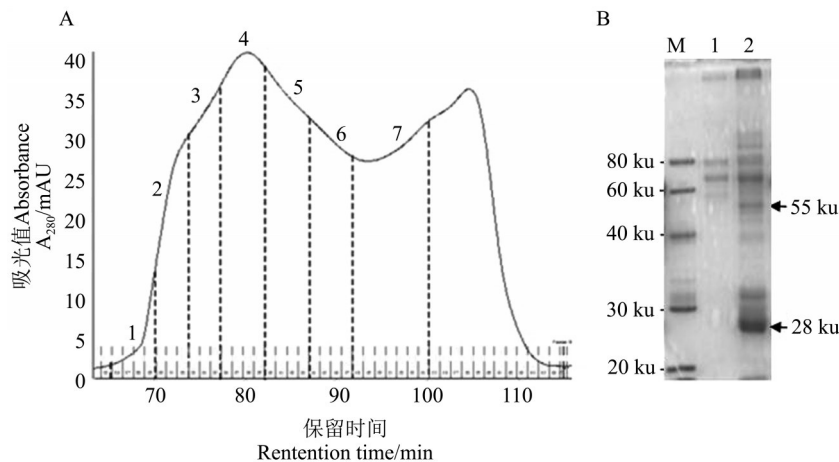
Fig. 4 HPLC analyses of ECGT enzyme assay extracts with protein after purification via Hydroxyapatite chromatography

B相洗脱获纯化获得酶蛋白)反应为对照(图4-E),基于产物的生成量可判断,50%~70%及70%~100%B相洗脱获得 ECGT 酶活性最高(图4-C,图4-D),30%~50%B相洗脱蛋白部分 ECGT 酶活性次之(图4-B),0~30%B相洗脱蛋白部分 ECGT 酶活性最弱(图4-A),表明羟基磷灰石层析柱层析能有效纯化 ECGT 酶蛋白。为了提高 ECGT 酶蛋白回收率,收集50%~100%B相洗脱 ECGT 酶蛋白进行下一步纯化。

2.4 凝胶柱层析和 SDS-PAGE 电泳纯化目的酶蛋白及其鉴定

利用 Superdex200 凝胶柱层析对经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、Con A 亲和及羟基磷灰石两次柱层析纯

化获得蛋白进一步层析纯化,收集不同时间洗脱的蛋白(图5-A),以加热灭活的酶蛋白(第2部分蛋白)反应为对照(图6-H),基于产物的生成量可判断,第1部分蛋白未检出 ECGT 酶活性(图6-A),第2部分蛋白 ECGT 酶活性最强(图6-B),其他部分蛋白 ECGT 酶活性次之(图6-C~G)。将未检出酶活性蛋白(第1部分蛋白)和酶活性最强部分的蛋白(第2部分蛋白)变性处理后进行 SDS-PAGE 电泳纯化(图5-B),推测 ECGT 酶蛋白可能含有2条多肽链(约55 ku和28 ku);进一步对这2条多肽链进行蛋白鉴定分析发现,55 ku和28 ku分析结果比对应分值最高均为一条 SCPL 酰基转移酶带(表2)。



A. Superdex200 凝胶柱层析纯化目的蛋白;B:SDS-PAGE 电泳分析;1. 第 26~29 管;2. 第 30~32 管;3. 第 33~35 管;4. 第 36~39 管;5. 第 40~43 管;6. 第 44~47 管;7. 第 48~54 管;将每部分数管蛋白溶液超滤浓缩后获得 1~7 部分 ECGT 酶蛋白。M. 蛋白标样。

A. Protein after purification via gel filtration chromatography; B. SDS-PAGE analysis; 1-7 fractional proteins after purification via ultrafiltration, 1. 26-29 tube; 2. 30-32 tube; 3. 33-35 tube; 4. 36-39 tube; 5. 40-43 tube; 6. 44-47 tube; 7. 48-54 tube. M. Protein markers.

图5 凝胶柱层析和 SDS-PAGE 电泳纯化 ECGT 酶蛋白及其 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定分析

Fig. 5 Proteins from SDS-PAGE spots identified by LC-MS/MS after purification via gel filtration chromatography

2.5 目的酶蛋白的纯化

以产物 EGCG 的标样制作标准曲线,根据 ECGT 酶蛋白催化生成 EGCG 物质的量(每 min 生成 $1 \mu\text{mol}$ 的 EGCG 为 1 酶活单位,即 $1 \text{ U} = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$),计算每步纯化获得 ECGT 酶蛋白的比活力及纯化倍数等(表3)。由表3可知, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、ConA 亲和柱层析、羟基磷灰石柱层析和 Superdex200 凝胶柱层析均能有效分离和纯化 ECGT 酶蛋白,总纯化倍数为 277.56 倍;令人遗憾的是酶活性回收率很低,仅为 0.13%。

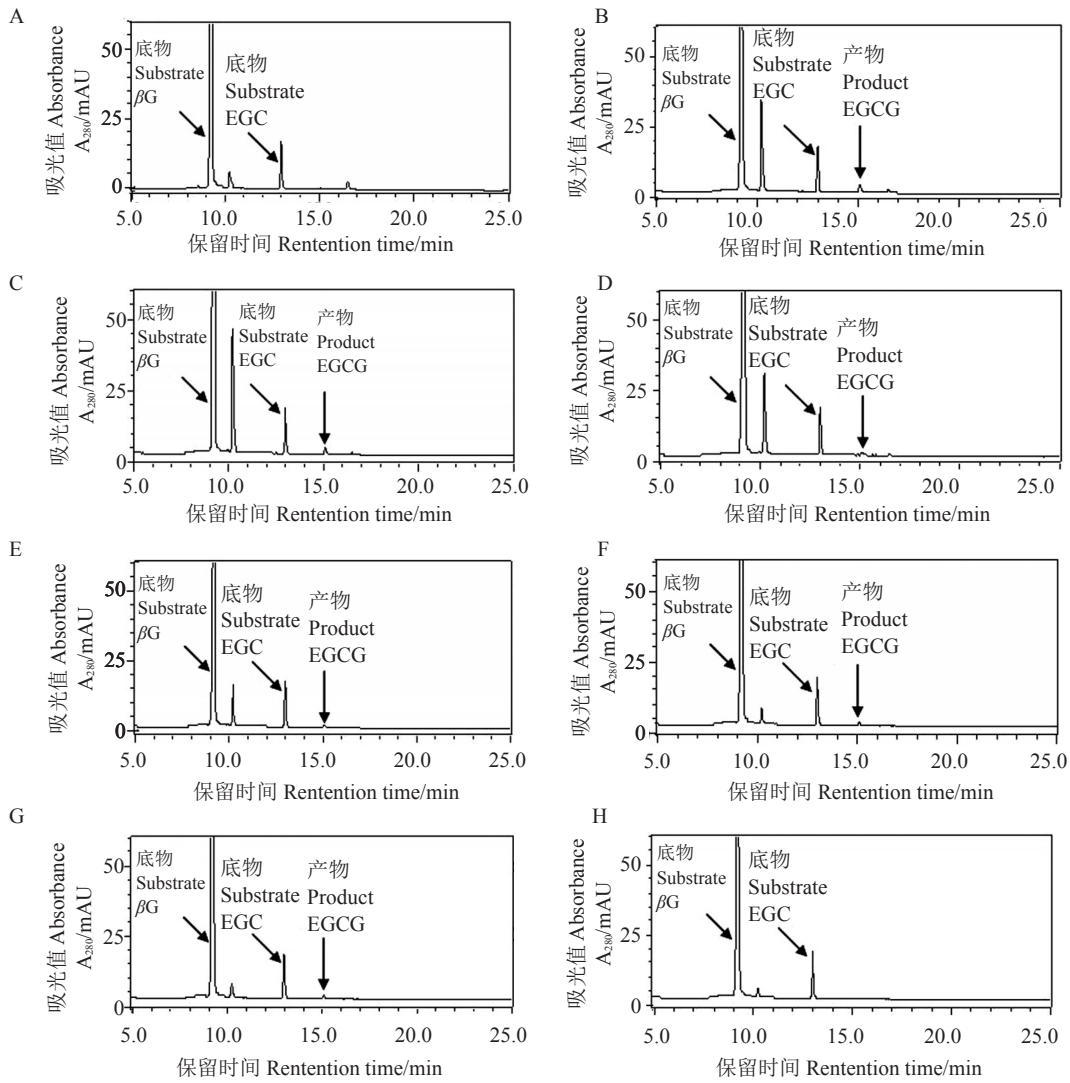
2.6 儿茶素没食子酰基化相关基因表达水平

以果实成熟期为对照,对参与儿茶素没食子酰基化相关基因表达果实发育特异性进行研究发

现,3个 GT 基因及预测 SCPL 基因的表达与果实发育进程均呈负相关;4个基因在果实发育前期(幼果期和硬核期)的表达量均高于8倍;其果实发育至膨大期的表达量急剧下降,与其在果实成熟期的表达量无差异(图7)。

3 讨论

随着人们生活水平的提高,对葡萄酒的需求量及其品质要求也越来越高。作为葡萄酒酿造的原材料,酿酒葡萄果实中次生代谢物质多酚含量及其组分决定了葡萄酒独特的色泽、口感和味感及抗氧化生理活性,如花青苷赋予红葡萄酒色泽、儿茶素增加葡萄酒收敛性、酚酸化合物参与葡萄酒抗氧化



A~G. 第 1~7 部分 ECGT 酶蛋白反应;H. 第 2 部分 ECGT 死酶对照。

A-G. HPLC analyses of ECGT enzyme assay extracts with 1-7 proteins; H. HPLC analyses of ECGT enzyme assay extracts with the 2 fractional boiled proteins.

图 6 凝胶柱层析纯化后 ECGT 酶活性的 HPLC 分析

Fig. 6 HPLC analyses of ECGT enzyme assay extracts with protein after purification via gel filtration chromatography

表 2 ECGT 酶蛋白胶条 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定

Table 2 The protein strips from SDS-PAGE identified by HPLC-ESI-MS/MS

蛋白胶条 Protein strips/ku	组号 Group ID	蛋白登录号 Protein ID	预测蛋白描述 Description of predicted protein	蛋白得分 Protein score
55	1	gi 225429209 ref XP_002272116.1	Serine carboxypeptidase-like	14 948.20
	2	gi 359493576 ref XP_003634629.1	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like	5 992.85
	3	gi 359478691 ref XP_002285084.2	Beta-galactosidase 8-like	2 773.59
28	1	gi 225429209 ref XP_002272116.1	PREDICTED: serine carboxypeptidase-like	12 447.98
	2	gi 225466093 ref XP_002265534.1	Beta-fructofuranosidase soluble isoenzyme I-like	5 799.39
	3	gi 359487782 ref XP_002280966.2	Basic 7S globulin-like	3 649.81

表3 葡萄果实 ECGT 的纯化
Table 3 Purification of ECGT from grape fruit

纯化步骤 Purification steps	总蛋白 Total protein/mg	总酶活 Total activity/U	比活力 Specific activity/ (U·mg ⁻¹)	酶活回收率 Enzyme activity yield/%	纯化倍数 Purification fold
粗酶 Extraction	51 871.00±2114.73	16 598.72±432.69	0.32±0.01		
30%~70% 硫酸铵沉淀 30%~70% ammonium sulfate fraction	4 411.00±167.38	13 831.34±319.71	3.14±0.06	83.33±0.30	9.81±0.00
Con A 亲和柱层析 ConA-sepharose	65.38±2.49	770.14±23.28	11.78±0.11	4.64±0.02	36.81±0.31
羟基磷灰石柱层析 Hydroxyapatite chromatography	5.03±0.17	159.97±3.26	31.80±0.54	0.96±0.01	99.38±0.12
Superdex200凝胶过滤色谱 Superdex200 chromatography	0.24±0.01	21.32±0.25	88.82±2.30	0.13±0.00	277.56±2.19

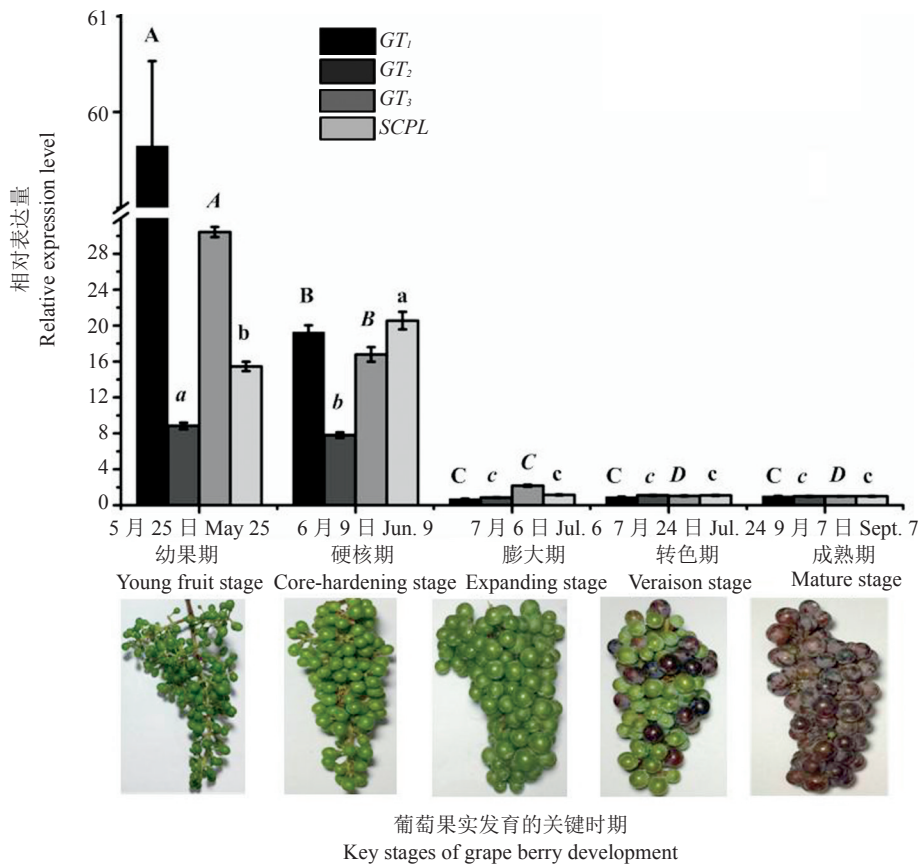


图7 参与儿茶素没食子酰基化相关基因表达果实发育的特异性

Fig. 7 Specific expressions of genes involved in catechin galacyltransferase with grape fruit development

性等^[11,31-33],而这些物质多以酰基化修饰存在于葡萄果实中^[25]。有研究报道,BAHD 酰基转移酶(BAHD acyltransferases)和 SCPL 酰基转移酶均能参与植物多酚物质酰基化修饰,前者利用辅酶 A (coenzyme A)作为酰基载体,而后者用酰基活化葡萄糖(glucoses)作为酰基载体^[34]。

有关 SCPL 基因行使酰基化功能最早在番茄上被发现,并利用酵母异源表达体系证实此基因的功能^[35]。随后又在拟南芥等植物中锁定 SCPL 基因具

有酰基转移酶功能^[36-38]。Ikegami 等^[21]推测柿和葡萄果实中 2 个 SCPL 基因可能具有 ECGT 酶蛋白的功能,催化儿茶素合成酯型儿茶素,从而促进 PAs 的积累,但这 2 个基因是否存在这些果实中,并具有 ECGT 酶蛋白的功能未得到证实^[22,25]。本实验通过对酿酒葡萄‘赤霞珠’果实中酯型儿茶素合成相关 ECGT 酶蛋白进行有效纯化,证实酿酒葡萄果实确实存在 ECGT 酶蛋白,并鉴定此酶可能属于 SCPL 家族,同 Liu 等^[20]以茶树叶片为材料的研究结果一

致。本实验用纯化后的葡萄 ECGT 酶蛋白并不能催化没食子单宁的合成,有关葡萄果实中催化没食子单宁等其他没食子多酚物质合成酶蛋白还需要进一步研究。

另外,基因往往成簇参与植物次生物质合成,如燕麦根皂苷(avenacin)合成基因簇包含 3 个 SC-PL 酰基转移酶、1 个腺苷蛋氨酸依赖的甲基转移酶和 1 个 UDPG 依赖的糖基转移酶相关基因,分别涉及燕麦根皂苷的酰基化、甲基化和糖苷化,这也是最早被证实 SCPL 以基因簇行使其功能^[39-40]。Bontpart 等^[25]预测葡萄 SCPL 基因可能也以基因簇行使其功能。本实验进一步对鉴定酯型儿茶素合成相关 SCPL 及其上游 3 个 GT 基因在不同发育果实中表达进行研究发现,随着果实发育进程,这些基因表达均显著下降,与 BONTPART 等研究结果一致^[25],但预测的 SCPL 基因是否具有 ECGT 酶功能及其是否以基因簇行使其功能还有待进一步确定。

参考文献 References:

- [1] 李婉平,吕晓彤,李若兰,鞠延仑,马娜娜,方玉林. 新疆赤霞珠葡萄皮渣中多酚类物质质量分数及其复合抗氧化剂研究[J]. 西北农业学报,2018,27(2):228-237.
LI Wanping, LÜ Xiaotong, LI Ruolan, JU Yanlun, MA Nana, FANG Yulin. Study on phenolics mass fraction and compound antioxidants of Cabernet Sauvignon grape residue[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis sinica, 2018, 27(2):228-237.
- [2] SANDHU A K, GU L W. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSn[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(8):4681-4692.
- [3] 任国慧,陶然,王晨,孙欣,房经贵. 葡萄浆果着色与 *UFGT* 和 *MYBA* 基因表达量的关系研究[J]. 南京农业大学学报,2013, 36(4):30-36.
REN Guohui, TAO Ran, WANG Chen, SUN Xin, FANG Jingui. The resaerch of the relationship between coloring and *UFGT* and *MYBA* gene expression level of the grape berry[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(4):30-36.
- [4] LI L X, SUN B S. Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(4):563-579.
- [5] DRAIJER R, GRAAF Y, SLETTENAAR M, GROOT E, WRIGHT C I. Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects[J]. Nutrients, 2015, 7(5):3138-3153.
- [6] CHUANG C C, MCINTOSH M K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases[J]. Annual Review of Nutrition, 2011, 31(1):155-176.
- [7] ZURINE R P, TEISSEDRE P L. Grape polyphenols' effects on human cardiovascular diseases and diabetes[J]. Molecules, 2017, 22(1):1-19.
- [8] WANG J, HOU B K. Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites[J]. Frontiers of Biology in China, 2009, 4(1):39-46.
- [9] 李路宁. 蓝莓花青素的没食子酰化及其活性研究[D]. 北京:北京林业大学,2014.
LI Luning. Acylation reaction of blueberry anthocyanins with gallic acid and its activity research[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.
- [10] OBREQUE-SLIER E, PENA-NEIRA A, LOPEZ-SOLIS R, ZAMORA-MARIN F, RICARDO-DA S J M, LAUREANO O. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(6):3591-3599.
- [11] VIDAL S, FRANCIS L, GUYOT S, MAMET S, KWIATKOWSKI M, GAWEL R, CHEYNIER V, WATERSE J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83(6):564-573.
- [12] CADOT Y, MIÑANA-CASTELLÓ M T, CHEVALIER M. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Franc during fruit development[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(24):9206-9215.
- [13] LI S Y, DUAN C Q. Astringency, bitterness and color changes in dry red wines before and during oak barrel aging: An updated phenolic perspective review[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2019, 59(12):1840-1867.
- [14] NIEMETZ R, GROSS G G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis[J]. Phytochemistry, 2005, 66(17): 2001-2011.
- [15] GRUNDHOFER P, NIEMETZ R, SCHILLING G, GROSS G G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins[J]. Phytochemistry, 2001, 57(6):915-927.
- [16] GROSS G G. Synthesis of β -glucogallin from UDP-glucose and gallic acid by an enzyme preparation from oak leaves[J]. FEBS Letters, 1982, 148(1):67-70.
- [17] GROSS G G. Partial purification and properties of UDP glucose: vanillate 1-O-glucosyl transferase from oak leaves[J]. Phytochemistry, 1983, 22(10):2179-2182.
- [18] NIEMETZ R, GROSS G G. Gallotannin biosynthesis: Purification of beta-glucogallin: 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl -beta-D-glucose galloyltransferase from sumac leaves[J]. Phytochemistry, 1998, 49(2):327-332.
- [19] NIEMETZ R, GROSS G G. Oxidation of pentagalloylglucose to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves[J]. Phytochemistry, 2003, 62(3):301-306.

- [20] LIU Y J, GAO L P, LIU L, YANG Q, LU Z W, NIE Z Y, WANG Y S, XIA T. Purification and characterization of a novel galloyltransferase involved in catechin galloylation in the tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(53):44406-44417.
- [21] IKEGAMI A, EGUCHI S, KITAJIMA A, INOUE K, YONEMORI K. Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit[J]. Plant Science, 2007, 172(5):1037-1047.
- [22] AKAGI T, IKEGAMI A, SUZUKI Y, YOSHIDA J, YAMADA M, SATO A, YONEMORI K. Expression balances of structural genes in shikimate and flavonoid biosynthesis cause a difference in proanthocyanidin accumulation in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit[J]. Planta, 2009, 230(5):899-915.
- [23] TERRIER N, TORREGROSA L, AGEORGES A, VIALET S, VERRIES C, CHEYNIER V, ROMIEU C. Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway [J]. Plant Physiology, 2009, 149(2):1028-1041.
- [24] CARRIER G, HUANG YF, LE CUNFF L, FOUMIER-LEVEL A, VIALET S, SOUQUET J M, CHEYNIER V, TERRIER N, THIS P. Selection of candidate genes for grape proanthocyanidin pathway by an integrative approach[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 72(Complete):87-95.
- [25] BONTPART T, FERRERO M, KHATER F, MARLIN T, VIALET S, VALLVERDU-QUERALT A, PINASSEAU L, AGEORGES A, CHEYNIER V, TERRIER N. Focus on putative serine carboxypeptidase-like acyltransferases in grapevine [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 130:356-366.
- [26] KHATER F, FOURNAND D, VIALET S, MEUDEEC E, CHEYNIER V, TERRIER N. Identification and functional characterization of cDNAs coding for hydroxybenzoate/hydroxycinnamate glucosyltransferases co-expressed with genes related to proanthocyanidin biosynthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(3):1201-1214.
- [27] BONISCH F, FROTSCHER J, STANITZEK S, RUHL E, WUST M, BITZ O, SCHWAB W. Activity-based profiling of a physiologic aglycone library reveals sugar acceptor promiscuity of family 1 UDP-glucosyltransferases from grape[J]. Plant Physiology, 2014, 66(1):23-39.
- [28] 刘亚军. 茶树酯型儿茶素合成途径及酚类物质积累特异性研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2011.
LIU Yajun. Studies on the biosynthesis pathway of galloylated catechins and specific accumulation of phenolic compounds in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2011.
- [29] TERRIER N, GLISSANT D, GRIMPLET J, BARRIEU F, ABBAL P, COUTURE C, AGEORGES A, ATANASSOVA R, LÉON C, RENAUDIN JP, DÉDALDÉCHAMP F, ROMIEU C, DELROT S, HAMDY S. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) [J]. Planta, 2005, 222(5):832-847.
- [30] QIAN Y M, ZHANG S X, YAO S B, XIA J X, LI Y Z, DAI X L, WANG W Z, JIANG X L, LIU Y J, GAO L P, XIA T. Effects of vitro sucrose on quality components of tea plants (*Camellia sinensis*) based on transcriptomic and metabolic analysis[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1):121.
- [31] CHAVARRIA G, SANTOS H P, MANDELLI F, GILMAR A B M, BERGAMASCHI H, CARDO-SO L S. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality [J]. Food, 2007, 1(1):1-22.
- [32] FERRANDINO A, CARRA A, ROLLE L, SCHNEIDER A, SCHUBERT A. Profiling of hydroxycinnamoyl tartrates and acylated anthocyanins in the skin of 34 *Vitis vinifera* genotype[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 69(19):4931-4945.
- [33] ROGGERO J P, COEN S, RAGONNET B. High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1986, 37(1):77-83.
- [34] BONTPART T, CHEYNIER V, AGEORGES A, TERRIER A. BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds[J]. New Phytologist, 2015, 208(3):695-707.
- [35] LI A X, STEFFENS J C. An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglucose is a serine carboxypeptidase-like protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12):6902-6907.
- [36] LEHFELDT C, SHIRLEY A M, MEYER K, RUEGGER M, CUSUMANO J C, VIITANEN P V, STRACK D, CHAPPLE C. Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism[J]. Plant Cell, 2000, 12(8):1295-1307.
- [37] MILKOWSKI C, STRACK D. Serine carboxypeptidase-like acyltransferases[J]. Phytochemistry, 2004, 65(5):517-524.
- [38] WEIER D, MITTASCH J, STRACK D, MILKOWSKI C. The genes BnSCT1 and BnSCT2 from *Brassica napus* encoding the final enzyme of sinapine biosynthesis: molecular characterization and suppression[J]. Planta, 2008, 227(2):375-385.
- [39] OSBOURN A. Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology[J]. Plant Physiology, 2010, 154(2):531-535.
- [40] MUGFORD S T, THOMAS L, RACHEL M, QI X, BAKHT S, HILL L, TSURUSHIMA T, HONKANEN S, ROSSER S J, LOMONOSSOFF G P, OSBOURN A. Modularity of plant metabolic gene clusters: a trio of linked genes that are collectively required for acylation of triterpenes in oat[J]. Plant Cell, 2013, 25(3):1078-1092.