CSTR: 32114.14.j.cjb.240614
DOI: 10.13345/j.cjb.240614
Feb. 25, 2025, 41(2): 881-895
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

比利时杜鹃类黄酮 3-*O*-糖基转移酶基因的克隆、原核表达及功能分析

鄢毅铖，吴泽航，姜宇航，胡高源，杨宇杰，谢晓鸿，吴月燕，贾永红*

浙江万里学院 生物与环境学院，浙江 宁波 315100

鄢毅铖, 吴泽航, 姜宇航, 胡高源, 杨宇杰, 谢晓鸿, 吴月燕, 贾永红. 比利时杜鹃类黄酮 3-*O*-糖基转移酶基因的克隆、原核表达及功能分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 881-895.

YAN Yicheng, WU Zehang, JIANG Yuhang, HU Gaoyuan, YANG Yujie, XIE Xiaohong, WU Yueyan, JIA Yonghong. Cloning, prokaryotic expression, and functional validation of flavonoid 3-*O*-glycosyltransferase gene (*Rh3GT*) from *Rhododendron hybridum* Hort[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 881-895.

摘　要：类黄酮 3-*O*-糖基转移酶是植物花青素糖苷化的关键酶。为研究杜鹃花 *3GT* 基因的功能，本研究从红比利时杜鹃中克隆了一个 *3GT* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)命名为 *Rh3GT*，分析、测定并验证了该 ORF 及其编码蛋白的理化性质、表达水平、酶学功能等生物学特性。结果表明，*Rh3GT* 全长 993 bp，编码 330 个氨基酸；编码蛋白为亲水稳定的弱酸性蛋白，隶属糖基转移酶家族(GT-B 型)，PSPG box 结构域中第 44 位为谷氨酰胺(Q)；系统进化分析发现比利时杜鹃 *Rh3GT* 与越橘 *Vc3GT* 和黑果越橘 *Vm3GT* 的亲缘关系最近；*Rh3GT* 在根中几乎不表达，在茎、叶、花中均有表达，且在盛开期花瓣中表达量最高；花瓣瞬时过表达 *Rh3GT* 后发现其总花青苷积累也显著增加；Rh3GT 重组蛋白在大肠杆菌 BL21 中成功表达，并以包涵体形式存在，大小约为 36 kDa，与理论预测值接近；高效液相色谱检测发现，经过变性纯化和稀释复性后的 Rh3GT 重组蛋白可催化矢车菊素和 UDP-葡萄糖合成矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷，表明表达的蛋白具有 3GT 活性。本研究为深入探讨杜鹃花花青苷生物合成分子调控机制提供了基础数据，并为潜在的杜鹃花分子育种提供了理论支持。

关键词：比利时杜鹃；类黄酮 3-*O*-糖基转移酶；表达分析；瞬时过表达；原核表达

资助项目：宁波市科技特派员专项(2022S237)；宁波市花卉竹木科技特派员项目(2020−2025)；宁波市科创甬江 2035 重点研发计划(2024Z271)；浙江省重点研发计划(2021C02053)；宁波市科技创新 2025 现代种业重大专项(2021Z005)；浙江省生物工程一流学科(A 类)学生创新计划(CX2022027)

This work was supported by the Ningbo Science and Technology Commissioner’s Project (2022S237), the Ningbo Flower Bamboo and Wood Science and Technology Commissioner’s Project (2020−2025), the Ningbo Innovation Yongjiang 2035 Key Research and Development Program (2024Z271), the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2021C02053), the Ningbo Science and Technology Innovation 2025 Modern Seed Industry Major Project (2021Z005), and the Zhejiang Province Bioengineering First-class Discipline (Class A) Student Innovation Plan (CX2022027).

*Corresponding author. E-mail: jiayh@zwu.edu.cn

Received: 2024-07-30; Accepted: 2024-10-08; Published online: 2024-10-10

Cloning, prokaryotic expression, and functional validation of flavonoid 3-*O*-glycosyltransferase gene (*Rh3GT*) from *Rhododendron hybridum* Hort

YAN Yicheng, WU Zehang, JIANG Yuhang, HU Gaoyuan, YANG Yujie, XIE Xiaohong, WU Yueyan, JIA Yonghong*

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: Flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (3GT) is a key enzyme in the glucosidation of anthocyanins. To investigate the *3GT* gene in rhododendron, we cloned an open reading frame (ORF) of *3GT* gene (named *Rh3GT*) from *Rhododendron hybridum* Hort (Red cultivar) and then characterized this gene and the deduced protein in terms of the biochemical characteristics, expression level, and enzymatic function. The results showed that *Rh3GT* had a full length of 993 bp and encoded 330 amino acid residues. The deduced protein was hydrophilic, stable, weak acid, belonging to the glycosyltransferase family (GT-B type), with glutamine (Q) at position 44 in the PSPG box. The phylogenetic analysis showed that *Rh3GT* was most closely related to *Vc3GT* from *Vaccinium corymbosum* and *Vm3GT* from *Vaccinium myrtillus*. *Rh3GT* was expressed in the stems, leaves, and flowers and almost not expressed in the roots, with the highest expression level in petals during full blooming stage. Introduction of pCAMBIAL1302-*Rh3GT* into petals significantly up-regulated the expression level of *Rh3GT* and increased the total anthocyanin accumulation. Rh3GT was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 in the form of inclusion bodies with a size of about 36 kDa. The results of HPLC showed that the recombinant Rh3GT after denaturation, purification, and dilution could catalyze the synthesis of cyanidin and UDP-glucose to synthesize cyanidin 3-*O*-glucoside, indicating that the expressed protein had 3GT activity. This study provides basic data for further studying the molecular regulation mechanism of anthocyanin biosynthesis and theoretical support for molecular breeding of rhododendron.

Keywords: *Rhododendron hybridum* Hort; flavonoid 3-*O*-glycosyltransferase (3GT); expression analysis; transient overexpression; prokaryotic expression

对于观赏性植物而言，花色是其最重要的性状之一。花色直接影响植物的观赏性和经济价值，因此花色一直是观赏性植物研究的重点。影响花色的因素分为环境因素和内部因素。环境因素主要包括植株生长环境、光照强度和光质类型，甚至是噪音等[1-2]。内部因素则更加复杂，包括细胞结构[3]、液泡内的 pH 值[4]、色素种类(叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮等)及含量[5]。上述因素中，类黄酮化合物花青素(anthocyanidin)是花色研究的重点，也是花朵呈色的直接原因[6]。常见的花青素主要包括矢车菊素(cyanidin)、芍药素(paeonin)、飞燕草素(delphinin)、天竺葵素(pelargonidin)、锦葵素(malvacin)和矮牵牛素(petunidin)[7]。花青素在植物体内不能稳定存在，会发生碳位取代，经过糖苷化形成稳定性较高的单糖、二糖或多糖

花青苷(anthocyanins)，最后被转运至细胞液泡中，使植物呈现出不同的颜色[8-10]。

类黄酮 3-*O*-糖基转移酶(flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, 3GT)是实现植物花青素糖苷化的关键酶。花青素 C 环上 3-OH 是最常见的糖基化位点，3GT 可将糖基供体转移至花青素的 3-OH，催化生成花青素-3-*O*-糖苷(图 1)。目前研究发现，几乎所有花青苷 C 环上的 3-OH 都存在糖基取代[11]，例如矢车菊素能以 UDP-葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDP-glucose)为糖基供体，通过 3GT 体外催化合成矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷(cyanidin-3-*O*-glucoside)[12-13]。

另外，3GT 还能显著影响花青苷的积累甚至导致花色改变。例如 Sun 等[14]将小苍兰(*Freesia hybrida*)的 *Fh3GT* 在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中过表达，增加了主要花青苷合成结构基因的转录以及花青苷的积累，导致转基因矮牵牛的花从白色转变为粉红色；Chen 等[15]在蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*)中沉默 *PeUFGT3* 导致红色花朵花青苷含量显著降低，从而导致花朵褪色；Sun 等[16]及孙威等[17]从马缨杜鹃(*Rhododendron delavayi*)中克隆了 *Rd3GT1* 和 *Rd3GT6*，并将其在烟草(*Nicotiana tabacum*)中过表达，促进了烟草花青素水平的提高；另外，*Rd3GT1* 在矮牵牛中过表达也能改变矮牵牛的花色。

比利时杜鹃是重要的园艺花卉植物，其花瓣颜色绚丽多彩，具有很高的观赏价值和经济价值[18]。然而目前尚未见关于比利时杜鹃中 *3GT* 的克隆及其对花青苷合成的影响的相关研究。本研究以红比利时杜鹃为材料，利用比利时杜鹃花全长转录本筛选到 *Rh3GT* 的基因序列信息，设计引物克隆得到 *Rh3GT* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)全长；研究其编码蛋白的理化性质、保守结构域、结构等特性；利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)分析该基因在不同组织中的表达情况；通过瞬时过表达分析其对花青苷生物合成的影响；通过原核表达分析该基因的蛋白表达情况；通过 HPLC 验证其体外酶活功能，以期为深入探讨 *Rh3GT* 的功能提供数据基础，并为杜鹃花色分子植物育种提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所用材料为 5 年生健康杜鹃花植株盛开期花瓣、根、茎、叶(图 2)，由浙江万里学院北仑杜鹃合作基地提供(E121°27′40″，N29°58′48″)。采后立即放入液氮中冷冻带回，随后放入–80 ℃条件下储存备用。每个样品均设置 3 个生物学重复。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

以红比利时杜鹃盛开期花瓣、根、茎、叶为材料，总 RNA 提取使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]。

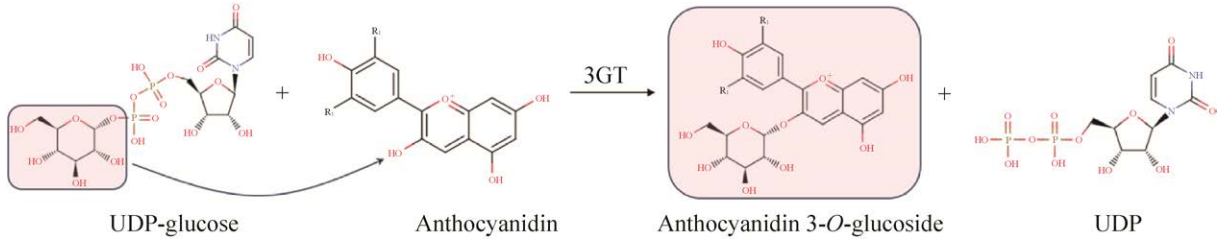

图 1 3GT 催化生成花青素 3-*O*-葡萄糖苷原理图

Figure 1 Schematic diagram of anthocyanidin 3-*O*-glucoside generation catalyzed by 3GT.

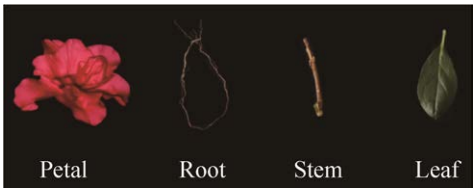

图 2 红比利时杜鹃不同组织

Figure 2 Different tissues of *Rhododendron hybridum* (red cultivar).

cDNA 合成使用 NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) (苏州近岸蛋白科技股份有限公司)，得到的 cDNA 于–40 ℃保存备用。

1.3 *Rh3GT* 基因的克隆

使用 Primer 6 软件在线设计 *Rh3GT* 基因的上、下游引物 *Rh3GT*-F1 和 *Rh3GT*-R1 (表 1)。以红比利时杜鹃花瓣 cDNA 为模板，使用 2×*Fast Pfu* Master Mix 高保真酶进行 PCR 扩增 (50 μL 反应体系)，10 μmol/L 上、下游引物和 50 mg/L cDNA 各 2 μL，补足 ddH_2O 至 50 μL。PCR 反应程序为：94 ℃预变性 1 min 30 s；94 ℃变性 20 s，60 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃终延伸 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，割胶回收目的条带后，将其与 pEASY-Blunt Zero 克隆载体连接，经过转化、筛选等实验，最终测序获得基因序列。

1.4 生物信息学分析

蛋白结构域分析借助 NCBI-CDD (https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)在线分析完成；蛋白基本理化性质预测借助 Expasy-ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/)完成；蛋白二级结构预测采用 SOPMA 在线平台 (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)分析；蛋白三级结构的预测借助 SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org)在线平台；多序列比对采用 DNAMAN 进行分析；系统发育树构建使用 MEGA 11 完成。

1.5 RT-qPCR 测定 *Rh3GT* 基因在不同组织中的表达情况

使用 NCBI Primer-BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)设计 RT-qPCR 引物 *Rh3GT*-F2 和 *Rh3GT*-R2 (表 1)。以 *ACTIN* 为内参基因[19]，以红比利时杜鹃盛开期花瓣及根、茎、叶的 cDNA 为模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒(苏州近岸蛋白科技股份有限公司)完成 RT-qPCR 反应，反应体系为 35 μL，其中 Tip Green qPCR SuperMix 17.5 μL，10 μmol/L 上、下游引物及 50 ng/μL cDNA 各

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5′→3′)
Rh3GT-F1	ATGGGGGCAGAGGAGATGGGGGTGC
Rh3GT-R1	CTAAAGGTTGTACCCTGCTA
ACTIN-F	CACTGGTGTCATGGTTGGGA
ACTIN-R	CTCTTCAGGAGCAACACGGA
Rh3GT-F2	GTGGCCCGTTCAACTCGATA
Rh3GT-R2	GTTCCAAAGCCGATGTACGC
Rh3GT-F3	acgggggactcttgaccatggATGGGGGCAGAGGAGATGG
Rh3GT-R3	tactagtcagatctaccatggAAGGTTGTACCCTGCTACAATCTCC
Rh3GT-F4	aatgggtcgcggatccATGGGGGCAGAGGAGATGG
Rh3GT-R4	ggtggtggtgctcgagaagGTTGTACCCTGCTACAATCTCC

The lowercase letters represent primer adapters.

0.7 μL，补齐 ddH_2O 至 35 μL。反应程序为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 20 s，60 ℃退火 1 min，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.6 *Rh3GT* 在花瓣中瞬时过表达

用 *Nco* I核酸内切酶将 pCAMBIA1302 质粒进行单酶切回收纯化。使用 CE Design 设计重组质粒引物 *Rh3GT*-F3 和 *Rh3GT*-R3 (表 1)，构建重组质粒 pCAMBIA1302-*Rh3GT* 并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，测序正确后将重组质粒 pCAMBIA1302-*Rh3GT* 和空载质粒 pCAMBIA1302 分别转入农杆菌 GV3101 中，并挑取阳性克隆进行 PCR，将正确的阳性菌于 LB 液体培养基含 20 mg/L 利福平(rifampicin, Rif)、50 mg/L 硫酸卡那霉素(kanamycin, Kan)培养，混浊后离心收菌，用侵染液[10 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES)，200 mmol/L 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)]重悬菌体，并调节 OD_{600} 至 0.6 左右。使用针筒将空载和含有目的基因的载体侵染重悬液沿着花脉注射到红比利时杜鹃花花瓣中。遮光处理 48 h 后采摘花瓣进行总 RNA 提取，反转录为 cDNA 进行 RT-qPCR 相对表达量的测定，使用同一朵花瓣进行总花青苷含量的提取与测定，每个样品设置 3 次生物学重复。实验设置 3 个组别，分别为 CK (未注射)、空载组和实验组。

1.7 总花青苷的提取与测定

参考 Mehrtens 等[20]的实验方法，使用液氮研磨 0.2 g 花瓣样品放入离心管中，加入 1 mL 1%的盐酸-甲醇溶液，在室温下摇晃 18 h，12 000 r/min 离心 5 min，取 400 μL 上清液加入 600 μL 1%的盐酸-甲醇溶液，分别测定波长在 530 nm 和 657 nm 处的吸光度，总花青苷含量为$(A_{530}-0.25\times A_{657})/m$。其中 m 为样品质量，单位为 g。

1.8 Rh3GT 重组蛋白可溶性验证及诱导条件探索

原核表达载体构建参考蒋宝鑫等[21]的实验方法。用 CE Design 设计重组质粒引物 *Rh3GT*-F4 和 *Rh3GT*-R4 (表 1)。以花瓣 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

将重组质粒 pET-28a-*Rh3GT* 和空载质粒 pET-28a 阳性 BL21 菌落单菌落分别挑取至 50 mL 含有 50 mg/L 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃、200 r/min 条件下扩增。当菌液 OD_{600} 达到 0.6 左右时，加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)母液使其终浓度为 0.5 mmol/L，在 28 ℃、200 r/min 条件下过夜诱导。为诱导可溶性蛋白，设计 0.01、0.05、0.1、0.3、0.5、1.0 mmol/L IPTG 的浓度梯度，分别在 20、28、37 ℃条件下以 200 r/min 的转速过夜诱导。另外尝试在低温、低 IPTG 浓度、低菌液 OD_{600} 条件下延长诱导时间实现可溶性蛋白的诱导。具体条件为 16 ℃、100 r/min、IPTG 浓度为 0.01 mmol/L、菌液 OD_{600} 为 0.4，设置诱导时间梯度为 12、24、36、48 h。诱导结束后 4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min 收菌，用 3 mL 0.1%磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)悬浮沉淀；对沉淀进行超声破碎处理，超声总时长为 5 min，工作时间 1.5 s，间歇时间 6.5 s；将处理好的样品 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液，用 3 mL 0.1% PBS 悬浮沉淀。分别收集上清和沉淀，然后取 32 μL 蛋白样品加入 8 μL 5×蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术股份有限公司)振荡混匀，100 ℃水浴加热 10 min，使蛋白变性，冷却至室温后，进行 10% SDS-PAGE 分析。

1.9 Rh3GT 包涵体蛋白纯化及复性

使用 His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)(江苏康为世纪生物科技股份有限公司)对 Rh3GT

包涵体蛋白进行纯化，随后进行10% SDS-PAGE检测。使用稀释法对纯化产物进行复性，配制含有 50 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl、2 mmol/L β-巯基乙醇(2-hydroxy-1-ethanethiol)、1 mmol/L 谷胱甘肽(glutathione, GSH)、0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽[glutathione (oxidized)]、1 mmol/L $CaCl_2$ 的稀释复性液，缓慢向纯化产物中加入其2倍体积的稀释复性液，4 ℃冰箱放置24 h后 13 000 r/min 离心 5 min，取上清液完成复性，用 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)检测蛋白浓度。

1.10 Rh3GT 重组蛋白体外酶活检测

体外酶活检测参考徐德[12]的方法并稍作修改。以 UDP-葡萄糖为糖基供体，矢车菊素为受体，验证 Rh3GT 重组蛋白是否具有体外催化能力。设置灭活的 Rh3GT 蛋白、矢车菊素、UDP-葡萄糖混合反应作为对照组，复性后的 Rh3GT、矢车菊素、UDP-葡萄糖混合反应作为反应组。具体反应体系如下：1 mg/mL UDP-葡萄糖 300 μL、2 mg/mL 矢车菊素 100 μL、复性后或100 ℃水浴加热10 min灭活的Rh3GT重组蛋白 100 ng、补充 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)至 600 μL，30 ℃条件下反应1 h，用100 μL 10%盐酸终止反应，13 000 r/min离心5 min，上清液经过0.22 μm有机相滤膜过滤后转移至上样瓶。使用 HPLC 对酶促产物进行分析。色谱柱使用 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱，流动相 A：0.1%甲酸水溶液，流动相 B：100%乙腈，进样量5 μL，流速1 mL/min，柱温 35 ℃。采用梯度洗脱：0–1.0 min，5% B；1.0–2.5 min，5%–50% B；2.5–3.8 min，50%–70% B；3.8–5.0 min，70%–90% B；5.0–6.0 min，90% B；6.0–6.2 min，90%–5% B；6.2–8.0 min，5% B。检测波长为530 nm。所用标品均购自上海源叶生物科技有限公司。

2 结果与分析

2.1 *Rh3GT* 基因的克隆及氨基酸序列分析

通过特异性引物扩增获得一个新的 *3GT* 基因ORF全长，命名为*Rh3GT*。凝胶电泳显示，该基因 PCR 产物约为 1 000 bp，且条带清晰(图 3A)。通过基因测序发现 *Rh3GT* 全长为993 bp，长度与电泳结果基本一致，该基因共编码330个氨基酸(图3B)。

2.2 Rh3GT 蛋白的理化特性及结构域

使用Expasy-ProtParam分析Rh3GT蛋白的理化性质，结果显示Rh3GT由330个氨基酸组成，相对分子量为36 018.47 Da；理论等电点为6.02；酸性氨基酸数(天冬氨酸+谷氨酸)为34个，碱性氨基酸数(精氨酸+赖氨酸)为39个，总体表现为弱酸蛋白；稳定性系数为 38.55，为稳定蛋白质；脂肪族氨基酸指数为 91.82；亲水性为 0.039，为疏水性蛋白。综上，Rh3GT为弱酸性稳定的疏水性蛋白。

采用 NCBI-CDD 对 Rh3GT 蛋白进行功能结构域分析。结果表明该蛋白包含 UDP-葡萄糖基转移酶保守域(UDPGT)以及 GT1_Gtf-like特殊结构域，属于Glycosyltransferase-GTB-type超基因家族成员(图4)，为GT-B型糖基转移酶。

2.3 Rh3GT 蛋白的多序列比对及系统发育分析

选取黑果越橘(*Vaccinium myrtillus*)、越橘(*Vaccinium corymbosum*)、中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)、佛罗里达山茱萸(*Cornus florida*)、三七(*Panax notoginseng*)、半边莲(*Lobelia erinus*)、洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)的3GT同源蛋白与Rh3GT进行多序列比对和系统发育分析。多序列比对发现 Rh3GT 与另外 8 条不同物种来源的 3GT

蛋白之间的相似度介于 42.18%和 60.39%之间。其中，Rh3GT 与烟草 Nt3GT 相似度最低，为 42.18%；与越橘 Vc3GT 相似度最高，为 60.39%。不同物种来源的 3GT 蛋白均包含一个由 44 个氨基酸构成的糖基转移酶的保守域 PSPG box，该保守序列被认为是结合糖基供体的区域。Rh3GT 蛋白 PSPG box 中第 44 位氨基酸为谷氨酰胺(Q)，一般认为这种结构优先以 UDP-葡萄糖为糖基供体[22] (图 5A)。系统发育树分析结果表明，比利时杜鹃 Rh3GT 与黑果越橘 Vm3GT 和越橘 Vc3GT 的亲缘关系最近(图 5B)。

2.4 Rh3GT 蛋白的二、三级结构预测

二级结构预测显示，有 143 个氨基酸参与形成无规则卷曲，占总氨基酸的 43.33%；140 个氨基酸参与形成 α-螺旋，占总氨基酸的 42.42%；有 47 个氨基酸参与形成 β-折叠，占总氨基酸的 14.24%。结果表明，Rh3GT 蛋白主要由不规则卷曲、α-螺旋和 β-折叠结构组成(图 6A)。

三级结构预测显示，Rh3GT 蛋白三级结构与二级结构预测结果相符，主要由不规则卷曲和 α-螺旋构成。其中活性位点 PSPG box 存在于一个 α-螺旋结构内(图 6B)。

2.5 红比利时杜鹃花盛开期花瓣及根、茎和叶中 *Rh3GT* 基因的表达量分析

以红比利时杜鹃盛开期花瓣及根、茎、叶的 cDNA 为模板，*ACTIN* 为内参基因，使用 RT-qPCR 技术检测 *Rh3GT* 基因在比利时杜鹃不同组织中的表达量，结果显示，*Rh3GT* 基因在

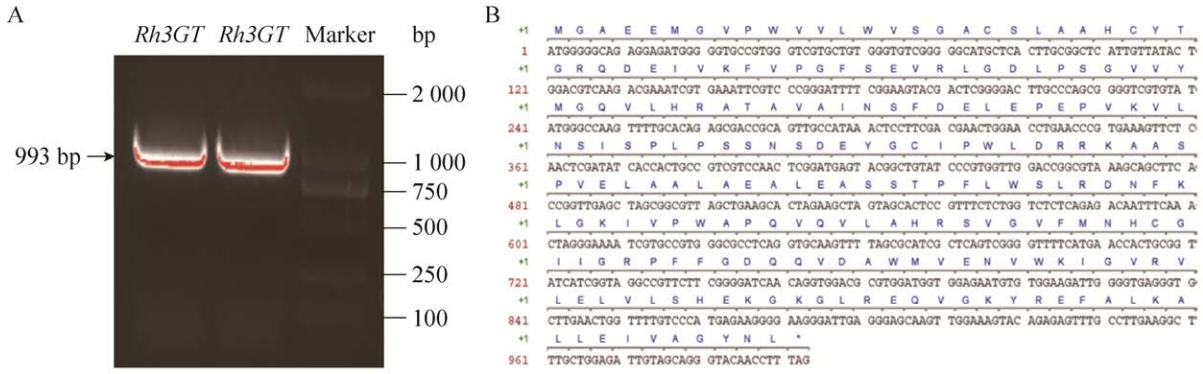

图 3 *Rh3GT* PCR 扩增产物的凝胶电泳检测和编码氨基酸序列 A：*Rh3GT* 凝胶电泳条带图。Marker：DL2000 DNA marker。B：测序所得的 *Rh3GT* 序列及其编码氨基酸序列。

Figure 3 Gel electrophoresis detection of PCR amplified products of *Rh3GT* and encoded amino acid sequences. A: *Rh3GT* electrophoresis diagram. Marker: DL2000 DNA marker. B: The *Rh3GT* sequences obtained from sequencing and its encoded amino acid sequences.

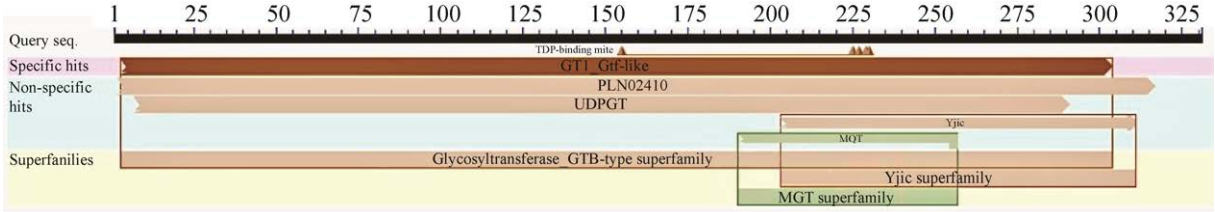

图 4 Rh3GT 蛋白的保守结构域

Figure 4 Conserved domain of the Rh3GT protein.

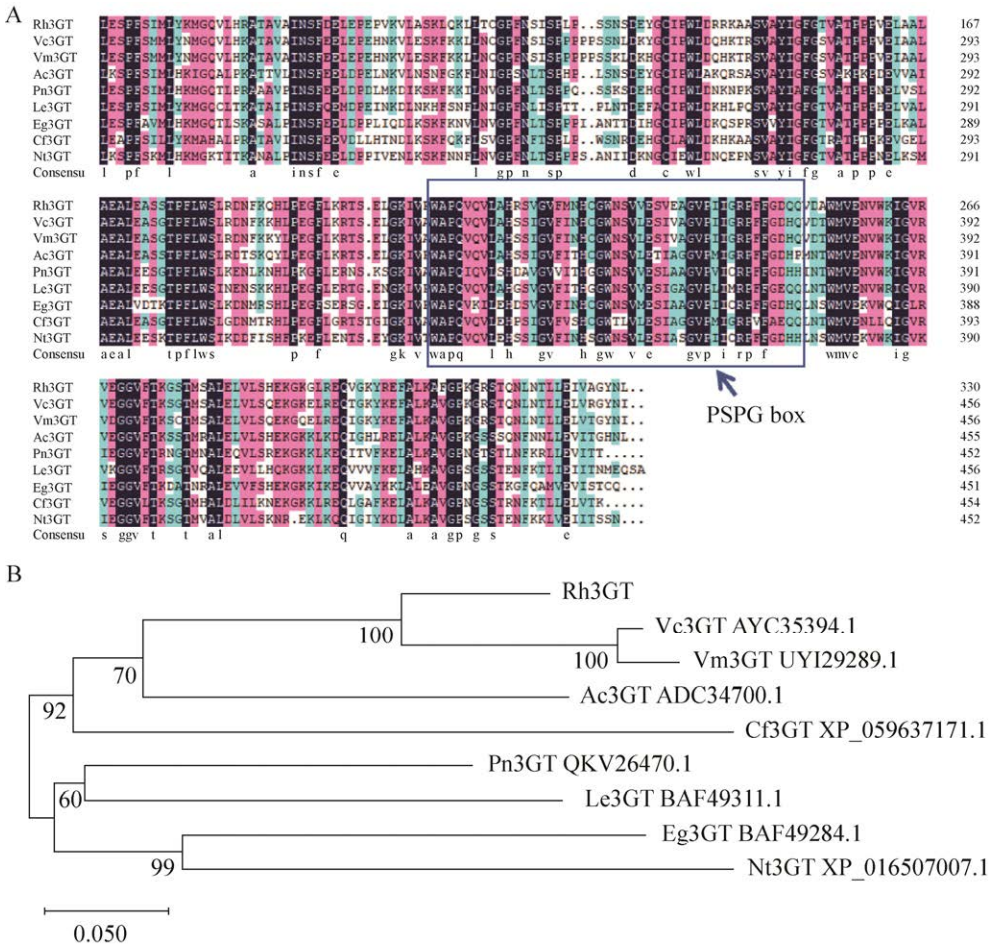

图 5 比利时杜鹃与其他物种 3GT 蛋白的序列比对(A)和系统发育分析(B) Vc：越橘；Vm：黑果越橘；Ac：中华猕猴桃；Pn：三七；Le：半边莲；Eg：洋桔梗；Cf：佛罗里达山茱萸；Nt：烟草。

Figure 5 Alignment (A) and phylogenetic tree analysis (B) of 3GT protein sequences in *Rhododendron hybridum* and other species. Vc: *Vaccinium corymbosum*; Vm: *Vaccinium myrtillus*; Ac: *Actinidia chinensis*; Pn: *Panax notoginseng*; Le: *Lobelia erinus*; Eg: *Eustoma grandiflorum*; Cf: *Cornus florida*; Nt: *Nicotiana tabacum*.

盛开期花瓣中表达量最高，叶片和茎中其次，在根中几乎不表达(图 7)。

2.6 *Rh3GT* 在花瓣中的瞬时过表达分析

Rh3GT 基因在红比利时杜鹃花瓣中的瞬时过表达结果表明，*Rh3GT* 在 CK 和经 pCAMBIA1302 处理后的花瓣中表达量相近，且无明显差异，而瞬时过表达后花瓣中的 *Rh3GT* 表达量显著提高($P<0.05$)大约为 CK 中表达量的 3.75 倍(图 8A)。此外，CK 组与 pCAMBIA1302 处理后的花瓣组总花青苷含量相近，而 *Rh3GT* 基因瞬时过表达后的花瓣总花青苷含量显著提高($P<0.05$)，约为 CK 组的 1.23 倍(图 8B)，表明 *Rh3GT* 基因的瞬时过表达增加了花瓣中总花青苷的积累。

2.7 Rh3GT 重组蛋白可溶性分析及最适诱导条件确定

10% SDS-PAGE 结果显示，在 28 ℃、IPTG 浓度 0.5 mmol/L 条件下过夜诱导出的目的蛋白大小约为 36 kDa，与预期大小相近，说明

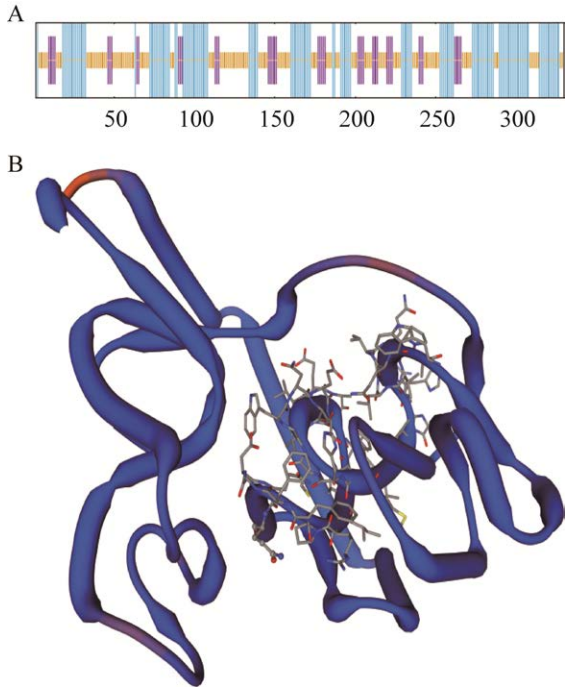

图 6　Rh3GT 蛋白的二、三级结构预测　A：Rh3GT 蛋白的二级结构预测。黄色代表无规则卷曲，蓝色代表 α-螺旋，紫色代表 β-折叠。B：Rh3GT 蛋白的三级结构预测。带状代表蛋白主链，链状为 PSPG box 结构域部分。

Figure 6　Secondary and tertiary structure prediction of Rh3GT protein. A: Secondary structure prediction of Rh3GT protein. Yellow represents random coil, blue represents alpha helices, and purple represents beta sheets. B: Tertiary structure prediction of Rh3GT protein. Band-like represents the protein backbone, and the chain is the PSPG box domain part.

Rh3GT 在大肠杆菌 BL21 中诱导成功(图 9A)，当没有 IPTG 的存在时，重组质粒无法表达目的蛋白(图 9A)。

重组质粒转化菌液分别在 20、28、37 ℃环境中，并在不同的 IPTG 浓度下(0.01、0.05、0.1、0.3、0.5、1 mmol/L)过夜诱导。不同温度、IPTG 浓度的条件下 Rh3GT 重组蛋白均以包涵体的形式存在于悬浮沉淀中。20 ℃条件下诱导时，IPTG 浓度越高目的蛋白诱导表达量越高；28 ℃和 37 ℃诱导时，当 IPTG 浓度在 0.1 mmol/L 以上，目的蛋白的诱导表达量随 IPTG 浓度的升高不再增加。另外，相较于 20 ℃和 37 ℃，28 ℃诱导条件下杂蛋白的条带更弱(图 9B−9D)。

进一步降低温度至 16 ℃，降低起始诱导菌液 OD_{600} 值至 0.4，降低转速至 100 r/min，使用 0.01 mmol/L 的低浓度 IPTG 诱导并延长诱导时间最多至 48 h，以降低蛋白合成速率，延长重组时间使重组蛋白正确折叠，从而形成可溶性蛋白。结果发现目的蛋白不仅表达量低，且仍以包涵体形式存在于悬浮沉淀中(图 9E)。因此 28 ℃、0.1 mmol/L IPTG 过夜诱导为 Rh3GT 包涵体蛋白的最适诱导条件。

2.8　Rh3GT 包涵体蛋白的变性纯化

由于重组蛋白以包涵体的形式存在于悬浮沉淀，故使用包涵体纯化试剂盒进行蛋白纯化。蛋白变性溶解后，通过镍柱纯化系统，对目的蛋白进行亲和纯化，最后分批次收集洗脱液，进行 10% SDS-PAGE 分析，选择纯度及相对含量较高的重组蛋白(泳道 9−11)用于下一步稀释复性(图 10)。

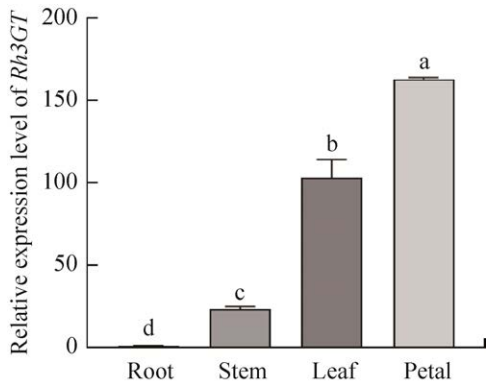

图 7　*Rh3GT* 在红比利时杜鹃不同组织中的表达谱　a、b、c、d 表示差异显著(P<0.05)。

Figure 7　Expression profile of *Rh3GT* in different tissues of *Rhododendron hybridum* (red cultivar). a, b, c, and d indicate significant differences (P<0.05).

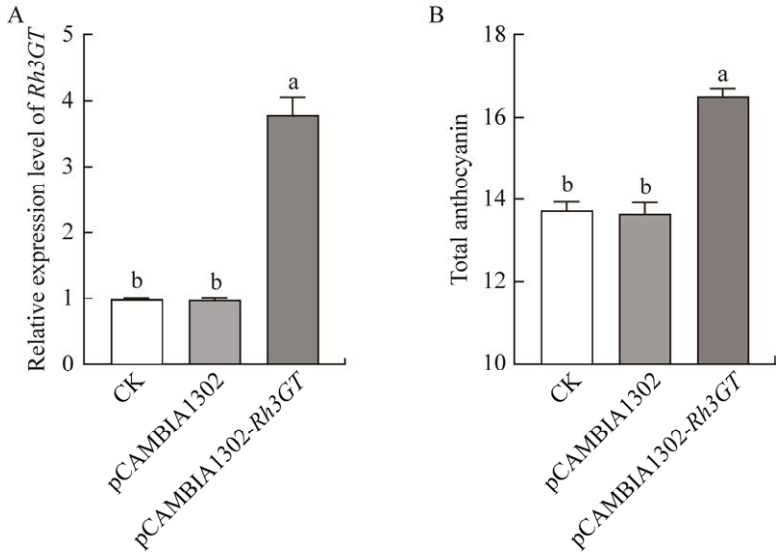

图 8 瞬时过表达 *Rh3GT* 后基因的相对表达量(A)及花瓣总花青苷含量变化(B) CK：未注射；pCAMBIA1302：注射空载；pCAMBIA1302-*Rh3GT*：注射含目的基因的载体；a、b 表示差异显著(P<0.05)。

Figure 8 Changes in the relative expression level of the *Rh3GT* (A) and the total anthocyanin content of petals (B) after transient overexpression of *Rh3GT*. CK: Not injected; pCAMBIA1302: Injected with blank vector; pCAMBIA1302-*Rh3GT*: Injected a vector containing the gene of interest; a and b indicate significant differences (P<0.05).

2.9 Rh3GT 重组蛋白的体外酶活分析

各组别在同等条件下反应后发现，加入灭活 Rh3GT 重组蛋白(无色透明)的对照组，颜色无变化，而加入稀释复性的 Rh3GT 重组蛋白(无色透明)的反应组颜色变得更趋向于矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷标准品(图 11A)。HPLC 测定结果发现，相较于对照组，稀释复性后的 Rh3GT 重组蛋白能以 UDP-葡萄糖和矢车菊素为底物，催化生成矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷(图 11B−11D)，表明 Rh3GT 重组蛋白具有类黄酮 3-*O*-糖基转移酶的功能特性。

3 讨论与结论

本研究从红比利时杜鹃中克隆得到一个 *Rh3GT* 基因，分析了该基因及其翻译蛋白的理化特性和组织表达差异，探讨了该基因瞬时表达效果与花青苷含量之间的相关性，表达纯化并验证了其蛋白的酶学特性。

保守结构域分析表明，Rh3GT 包含 UDP-葡萄糖基转移酶保守域(UDPGT)以及 GT1_Gtf-like 特殊结构域，属于糖基转移酶 Glycosyltransferase_GTB-type 超家族成员，为 GT-B 型糖基转移酶。Rh3GT 的 C 端存在一个由 44 个氨基酸组成的 PSPG box (W-2x-Q-3x-L-5x-G-x-F-2x-H-x-GW-x-S-2x-ES-3x-GVP-4x-P-5x)，是糖基转移酶识别、结合供体分子的保守序列。该结构域第 44 位氨基酸为谷氨酰胺(Q)，一般认为这种结构优先以 UDP-葡萄糖为糖基供体[22]。这与沙棘(*Hippophae rhamnoides*)[23]、红花(*Carthamus tinctorius*)[24]、紫玉兰‘红元宝’(*Magnolia liliflora*)[25]中的研究结果一致。另一些结构，如红心猕猴桃(*Actinidia chinensis*) *AcUFGT3a* 的 PSPG box 结构域第 44 位氨基酸为组氨酸(H)，其能以 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖(UDP-galactose)为糖基供体合成花青苷，但优先以 UDP-半乳糖为糖基供体[26]。

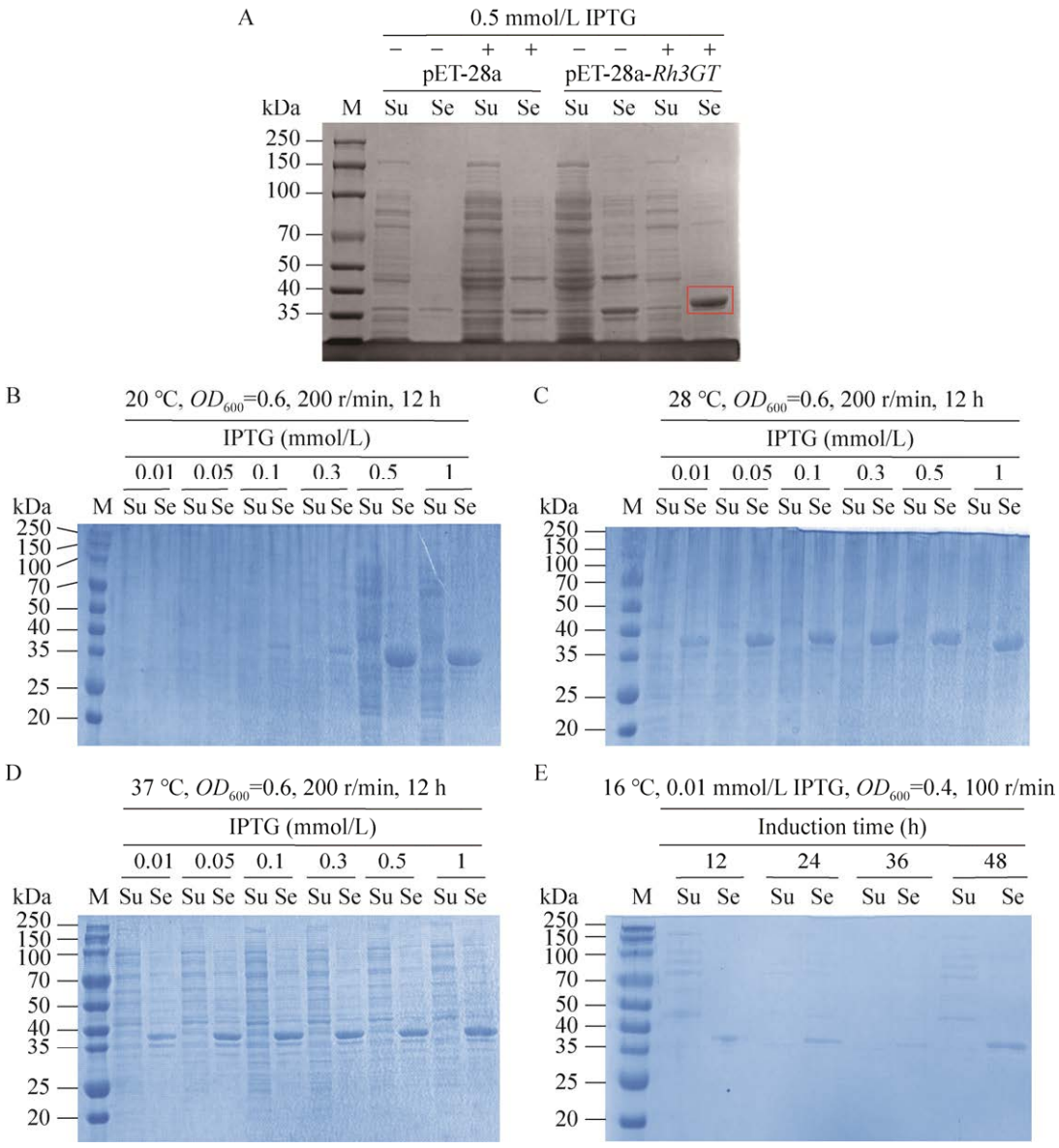

图 9　Rh3GT 重组蛋白的 10% SDS-PAGE 分析　A：目的蛋白的鉴定；B：20 ℃条件下设置不同浓度 IPTG 诱导可溶性目的蛋白；C：28 ℃条件下设置不同浓度 IPTG 诱导可溶性目的蛋白；D：37 ℃条件下设置不同浓度 IPTG 诱导可溶性目的蛋白；E：16 ℃低温、0.01 mmol/L 低 IPTG 浓度、0.4 低 OD_{600} 起始值、100 r/min 低转速条件下设置不同诱导时间诱导可溶性目的蛋白。红色方框：Rh3GT 重组蛋白；M：250 kDa 蛋白 marker；Su：上清液；Se：沉淀物。

Figure 9　Analysis of recombinant Rh3GT protein by 10% SDS-PAGE. A: Identification of the protein of interest; B: Different concentrations of IPTG were set up to induce soluble target proteins at 20 °C; C: Different concentrations of IPTG were set up to induce soluble target proteins at 28 °C; D: Different concentrations of IPTG were set up to induce soluble target proteins at 37 °C; E: Different induction times were set up to induce soluble target proteins at 16 °C, 0.01 mmol/L IPTG, a starting OD_{600} value of 0.4, and a rotation speed of 100 r/min. Red box: Rh3GT recombinant protein. M: 250 kDa protein marker; Su: Supernatant; Se: Sediment.

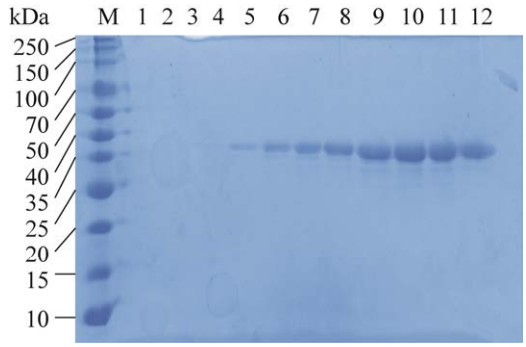

图 10 纯化后的 Rh3GT 重组蛋白的 10% SDS-PAGE 分析 Lane M：蛋白 250 kDa marker；Lane 1−12 表示 1−12 次接收洗脱液。

Figure 10 Analysis of purified Rh3GT recombinant protein using 10% SDS-PAGE. Lane M: 250 kDa protein marker; Lanes 1−12 indicates 1−12 received eluents.

利用 RT-qPCR 对红比利时杜鹃盛开期不同组织中的 *Rh3GT* 基因表达量进行分析，发现在茎、叶、花瓣中均有不同程度表达，其中，在花瓣中表达量最高，但在根中几乎不表达，说明 *Rh3GT* 的表达具有组织特异性。这与红花[24]、紫玉兰‘红元宝’[25]、滇牡丹(*Paeonia delavayi*)[27]等观赏性植物中的研究结果相似。在其他有花植物如丹参的研究中发现，*SmUF3GT* 在丹参地上部分的各组织均有表达，其表达丰度与花瓣、叶边缘、茎以及萼片的紫色花青素沉淀相关联，但在根中几乎不表达[28]；黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)中，*LrUFGU1* 在花中表达量最高，其次是紫果和叶[29]。另外，与观赏性植

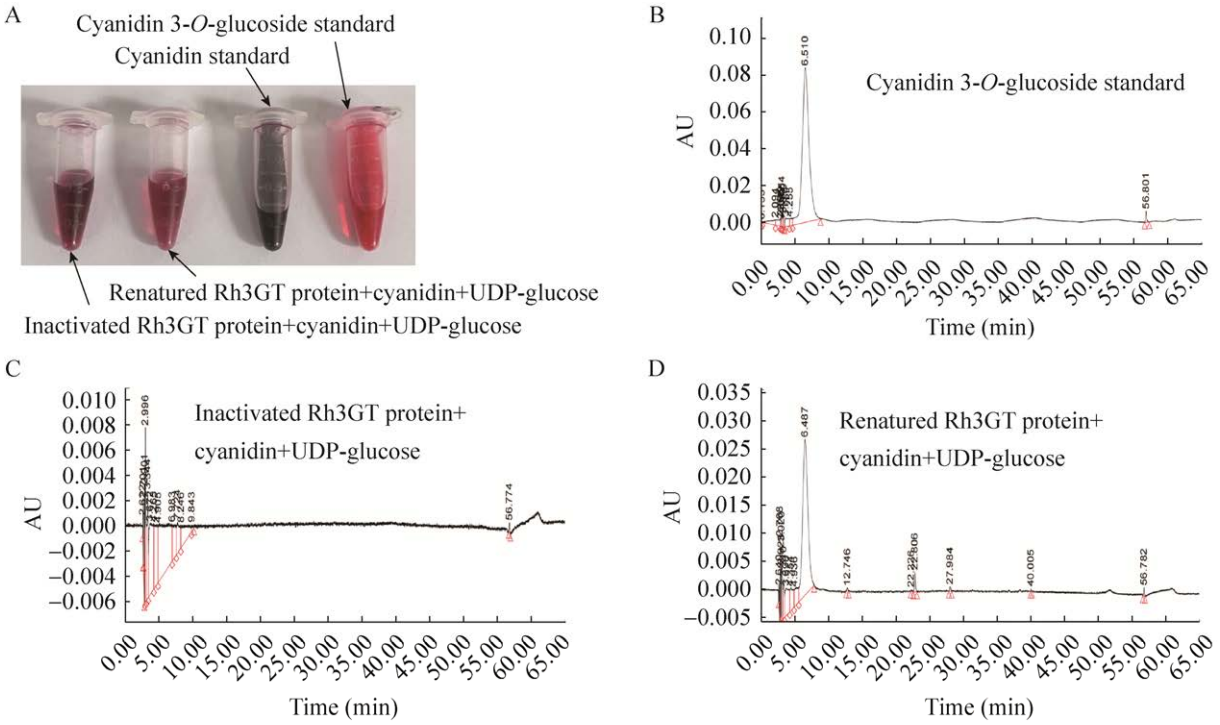

图 11 体外酶活检测结果 A：同等反应条件下不同组别颜色对比；B：矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷标准品的 HPLC 分析；C：灭活的 Rh3GT 蛋白、矢车菊素、UDP-葡萄糖混合反应后的 HPLC 分析；D：复性后的 Rh3GT、矢车菊素、UDP-葡萄糖混合反应后的 HPLC 分析。

Figure 11 *In vitro* enzyme activity detection results. A: Color comparison of different groups under the same reaction conditions; B: HPLC analysis of cyanidin 3-*O*-glucoside standard product; C: HPLC analysis of the mixed reaction of inactivated Rh3GT protein, cyanidin, and UDP-glucose; D: HPLC analysis of the mixed reaction of renatured Rh3GT, cyanidin, and UDP-glucose.

物和有花植物不同，根为萝卜的主要器官，紫色萝卜(*Daucus carota* L.)的 *DcUCGalT1* 在根中表达，且表达量与花青苷生物合成呈正相关[30]。大量研究表明 *3GT* 基因的表达与组织器官着色相关联。在大葱(*Allium fistulosum* L.)中发现，*AfUFGT* 在叶片中的表达量最高，但是根中的表达量要高于茎，然而大葱的主要类黄酮物质是槲皮素而非花青素[31]。推测各物种的 *3GT* 可能存在不同的生物学功能。

瞬时过表达结果表明，*Rh3GT* 基因在红比利时杜鹃花瓣中瞬时过表达导致总花青苷积累的显著增加，这与 Wang 等[32]报道的 *MtUGT84A1* 的在苜蓿(*Medicago truncatula*)本体中过表达显著提高了花青苷含量一致。Nguyen 等[33]将越橘(*Vaccinium vitis-idaea*) *VcUFGT2* 与猕猴桃(*Actinidia melanandra*)类黄酮 3′,5′-羟化酶(flavonoid 3′,5′-hydroxylase, F3′5′H)在草莓(*Fragaria ananassa*)中瞬时表达，提高了蓝色花青苷的积累，这为花色方面植物育种提供了新思路。*Rh3GT* 通过瞬时过表达被证明可增加杜鹃花青苷积累，后续可通过将 *Rh3GT* 与其他功能基因共表达，实现目标花青苷的积累，进而改变杜鹃花色。

为进一步验证 Rh3GT 的功能，本研究通过构建原核表达载体 pET-28a-*Rh3GT*，在大肠杆菌 BL21 中成功表达 Rh3GT 重组蛋白，其大小与理论预测值一致，但几乎都以包涵体的形式存在。有研究发现，蛋白质合成速度过快会影响复杂结构蛋白质折叠而形成错误折叠的不溶性蛋白[34]。为降低蛋白合成速率获得可溶性蛋白，本研究通过降低菌液 OD_{600} 的起始值、温度、IPTG 浓度，并通过延长诱导时间保证重组蛋白有足够的时间进行正确折叠。优化这些诱导条件后，Rh3GT 重组蛋白仍以包涵体形式存在。这可能是由于 pET-28a 的 T7 强启动子导致蛋白合成速率仍然过快，后续可以考虑换用弱启动子载体，如 pGEX 系列等。本研究直接使用包涵体变性纯化和稀释复性的方式制备可用于体外酶活检测的重组蛋白。

有研究表明，所有的 3GT 对底物均存在特异性结合，有些 3GT 以花青素为糖基受体，另一些则以其他类黄酮作为糖基受体[26]，例如槲皮素、山奈酚等[24]。本研究结果显示 Rh3GT 能以矢车菊素为受体，以 UDP-葡萄糖为糖基供体催化生成矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷。这与马缨杜鹃[12]、苦荞(*Fagopyrum tataricum*)[13]中的测定结果一致，证明 Rh3GT 重组蛋白具有类黄酮 3-*O*-糖基转移酶的活性特征，能与矢车菊素特异性结合。另有研究发现，矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷是红色杜鹃花的主要花青苷[35]，推测 *Rh3GT* 对比利时杜鹃花呈色起重要作用。这为进一步验证 *Rh3GT* 基因的功能和潜在的分子育种奠定了基础。

REFERENCES

[1] YANG EM, KANG HM, KIM CS, PAK CH. Dependence of the color appearance of some flowers on illumination[J]. Color Research & Application, 2014, 39(1): 28-36.

[2] ERICKSON MF, PESSOA DMA. Determining factors of flower coloration[J]. Acta Botanica Brasilica, 2022, 36: e2021abb0299.

[3] 王振兴，于云飞，陈丽，秦红艳，刘迎雪，艾军，赵滢，杨义明，李晓燕，王广富，孙丹，王春伟，范书田. 彩叶植物叶片色素组成、结构以及光合特性的研究进展[J]. 植物生理学报, 2016, 52(1): 1-7.
WANG ZX, YU YF, CHEN L, QIN HY, LIU YX, AI J, ZHAO Y, YANG YM, LI XY, WANG GF, SUN D, WANG CW, FAN ST. Advances in leaf pigment composition, structure and photosynthetic characteristics of colored-leaf plants[J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52(1): 1-7 (in Chinese).

[4] ZHANG DL, XIE AQ, YANG X, YANG LJ, SHI YJ, DONG LL, LEI FL, SUN LM, BAO MY, SUN X. Analysis of physiological and biochemical factors affecting flower color of herbaceous peony in different flowering periods[J]. Horticulturae, 2023, 9(4): 502.

[5] NARBONA E, del VALLE JC, ARISTA M, BUIDE ML, ORTIZ PL. Major flower pigments originate different colour signals to pollinators[J]. Frontiers in Ecology and Evolution, 2021, 9: 743850.

[6] TINDAL RA, JEFFERY DW, MUHLACK RA. Nonlinearity and anthocyanin colour expression: a mathematical analysis of anthocyanin association kinetics and equilibria[J]. Food Research International, 2024, 183: 114195.

[7] DO SOCORRO S CHAGAS M, BEHRENS MD, MORAGAS-TELLIS CJ, PENEDO GXM, SILVA AR, GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE CF. Flavonols and flavones as potential anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial compounds[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022, 2022(1): 9966750.

[8] ZHAO CL, YU YQ, CHEN ZJ, WEN GS, WEI FG, ZHENG Q, WANG CD, XIAO XL. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation[J]. Food Chemistry, 2017, 214: 119-128.

[9] PARVANEH T, ABEDI B, DAVARYNEJAD GH, GANJI MOGHADAM E. Enzyme activity, phenolic and flavonoid compounds in leaves of Iranian red flesh apple cultivars grown on different rootstocks[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 246: 862-870.

[10] JIAO FC, ZHAO L, WU XF, SONG ZB, LI YP. Metabolome and transcriptome analyses of the molecular mechanisms of flower color mutation in tobacco[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 611.

[11] 顾佳珺, 姚宇, 落艳娇, 王圆月, 申国安, 张丽娟, 郭宝林. 植物花青素糖基转移酶研究进展[J]. 生物资源, 2023, 45(3): 201-209.
GU JJ, YAO Y, LUO YJ, WANG YY, SHEN GA, ZHANG LJ, GUO BL. Research progress of plant anthocyanin glycosyltransferase[J]. Biotic Resources, 2023, 45(3): 201-209 (in Chinese).

[12] 徐德. 类黄酮 3-*O*-糖基转移酶调控马缨杜鹃花色呈色的机制研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2021.
XU H. The mechanism study on flavonoid 3-*O*-glycosyltransferase regulating the formation of flower color of *Rhododendron delavayi*[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2021 (in Chinese).

[13] 李茂菲, 周婧, 姚攀锋, 赵学荣, 李成磊, 吴琦. 苦荞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 MF, ZHOU J, YAO PF, ZHAO XR, LI CL, WU Q. Molecular cloning and expression of glycosyltransferases gene from *Fagopyrum tataricum*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(12): 2391-2397 (in Chinese).

[14] SUN W, MENG XY, LIANG LJ, LI YQ, ZHOU TT, CAI XQ, WANG L, GAO X. Overexpression of a *Freesia hybrida* flavonoid 3-*O*-glycosyltransferase gene, Fh3GT1, enhances transcription of key anthocyanin genes and accumulation of anthocyanin and flavonol in transgenic Petunia (*Petunia hybrida*)[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2017, 53(5): 478-488.

[15] CHEN WH, HSU CY, CHENG HY, CHANG H, CHEN HH, GER MJ. Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(6): 1007-1017.

[16] SUN W, SUN SY, XU H, WANG YH, CHEN YR, XU XR, YI Y, JU ZG. Characterization of two key flavonoid 3-*O*-glycosyltransferases involved in the formation of flower color in *Rhododendron delavayi*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 863482.

[17] 孙威, 张艳, 王聿晗, 徐德, 徐小蓉, 鞠志刚. 马缨杜鹃 Rd3GT1 的克隆及对矮牵牛花色形成的影响[J]. 生物技术通报, 2022, 38(9): 198-206.
SUN W, ZHANG Y, WANG YH, XU H, XU XR, JU ZG. Cloning of Rd3GT1 in *Rhododendron delavayi* and its effect on flower color formation of *Petunia hybrida*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(9): 198-206 (in Chinese).

[18] 何凡, 吴月燕, 谢晓鸿, 杨国霞, 蒋宝鑫, 李东宾, 鄢毅铖, 贾永红. 红比利时杜鹃愈伤悬浮颗粒瞬时转化体系构建及植株再生[J]. 核农学报, 2022, 36(8): 1546-1558.
HE F, WU YY, XIE XH, YANG GX, JIANG BX, LI DB, YAN YC, JIA YH. Construction of transient transformation system of callus suspension particle from *Rhododendron×hybridum* Hort and plant regeneration[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(8): 1546-1558 (in Chinese).

[19] 刘小飞, 于波, 黄丽丽, 孙映波. 杜鹃红山茶实时定量 PCR 内参基因筛选及验证[J]. 广东农业科学, 2020, 47(12): 203-211.
LIU XF, YU B, HUANG LL, SUN YB. Screening and validation of reference genes of *Camellia azalea* by quantitative real-time PCR[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(12): 203-211 (in Chinese).

[20] MEHRTENS F, KRANZ H, BEDNAREK P, WEISSHAAR B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2005, 138(2): 1083-1096.

[21] 蒋宝鑫, 杨国霞, 吕思佳, 贾永红, 谢晓鸿, 吴月燕. 比利时杜鹃花花青素合成酶基因(*RhANS*)克隆及其功能分析[J]. 核农学报, 2023, 37(3): 449-460.
JIANG BX, YANG GX, LÜ SJ, JIA YH, XIE XH, WU YY. Cloning and functional analysis of anthocyanin synthase gene (*RhANS*) in *Rhododendron hybridum* Hort[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2023, 37(3): 449-460 (in Chinese).

[22] XIE LF, CAO YL, ZHAO ZK, REN CH, XING MY, WU BP, ZHANG B, XU CJ, CHEN KS, LI X. Involvement of MdUGT75B1 and MdUGT71B1 in flavonol galactoside/glucoside biosynthesis in apple fruit[J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126124.

[23] 刘瑞, 赵浪, 马玉花. 中国沙棘 *Hr3GT* 基因的扩增

及生物信息学分析[J]. 青海农林科技, 2023, 2023(1): 93-96.
LIU R, ZHAO L, MA YH. Amplification and bioinformatics analysis of *Hr3GT* gene in *Hippophae rhamnoides*[J]. Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry, 2023, 2023(1): 93-96 (in Chinese).

[24] 谭政委, 鲁丹丹, 李磊, 余永亮, 许兰杰, 董薇, 杨红旗, 杨青, 李春明, 安素妨, 梁慧珍. 红花类黄酮 3-*O*-糖基转移酶基因 *CtUF3GT* 的克隆及功能鉴定[J]. 药学学报, 2022, 57(8): 2543-2551.
TAN ZW, LU DD, LI L, YU YL, XU LJ, DONG W, YANG HQ, YANG Q, LI CM, AN SF, LIANG HZ. Identification and characterization of flavonoid 3-*O*-glycosyltransferase gene *CtUF3GT* from safflower (*Carthamus tinctorius* L.)[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2022, 57(8): 2543-2551 (in Chinese).

[25] 王卓为, 戴梦怡, 程少禹, 王小德, 王亚玲, 申亚梅, 张超. 紫玉兰‘红元宝’*Ml3GT1* 基因的克隆及表达分析[J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1417-1425.
WANG ZW, DAI MY, CHENG SY, WANG XD, WANG YL, SHEN YM, ZHANG C. Cloning and expression analysis of *Ml3GT1* in *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’[J]. Guihaia, 2022, 42(8): 1417-1425 (in Chinese).

[26] LIU YF, ZHOU B, QI YW, LIU CH, LIU ZD, REN XL. Biochemical and functional characterization of AcUFGT3a, a galactosyltransferase involved in anthocyanin biosynthesis in the red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*)[J]. Physiologia Plantarum, 2018, 162(4): 409-426.

[27] 王毅, 赵能, 原晓龙, 陈中华, 杨宇明, 王娟. 滇牡丹类黄酮 3-*O*-葡萄糖基转移酶基因的鉴定及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(4): 1556-1562.
WANG Y, ZHAO N, YUAN XL, CHEN ZH, YANG YM, WANG J. Identification and expression analysis of a flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase gene in *Paeonia delavayi*[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(4): 1556-1562 (in Chinese).

[28] 李红艳, 刘景玲, 金伟波, 梁宗锁. 丹参类黄酮 3-*O*-糖基转移酶基因 *SmUF3GT* 的克隆、亚细胞定位及时空表达分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 2038-2045.
LI HY, LIU JL, JIN WB, LIANG ZS. Cloning, subcellular localization and spatio-temporal expression analysis of a flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase gene (*SmUF3GT*) in *Salvia miltiorrhiza*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(10): 2038-2045 (in Chinese).

[29] 聂祝欣, 吕冀堃, 马子乔, 李万琴, 赵会君, 王静. 黑果枸杞 3-*O*-类黄酮糖基转移酶 LrUFGT1 的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2023: 1-16.
NIE ZX, LÜ JK, MA ZQ, LI WQ, ZHAO HJ, WANG J. Cloning and expression analysis of 3-*O*-flavonoid glucosyltransferase *LrUFGT1* from *Lycium ruthenicum* Murr.[J]. Molecular Plant Breeding, 2023: 1-16 (in Chinese).

[30] XU ZS, MA J, WANG F, MA HY, WANG QX, XIONG AS. Identification and characterization of DcUCGalT1, a galactosyltransferase responsible for anthocyanin galactosylation in purple carrot (*Daucus carota* L.) taproots[J]. Scientific reports, 2016, 6(1): 27356.

[31] 徐欢欢, 李逸, 邢嘉怡, 王永勤, 刘乐承. 大葱类黄酮 3-葡萄糖基转移酶 *AfUFGT* 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2021: 1-12.
XU HH, LI Y, XING JY, WANG YQ, LIU LC. Cloning and expression analysis of flavonoid 3-glucosyltransferase *AfUFGT* from welsh onion[J]. Molecular Plant Breeding, 2021: 1-12 (in Chinese).

[32] WANG X, WANG JP, CUI HT, YANG WL, YU B, ZHANG C, WEN JQ, KANG JM, WANG Z, YANG QC. The UDP-glycosyltransferase MtUGT84A1 regulates anthocyanin accumulation and plant growth *via* JA signaling in *Medicago truncatula*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 201: 104972.

[33] NGUYEN HM, PUTTERILL J, DARE AP, PLUNKETT BJ, COONEY J, PENG YY, SOULEYRE EJF, ALBERT NW, ESPLEY RV, GÜNTHER CS. Two genes, *ANS* and UFGT2, from *Vaccinium* spp. are key steps for modulating anthocyanin production[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1082246.

[34] 苗朝悦, 杜乐, 王佳琦, 陈梓杰, 黄靖倍, 陈且昕, 邹沛璇, 韩笑, 张纯. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(9): 33-45.
MIAO ZY, DU Y, WANG JQ, CHEN ZJ, HUANG JB, CHEN QX, ZOU PX, HAN X, ZHANG C. Soluble expression strategies for production of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. China Biotechnology, 2023, 43(9): 33-45 (in Chinese).

[35] 林昭. 不同色系杜鹃花品种花部性状、花色成分分析和杂交育种试验[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2023.
LIN Z. Analysis of floral traits, flower pigment composition and hybrid breeding experiments of different color cultivars of *Rhododendron*[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2023 (in Chinese).