

药西瓜 UDP-糖基转移酶基因的克隆与表达分析

陈蒙¹ 杨铭慧¹ 刘月¹ LEE Sanghyeob^{2*} 刘海峰^{1*}

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002;
2. 世宗大学 自然科学学院, 韩国 首尔 999007)

摘要 为明确药西瓜 UDP-糖基转移酶催化葫芦素形成葫芦素配糖体的表达规律,以药西瓜品种“WM9”叶片为供试材料,采用 RT-PCR 技术克隆药西瓜 UDP-糖基转移酶基因,并对编码蛋白进行分析。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR),以 *ACTIN* 为内参基因,分析获得的 2 个药西瓜 UDP-糖基转移酶基因在不同组织器官中的表达规律。结果表明:克隆得到 2 个 UDP-糖基转移酶基因,分别为 1 546 bp 和 1 559 bp 的 cDNA 全长序列,命名为 *UDP-E1* 和 *UDP-E2*。对扩增获得的序列进行生物学信息分析,确定 *UDP-E1* 基因的完整开放阅读框(ORF)为 1 314 bp,可编码氨基酸 437 个,理论分子量为 49.02 ku,等电点为 5.99,属稳定蛋白,Genbank 登录号 MK576125。*UDP-E2* 基因的 ORF 为 846 bp,可编码氨基酸 281 个,理论分子量为 32.78 ku,等电点为 5.23,属不稳定蛋白,Genbank 登录号 MK576126。这 2 个基因属于糖基转移酶超家族。*UDP-E1* 和 *UDP-E2* 均与香瓜、黄瓜的 UDP-糖基转移酶基因序列相似性最高。在各组织器官中,UDP-糖基转移酶均有表达,且在茎中表达水平最低,叶中表达水平最高。

关键词 药西瓜; 葫芦素; 糖基转移酶; 基因克隆; 实时荧光定量

中图分类号 Q78; S663.03

文章编号 1007-4333(2019)11-0070-08

文献标志码 A

Cloning and expression analysis of UDP-Glycosyl transferase gene from *Citrullus colocynthis* L. Shrad

CHEN Meng¹, YANG Minghui¹, LIU yue¹, LEE Sanghyeob^{2*}, LIU Haifeng^{1*}

(1. Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133002, China;
2. Natural Sciences College, Sejong University, Seoul 999007 South Korea)

Abstract To clarify the expression pattern of cucurbitacin glycoside catalyzed by *Citrullus colocynthis* L. Shrad UDP-glycosyl transferase. The *C. colocynthis* L. Shrad “WM9” variety leaves were used as the test materials. The *C. colocynthis* L. Shrad UDP-glycosyl transferase gene was cloned by RT-PCR and the physicochemical properties of the encoded proteins were analyzed. The expression patterns of two *C. colocynthis* L. Shrad UDP-glycosyl transferase genes in different tissues and organs were investigated by qRT-PCR and *ACTIN* as the internal reference gene. The results showed that: Two UDP-glycosyl transferase genes *UDP-E1* and *UDP-E2* with full-length cDNA sequences of 1 546 bp and 1 559 bp were obtained, named. The results of biological information analyses determined that the complete open reading frame (ORF) of the *UDP-E1* gene is 1 314 bp in length encoding 437 amino acids, and its theoretical molecular weight is 49.02 ku. The isoelectric point was 5.99 and is a stable protein. Genbank accession number is MK576125. The *UDP-E2* gene has an ORF of 846 bp and encodes 281 amino acids with a theoretical molecular weight of 32.78 ku and an isoelectric point of 5.23. It is an unstable protein and Genbank accession number is MK576126. These two genes belong to the glycosyl transferase superfamily. Sequence multiplex alignment and phylogenetic tree analysis showed that the genes *UDP-E1* and *UDP-E2* have the highest similarity to the UDP-glycosyl transferase gene sequences of melon and cucumber. UDP-glycosyl transferase was expressed in all tissues and organs, and the

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 国家自然科学基金(31260067); 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(31511140284)

第一作者: 陈蒙, 硕士研究生, E-mail: 1055284082@qq.com

通讯作者: 刘海峰, 副教授, 主要从事分子遗传育种相关研究, E-mail: Liufeng_1989@163.com

LEE Sanghyeob, 教授, 主要从事植物分子相关研究, E-mail: sanglee@sejong.ac.kr

expression level was the lowest in stems and the highest in leaves. The expression level was the lowest in stems and the highest in leaves.

Keywords *Citrullus colocynthis* (L.) Shrad; cucurbitacin; glycosyl transferase; gene clone; real-time PCR

药西瓜(*Citrullus colocynthis* (L.) Shrad)中的葫芦素,是一类高度氧化的四环三萜类化合物,通常以糖苷的形式存在,糖苷化后使得生物活性增强,对植物生长具有重要作用^[1]。糖苷的数量、类型和位置等因素决定三萜类化合物合成代谢的多样性^[2-3]。在植物生长过程中,葫芦素能够有效抵抗多种害虫,对植物健康生长具有促进作用^[4]。据不完全统计,目前从 30 多个葫芦科植物中分离出的多种葫芦素生物活性差异很大。通过研究药西瓜中苦味葫芦素,为多种药物的开发提供理论基础,对阐明葫芦素生物合成具有重要意义^[5-7]。葫芦素抗炎的生物活性已被证实,不同种类葫芦素抗炎的机理有所不同^[8-10]。大鼠经脂多糖(LPS)诱导干细胞凋亡,通过葫芦素剂量性试验证实该物质能够降低干细胞凋亡数量,达到保肝效果^[11-15]。西瓜中葫芦素 E 的合成基因簇受转录因子 ClBr 和 ClBt 的调控,说明西瓜 UDP-糖基转移酶基因参与西瓜中葫芦素 E 的合成^[16-17]。随着近些年来蛋白组学和转录组学的兴起,Shang 等^[17]对具有苦味的葫芦素调节及合成的过程进行了研究。葫芦素类化合物的多种生物活性具有重要药用价值,但由于从植物体内提取、纯化葫芦素的技术尚不成熟,造成葫芦素的提取效率较低,且葫芦素的分子结构复杂,化学合成难度大,导致获得葫芦素的成本较高。药西瓜属于葫芦科西瓜属中葫芦素含量最高的一类植物,最新研究表明药西瓜苦味主要取决于葫芦素 E 糖苷的含量,而非葫芦素 E 的含量^[17-19]。在近些年的研究中,普遍认为葫芦素对于癌症的治疗及预防有积极的作用^[18-19]。目前,对于影响药西瓜葫芦素合成相关基因的研究鲜有报道。

本研究以药西瓜(*C. colocynthis* L. Shrad)品种“WM9”为试验材料,克隆西瓜 UDP-糖基转移酶基因的 cDNA 序列,并对各组织器官中对该基因表达量进行分析,旨在阐明葫芦素 E 生物合成过程中参与糖苷化的相关基因表达规律,以期为葫芦素 E 的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

药西瓜品种(*C. colocynthis* L. Shrad)“WM9”,

种质资源来自韩国世宗大学植物研究所生物工程系,种植于延边大学农学院实验基地。在药西瓜生长过程中,采摘完整、翠绿和无病虫害的叶片,立即置于液氮冷冻,−80 °C 保存,作为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计

本试验根据前期试验结果将得到的差异表达基因进行拼接,与黄瓜的糖基转移酶基因序列进行比对,以黄瓜的 2 个 UDP-糖基转移酶基因全序列及完整开放阅读框序列作为参考序列,运用 Primer 6.0 软件设计包含已知 ORF 的特异引物,引物序列如下。引物委托上海生工公司合成(表 1)。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

名称 Code	序列 Sequence (5'→3')
E1-1 F	5' TGGCTACAATTATAGACATG3'
E1-1 R	5' GGCTAAGCACAACGAAA3'
E1-2 F	5' TTATCCAGCACAAGGCCATG3'
E1-2 R	5' ATGGAGCAACAAACCTAT3'
E2-1 F	5' ATTTCCATTACATCCCAAGA3'
E2-1 R	5' CTCCTCCACTGTGCTCATC3'
E2-2 F	5' TGGACGAGTTGAGGGCG3'
E2-2 R	5' CATAGTAACAATAGGTGG3'

1.2.2 药西瓜叶片总 RNA 的提取及 cDNA 克隆

取药西瓜叶片,具体参照天根 RNA 提取试剂盒。经 Eppendorf 核酸检测仪检测合格的 RNA,使用 Promega 公司生产的反转录试剂盒,合成 cDNA 的第一条链。对药西瓜不同组织器官取样,分别为种子、萌芽、根、茎、叶和果实,按照相同方法提取各组织器官 RNA 并进行反转录,置于−80 °C 保存备用。利用设计的基因引物进行 PCR 扩增来获得目的基因片段。扩增体系:Ex Taq 0.3 μL,10×E Taq Buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP Mixture 2.5 μL,cDNA 0.2 μL,上下游各引物 0.3 μL,ddH₂O 18.9 μL;扩增程序:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 30 s,60 °C (E1-1)/60 °C (E1-2)/58 °C (E2-1)/59 °C (E2-2)退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,

35个循环,72℃终延伸5min。连接、转化并进行菌液PCR检测,将阳性克隆的菌样邮寄到生工生物有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析工具

运用ProtParam程序预测蛋白质理化性质,网址为:

<http://web.expasy.org/protparam/>

运用NCBI网站的Conserved Domain工具预测蛋白保守区,网址为:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>, ProtScale

运用ProtScale软件分析蛋白亲/疏水性,网址为:

<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>TMHMM

运用TMHMM Server v.2.0程序和TMPRED程序分析跨膜结构,网址为:

https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

运用Signal P4.1 Server软件分析蛋白是否具有信号肽,网址为:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

运用Predict Protein程序预测蛋白二级结构,网址为:

<https://www.predictprotein.org/>

运用SWISS-MODEL程序预测蛋白三级结构,网址为:

<https://www.swissmodel.expasy.org/>

运用DNAMAN软件进行序列多重比对。

运用MEGA5.0软件构建系统发育进化树。

1.2.4 药西瓜UDP-糖基转移酶基因在不同组织中的表达分析

使用Primer 6.0软件,根据已经克隆到的2个UDP-糖基转移酶基因全长序列,设计荧光定量引物。内参基因选用ACTIN(Accession No. AB073011)。设计的引物序列如下:*E1-F*: 5'-TGGGCTTTAGAAGTTGCT-3'; *E1-R*: 5'-TTT-CTGCCTCAAGGTCAT-3'。*E2-F*: 5'-GTGCC-AATGCTTACTTATCC-3'; *E2-R*: 5'-CCTCA-CCTCTTCCCTTTT-3'。从种子、萌芽、根、茎、叶和果实各组织器官的cDNA模板中任选其一,依次稀释1,5,25,125和625倍5个梯度来制备标准曲线,反应设3个重复,反应体系:2×SuperReal

Premix Plus 10 μL、10 μmol/L的正反向引物各0.6 μL、cDNA模版1 μL、50×POX Reference Dye 0.4 μL、RNase-free ddH₂O补至总体积为20 μL;反应程序:95℃预变性15min;95℃变性10s,60℃(*E1*)/58℃(*E2*)退火32s,60℃延伸32s,循环40次。扩增后,对PCR产物进行熔解曲线分析。利用MxPro软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 药西瓜UDP-糖基转移酶基因cDNA的克隆

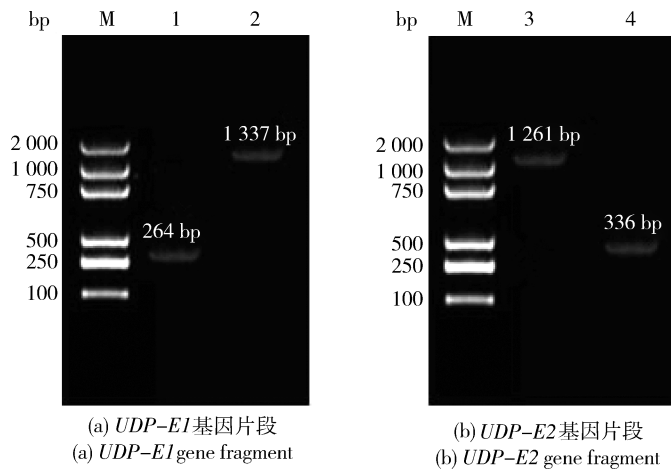
以药西瓜叶片总RNA做反转录得到的cDNA为模板,用特异引物*E1-1 F*、*E1-1 R*、*E1-2 F*、*E1-2 R*扩增出264和1337bp的第一条参考序列的2个基因片段;用药西瓜叶片总RNA做反转录得到的cDNA为模板,用特异引物*E2-1 F*、*E2-1 R*、*E2-2 F*、*E2-2 R*扩增出1261bp和336bp的第二条参考序列的2个基因片段,分别进行电子拼接,得到1546bp和1559bp的基因片段,分别命名为*UDP-E1*和*UDP-E2*(图1)。

2.2 药西瓜UDP-糖基转移酶基因生物信息学分析结果

2.2.1 药西瓜UDP-糖基转移酶基因蛋白质理化性状预测结果

使用ProtParam软件对*UDP-E1*的理化性质进行分析,该基因编码437个氨基酸,分子量49.02ku,PI为5.99。亮氨酸(Leu)含量最高为11.7%,甲硫氨酸(Tra)含量最低为1.1%,正电荷残基(Arg+Lys)47个,负电荷残基(Asp+Glu)53个,脂肪氨基酸指数104.85,不稳定指数32.82,为稳定蛋白。对*UDP-E2*的理化性质进行分析,该基因编码281个氨基酸,分子量32.78ku,PI为5.23。谷氨酸(Glu)含量最高为10.3%,半胱氨酸(Cys)含量最低为1.4%,正电荷残基(Arg+Lys)30个,负电荷残基(Asp+Glu)39个,脂肪氨基酸指数77.62,不稳定指数为52.20,为不稳定蛋白质。在NCBI网站上利用Conserved Domain工具中的CD-search进行功能域分析,结果表明*UDP-E1*、*UDP-E2*均含糖基转移酶GTB型超家族的结构域。

通过PredictProtein程序预测分析蛋白*UDP-E1*和*UDP-E2*的二级结构,*UDP-E1*蛋白中存在37.76%的无规卷曲, α -螺旋和 β -折叠分别占40.50%和21.74%。*UDP-E2*蛋白中存在44.84%的无规卷曲, α -螺旋和 β -折叠分别占35.59%和19.57%。



M, DL2 000, 1, *UDP-E1* 的第一片段; 2, *UDP-E1* 的第二片段; 3, *UDP-E2* 的第一片段; 4, *UDP-E2* 的第二片段。
M, DL2 000, 1, The first SEQ of *UDP-E1*; 2, The second SEQ of *UDP-E1*; 3, The first SEQ of *UDP-E2*; 4, The second SEQ of *UDP-E2*.

图 1 PCR 扩增 UDP-糖基转移酶基因 *UDP-E1* (a) 和 *UDP-E2* (b)

Fig. 1 PCR amplification of UDP-glycosyltransferase genes *UDP-E1* (a) and *UDP-E2* (b)

2.2.2 药西瓜 UDP-糖基转移酶基因编码蛋白质同源性及进化树分析

氨基酸序列多重比较分析可知, *UDP-E1* 与甜瓜 UDP-糖基转移酶基因 (XM_008461160)、黄瓜 UDP-糖基转移酶基因 (XM_004141535) 的序列相似性最高, 分别为 99% 和 96%。 *UDP-E2* 与甜瓜 UDP-糖基转移酶基因 (XM_008460479)、黄瓜 UDP-糖基转移酶基因 (XM_004148655) 的序列相似性最高, 分别为 99% 和 92%。

使用 MEGA 5.0 软件, 对药西瓜 UDP-糖基转移酶与其他植物 UDP-糖基转移酶构建系统进化树, 见图 2, 药西瓜 UDP-糖基转移酶基因均与香瓜、黄瓜的 UDP-糖基转移酶基因的亲缘性最近。

2.3 药西瓜 UDP-糖基转移酶基因在不同组织中的表达分析

图 3 可知, 2 个药西瓜 UDP-糖基转移酶基因在不同组织器官中的变化规律。纵坐标代表相对表达量, 横坐标代表各个不同组织器官。药西瓜 2 个催化葫芦素生物合成葫芦素糖苷的关键酶—UDP-糖基转移酶在 6 种植物组织中都有表达, 均在茎中表达水平最低, 叶中表达水平最高。

3 讨论

前期选取药西瓜、苦西瓜及栽培种西瓜的幼苗、叶子和果实的提取物测量葫芦素 CuB, CuE 和 CuE-Glu, 在这 3 个植物器官中的含量, 均在药西瓜

中体现出了含量优势, 进一步证实了药西瓜的药用研究价值, 在药西瓜幼苗中 CuB、CuE 和 CuE-Glu 3 种葫芦素均存在。叶中仅有 CuE, 果实提取物中仅鉴定出 CuE-Glu 且含量在这 3 个植物器官中含量最高^[20]。药西瓜 2 个催化葫芦素生物合成葫芦素糖苷的关键酶—UDP-糖基转移酶, 均在茎中表达水平最低, 叶中表达水平最高, 可推测药西瓜 *UDP-E1* 与 *UDP-E2* 与 CuE 的合成有关且起到了调控作用。幼苗中 CuB、CuE 和 CuE-Glu 这 3 种葫芦素均存在, 但与药西瓜 *UDP-E1* 与 *UDP-E2* 的含量呈负相关, 推测这 2 个基因在幼苗期可能对葫芦素的合成起到拮抗作用或并未参与葫芦素的合成。而在果实中, 仅鉴定出 CuE-Glu, 这类葫芦素决定药西瓜的苦味, 且 *UDP-E1* 与 *UDP-E2* 这 2 个基因在果实中含量均占优势, 果实中 CuE-Glu 的含量是幼苗中的 47 倍, 恰恰 CuE-Glu 是药西瓜中具有应用价值的物质, 因此, 研究药西瓜 *UDP-E1* 与 *UDP-E2* 对 CuE-Glu 的合成具有调控意义。

李茂菲等^[20]克隆了苦荞的糖基转移酶基因, 并进行活性鉴定, 发现其克隆的 2 个基因具有催化矢车菊素形成其对应糖苷的功能。明确 UDP-糖基转移酶能催化葫芦素形成葫芦素配糖体。任学良等^[21]克隆烟草的糖基转移酶基因, 认为其具有转移糖基的功能。有研究表明, 极端的生长温度更容易引发葫芦素含量的增加, 气温 < 13 °C 或 > 30 °C 时, 黄瓜也会出现苦味; 中耕过程中外力引起伤根易引

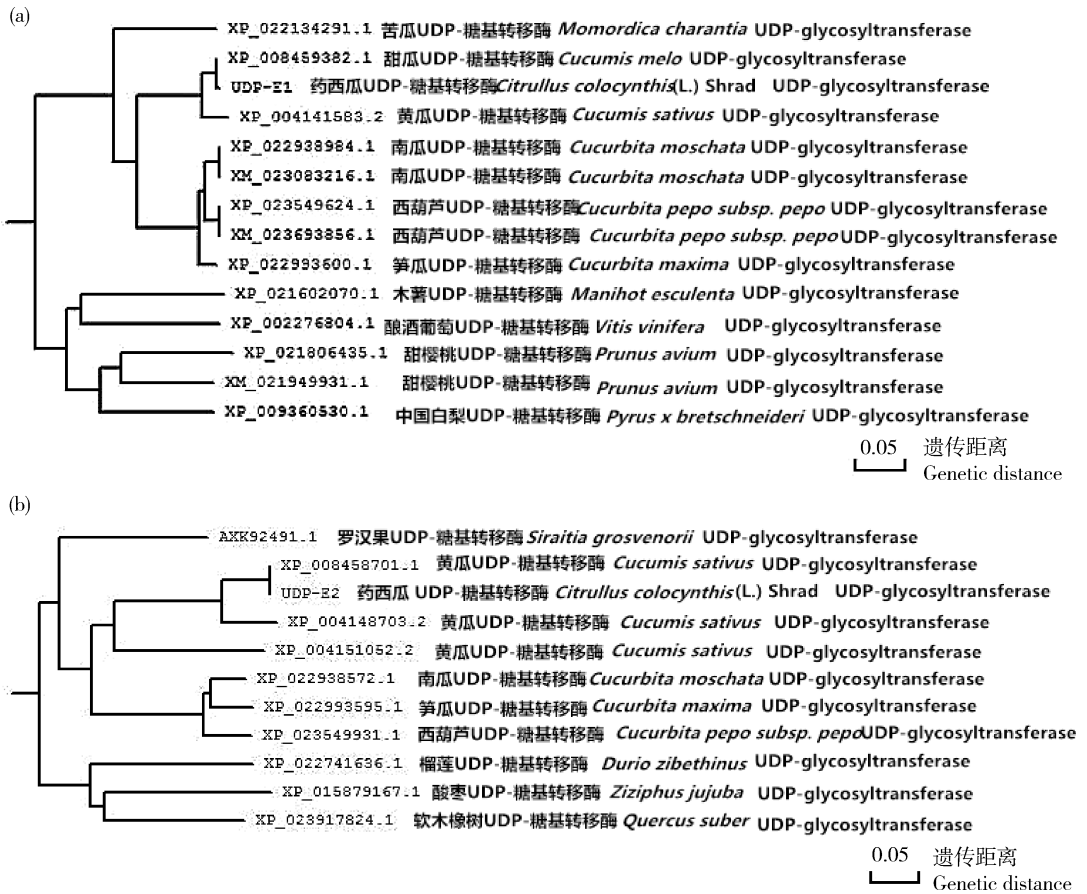


图2 UDP-E1(a)、UDP-E2(b)基因进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of UDP-E1 (a) and UDP-E2 (b) genes

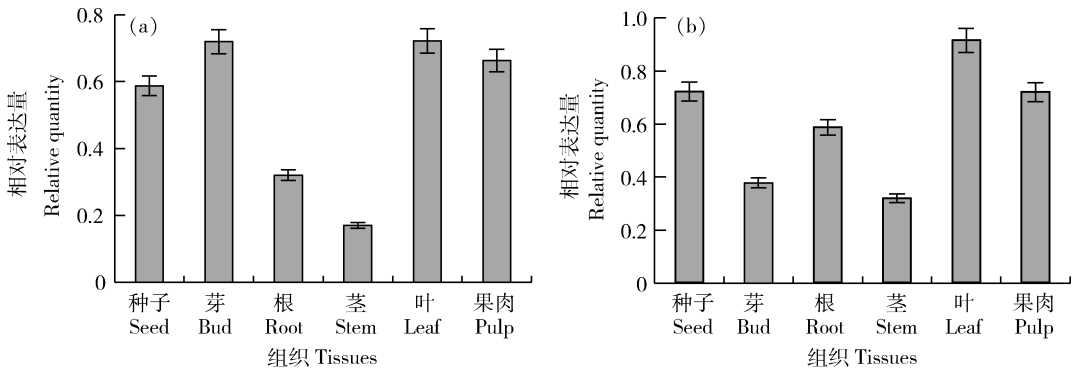


图3 药西瓜不同组织中UDP-E1(a)和UDP-E2(b)基因表达分析

Fig. 3 Analysis of UDP-E1 (a) and UDP-E2 (b) expression in different tissues of *C. colocynthis* L. Shrad

发植物苦味瓜;病虫害的发生会加重苦味。葫芦科蔬果与生俱来携带着“苦味”基因,一旦遭遇生存逆境,就会引起葫芦素含量的增加,人为制造逆境可以作为提高植物体内葫芦素含量的手段^[22-29]。因此推测在自然环境中药西瓜UDP-糖基转移酶会因为外部环境的变化而改变表达含量,且茎和根对感应应答

较敏感,这可能是导致UDP-E1与UDP-E2在茎中表达水平最低的直接原因。植物为在千变万化的外部因素下生存下去,已进化出完全适应其外界环境的能力。这种能力可最大程度上降低环境对植物产生致命的风险。而这种能力取决于植物自身的内环境多种机制的相互调节作用,其中包括细胞的生长

发育及整合代谢信息等^[30]。作物根系中的葫芦素 B 含量多少与抗线虫能力高低成正比^[31-37], 葫芦素 B 含量增加引起植物体内参与代谢重要酶的活性增强^[39], 药西瓜 *UDP-E1* 与 *UDP-E2* 在根系中的表达量相差不多, 植物体内发生各种化学反应达到一种平衡的状态也离不开激素的调节作用, 糖基化作用就是这种调节机制过程中的最为关键的重要环节^[40-42]。药西瓜 2 个 UDP-糖基转移酶催化葫芦素生物合成葫芦素糖苷的反应影响植物抵御逆境的能力, 糖基化使反应中产生的代谢物分子结构更加稳定^[43-44]。植物代谢过程中对外界环境的各种防御过程都与糖基化有着密不可分的联系^[45-48]。

4 结 论

本试验将已得到的 25 个差异表达基因进行拼接, 与黄瓜糖基转移酶基因比对后, 以 2 个黄瓜糖基转移酶基因序列为参考序列, 以葫芦科西瓜属中葫芦素 E 含量最高的药西瓜叶片总 RNA 做反转录的 cDNA 做模板, 获得两段 UDP-糖基转移酶基因片段分别命名为 *UDP-E1* 和 *UDP-E2*。进行生物信息学分析, 确定基因 *UDP-E1*、*UDP-E2* 均与香瓜和黄瓜的 UDP-糖基转移酶基因序列相似性最高、亲缘性最近。对 *UDP-E1* 和 *UDP-E2* 在不同组织中的表达量进行分析, 6 种植物组织中都有表达, 均在茎中表达水平最低, 叶中表达水平最高。为明确药西瓜 UDP-糖基转移酶催化葫芦素形成葫芦素配糖体合成的主要植物器官提供一定的理论基础。

参考文献 References

- [1] 赵千婧, 程瑶, 王佳, 孙新晓, 申晓林, 袁其朋. 糖基转移酶合成相关糖苷类化合物研究进展[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2018, 45(5): 92-99
Zhao Q Q, Chen Y, Wang J, Sun X X, Shen X L, Yuan Q P. Advances in studies on glycosyltransferase synthesis related glycosides[J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology: Natural science edition*, 2018, 45(5): 92-99 (in Chinese)
- [2] 马永硕. 黄瓜中苦味素的生物合成、调控及转运机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017
Ma Y S. Biosynthesis, regulation and transport mechanism of bitterin in cucumber[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese)
- [3] 凌冰, 张茂新, 王玉赞. 葫芦素的生态功能及其应用前景[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 780-793
Ling B, Zhang M X, Wang Y Z. The ecological function of cucurbitacin and its application prospects [J]. *Journal of Ecology*, 2010, 30(3): 780-793 (in Chinese)
- [4] Liby K T, Yore M M, Sporn M B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(5): 357-369
- [5] 吉宏. 葫芦素及其药理学研究[J]. 国外医学中医中药分册, 1996, 18(6): 13-14
Ji H. Cucurbitacin and its pharmacology research[J]. *Foreign Medical Chinese Medicine Traditional Chinese Medicine*, 1996, 18(6): 13-14 (in Chinese)
- [6] 朱靖静, 邹坤. 葫芦素类四环三萜化合物的研究进展[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2009, 31(5): 82-87
Zhu J J, Zou K. Research progress on cucurbitacin tetracyclic triterpene compounds [J]. *Journal of China Three Gorges University: Natural science edition*, 2009, 31(5): 82-87 (in Chinese)
- [7] 周姝婧, 王祥瑞. 双氢葫芦素 B 的抗炎和抗肿瘤作用[J]. 上海医学, 2011, 34(6): 478-482
Zhou S J, Wang X R. Anti-inflammatory and anti-tumor effects of dihydrocucurcin B[J]. *Shanghai Medicine*, 2011, 34(6): 478-482 (in Chinese)
- [8] 贾庆云. 葫芦素 E 通过 PI3K/Akt/NF-KB 信号通路抑制 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞癌因子的分泌[D]. 山东: 山东中医药大学, 2015, 5, 10
Jia Q Y. Cucurbitacin E inhibits TNF- α -induced inflammatory factor secretion in MH7A cells via PI3K/Akt/NF-KB signaling pathway [D]. Shandong: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 5, 10 (in Chinese)
- [9] 刘颖菊, 蒋远明. 葫芦素 B 对大鼠肝细胞凋亡的保护作用[J]. 四川生理科学杂志, 2001, 23(2): 1671-3885
Liu Y J, Jiang Y M. Protective effect of cucurbitacin B on rat hepatocyte apoptosis [J]. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2001, 23(2): 1671-3885 (in Chinese)
- [10] 曹淑桂, 昌友权, 曲红光, 郑丽华, 魏征人, 杨世杰. 葫芦素 B 对过氧化氢诱导的大鼠肝细胞凋亡的抑制作用[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 527-530
Cao S G, Chang Y Q, Qu H G, Zheng L H, Wei Z R, Yang S J. Inhibition of cucurbitacin B on hydrogen peroxide-induced apoptosis of rat hepatocytes [J]. *Food Science*, 2005, 26(9): 527-530 (in Chinese)
- [11] 刘亭彦. 葫芦素 B 治疗喉鳞状细胞癌的实验研究[D]. 北京: 中国医科大学, 2008
Liu T Y. Experimental study of cucurbitacin B in the treatment of laryngeal squamous cell carcinoma [D]. Beijing: China Medical University, 2008 (in Chinese)
- [12] 乔静. 葫芦素 E 对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 炎症反应的抑制作用及其机制研究[D]. 广东: 暨南大学, 2013
Qiao J. Inhibitory effect of cucurbitacin E on lipopolysaccharide-induced inflammatory response of mouse macrophage RAW 264.7 and its mechanism [D]. Guangdong: Jinan University,

- 2013 (in Chinese)
- [13] Balliano G, Caputo O, Viola F, Caputo O, Delprino L, Cattel L. Cyclization of squalene-2, 3-epoxide to 10 α -cucurbita-5, 24-dien-3 β -ol by microsomes from cucurbita maxima seedlings[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(4): 915-921
- [14] 周渊. 葫芦科蔬菜苦味物质的代谢研究-葫芦素 B、C、E 的生物合成[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016
Zhou Y. Metabolism of bitter substances in cucurbitaceae vegetables-biosynthesis of cucurbitacin B, C and E[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese)
- [15] Dang T T T, Facchini P J. Characterization of three o-methyl transferases involved in noscapine biosynthesis in Opium Poppy [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(2): 618-631
- [16] Shang Y, Guo X X, Li W W, Rao W, Chen M L, Mu L N. Cucurbitacin-B inhibits neuroblastoma cell proliferation through up-regulation of PTEN [J]. *European Review for Medical And Pharmacological Sciences*, 2014, 18(21): 3297-3303
- [17] 刘钰莹. 药西瓜蔓中葫芦素 B 提取及其固体脂质纳米粒制备与功能特性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017
Liu Y Y. Extraction of cucurbitacin B from watermelon vine and preparation and functional properties of solid lipid nanoparticles[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [18] 宋飞, 张洁, 丁小俊, 张现法, 孟鹏鹏, 代斌. 维药药西瓜中总黄酮的提取工艺[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2015, 33(2): 149-154
Song F, Zhang J, Ding X J, Zhang X F, Meng P P, Dai B. Extraction process of total flavonoids from watermelon[J]. *Journal of Shihezi University: Natural Science Edition*, 2015, 33(2): 149-154 (in Chinese)
- [19] Kim Y C, Choi D, Zhang C, Hai F L, Sanghyeob L. Profiling cucurbitacins from diverse watermelons (*Citrullus* spp) [J]. *Horticulture Environment & Biotechnology*, 2018, 59(4): 557-566
- [20] 李茂菲, 周婧, 姚攀峰, 赵学荣, 李成磊, 吴琦. 苦莽糖基转移酶基因的克隆及活性鉴定[J]. 西北植物学报, 2016, 36(12): 2391-2397
Li M F, Zhou J, Yao P F, Zhao X R, Li C L, Wu Q. Cloning and activity identification of bitter glycosyl transferase gene[J]. *Northwest Plant Journal*, 2016, 36(12): 2391-2397 (in Chinese)
- [21] 任学良, 李立芹, 许力, 郭玉双, 鲁黎明. 烟草糖基转移酶基因 NtGT3 的克隆与生物信息学分析[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(1): 23-30
Ren X L, Li L Q, Xu L, Guo Y S, Lu L M. Cloning and bioinformatics analysis of tobacco glycosyltransferase gene NtGT3[J]. *Zhejiang Agricultural Journal*, 2017, 29(1): 23-30 (in Chinese)
- [22] 刘景春. 早春大棚黄瓜产生苦味的原因及防治[J]. 农民致富之友, 2000(6): 26
Liu J C. Causes and control of bitterness in cucumber in early spring greenhouse [J]. *Farmers' Wealth-rich Friends*, 2000(6): 26 (in Chinese)
- [23] 张素敏. 黄瓜为啥有苦味? [J]. 农家参谋, 2000(11): 5
Zhang S M. Is cucumber a bitter taste? [J]. *Farm Staff*, 2000(11): 5 (in Chinese)
- [24] 池永顺. 黄瓜苦味产生的原因及解决措施[J]. 农家之友, 2001(10): 14
Chi Y S. Causes and solutions of cucumber bitterness [J]. *Friend of Farmhouse*, 2001(10): 14 (in Chinese)
- [25] 李林章, 马崇坚, 应泉盛, 王毓洪. 瓠瓜苦味栽培生理研究初报 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(16): 98-99
Li L Z, Ma C J, Ying Q S, Wang Y H. Preliminary report on the cultivation physiology of bitter taste of melon [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2007, 13(16): 98-99 (in Chinese)
- [26] 张翠梅. 黄瓜苦味产生的原因及对策[J]. 农民科技培训, 2008(10): 30-31
Zhang C M. Causes and countermeasures of cucumber bitterness [J]. *Farmer Science and Technology Training*, 2008(10): 30-31 (in Chinese)
- [27] 张焯, 邵凤艳, 刘伯春. 温室黄瓜苦味产生原因及解决措施[J]. 农药市场信息, 2015(8): 148-150
Zhang Y, Shao F Y, Liu B C. Causes and solutions of bitterness in greenhouse cucumber [J]. *Pesticide Market Information*, 2015(8): 148-150 (in Chinese)
- [28] 王振伟. 怎样防止黄瓜苦味[J]. 农家参谋, 2012(8): 12
Wang Z W. How to prevent the bitterness of cucumber [J]. *Farm staff*, 2012(8): 12 (in Chinese)
- [29] 吴佩. 发现蔬果的“苦味”秘密[J]. 农药市场信息, 2017(2): 72-73
Wu P. Discovering the Secret of “Bitterness” of Fruits and vegetables [J]. *Pesticide Market Information*, 2017(2): 72-73 (in Chinese)
- [30] Fukuchi M M, Okuhara H Y, Nakao M, Katsumoto Y. Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose: Anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1652-1663
- [31] 凌冰, 向亚林. 葫芦素 B 对美洲斑潜蝇成虫产卵和取食的抑制作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 1(8): 29-32
Ling B, Xiang Y L. Inhibition of Cucurbitacin B on Oviposition and feeding of *Liriomyza sativae* adults [J]. *Natural Product Research and Development*, 2006, 1(8): 29-32 (in Chinese)
- [32] 孙兴华, 周晓榕, 庞保平, 孟庆玖. 南美斑潜蝇为害对黄瓜叶片中蛋白酶抑制剂活性及葫芦素 B 含量的影响[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(1): 169-177
Sun X H, Zhou X Y, Pang B P, Meng Q J. Effects of *Liriomyza huidobrensis* on protease inhibitor activity and cucurbitacin B content in cucumber leaves [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2014, 51(1): 169-177 (in Chinese)

- [33] 叶德友, 钱春桃, 陈劲枫. 酸黄瓜南方根结线虫病抗性与葫芦素 B 含量的关系[J]. 西北植物学报, 2011, 31(9): 1834-1839
Ye D Y, Qian C T, Chen J F. Relationship between resistance to southern root knot nematode disease and cucurbitacin B content in acid cucumber[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2011, 31(9): 1834-1839 (in Chinese)
- [34] 向亚林, 凌冰. 美洲斑潜蝇的寄主选择与苦瓜对其化学防御的研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 21(40): 84-85
Xiang Y L, Ling B. Research on host selection of *Liriomyza sativae* and the chemical defense of bitter melon[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 21(40): 84-85 (in Chinese)
- [35] 雷建军, 袁娅苏. 苦瓜抗虫性研究进展[J]. 中国蔬菜, 2000(1): 54
Lei J J, Yuan Y S. Advances in research on insect resistance of *Momordica Charantia* L[J]. *Chinese Vegetables*, 2000(1): 54 (in Chinese)
- [36] 罗宏. 苦瓜提取物及其抗虫抑菌效果[D]. 湖北: 华中农业大学, 2005
Luo H. The extract of *Momordica charantia* L. and its antibacterial and antibacterial effects [D]. Hubei: Huazhong Agricultural University, 2005 (in Chinese)
- [37] 骆颖, 杨可航. 苦瓜叶提取物及其活性物质防治农业害虫研究进展[J]. 现代农业科技, 2012(22): 107-108
Luo Y, Yang K H. Research progress of momordica leaf extract and its active substances in controlling agricultural pests[J]. *Modern Journal of Agricultural Science and Technology*, 2012(22): 107-108 (in Chinese)
- [38] 田玉安, 梁沛, 高希武. B 型烟粉虱取食对黄瓜中葫芦素 B 的诱导及黄瓜对烟粉虱 GSTs 活性的影响[C]. 生物入侵与生态安全—“第一届全国生物入侵学术研讨会”论文摘要集, 2007
Tian Y A, Liang P, Gao X W. Effects of B-type *Bemisia tabaci* on the induction of cucurbitacin B in cucumber and the activity of cucumber on GSTs of *Bemisia tabaci*[C]. Biological invasion and ecological security—a summary of the papers of the “First National Conference on Biological Invasion”, 2007 (in Chinese)
- [39] Mullen W, Edwards C A, Serafini M, Crozier A. Bioavailability of pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(3): 713-719
- [40] Campbell J, Davies G, Bulone V, Henrissat B. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities [J]. *Biochemical Journal*, 1997, 326(3): 929
- [41] Kunikane S, Nakayama T. Recent advances in plant secondary product glycosyltransferase research[J]. *Seikagaku*, 2008, 80(11): 1033-1038
- [42] Paquette S, Mueller B L, Bak S. On the origin of family IAA plant glycosyltransferases[J]. *Phytochemistry*, 2013, 62(3): 399-413
- [43] Vogt T, Jones P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis; Characterization of a supergene family[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 5(9): 380-386
- [44] Hughes J, Hughes M. Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava *Manihot esculenta* Crantz cotyledons[J]. *Mitochondrial DNA*, 1994, 5(1): 41-49
- [45] Barvkar V T. Phylogenomic analysis of UDP glycosyltransferase 1 multigene family in *Linum usitatissimum* identified genes with varied expression patterns[J]. *Bmc Genomics*, 2012, 13(1): 175-175
- [46] Kim K D, Min Y Y, Jin H S, Yang J K, Kim M Y, Lee S H. Underlying genetic variation in the response of cultivated and wild soybean to enhanced ultraviolet-B radiation[J]. *Euphytica*, 2015, 202(2): 207-217
- [47] Jones P, Vogt T. Glycosylation in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers[J]. *Planta*, 2011, 213(2): 164-174
- [48] Kubo A, Arai Y, Nagashima S, Yoshikawa T. Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 429(2): 198-203

责任编辑: 吕晓梅