

## 茶树谷氨酸脱羧酶基因(*GAD*)的原核表达及酶活快速检测

韩洁云, 宛晓春, 邓威威\*

(安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

**摘要:** L-谷氨酸经脱羧酶反应可生成  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA), 此过程受谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 催化。从茶树转录组库中筛选 GAD 基因, 通过 NCBI 比对获得其 cDNA 序列 (GenBank 登录号为 KT728367.1)。序列分析表明, GAD 基因的 ORF 全长为 1 482 bp, 共编码 493 个氨基酸, 该蛋白为细胞质蛋白, 分子量为 55.49 kDa, 理论等电点为 5.44。从舒茶早茶树根部中克隆该基因, 并构建 pMAL-c5X-GAD 表达载体, 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测, 得到分子量约为 55 kDa 的目的蛋白。体外酶活反应后用薄层色谱法 (TLC) 分析, 经 BAW (Butanol:Acetic acid:H<sub>2</sub>O, 4:1:2) 和 75% 苯酚水溶液 (Phenol:H<sub>2</sub>O, 3:1) 2 种展开剂分离酶促产物, 均可检测到 GABA 的生成。通过实时荧光定量 PCR 对 GAD 基因在不同茶树组织的表达水平进行检测, 发现 GAD 在根中表达量最高, 而在芽中表达量最低, 在其他组织中表达各不相同, 其表达具有组织特异性。

**关键词:** 茶树; 谷氨酸脱羧酶; 原核表达; TLC; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)01-0001-05

### Prokaryotic expression of the glutamic acid decarboxylase gene (*GAD*) in *Camellia sinensis* and rapid determination of its enzyme activity

HAN Jieyun, WAN Xiaochun, DENG Weiwei

(State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** L-glutamic acid can be decarboxylated to produce gamma aminobutyric acid (GABA). In this process, glutamic acid decarboxylase(GAD) catalyzed the reaction. Screening of *GAD* from a tea plant transcriptome library was performed and the obtained sequence was compared to NCBI to identify the cDNA sequence (GenBank accession No. KT728367.1). Sequence analysis showed that the ORF (open reading frame) of *GAD* was 1 482 bp, encoding 493 amino acids. And its encoding *GAD* was a cytoplasmic protein with the molecule weight of 55.49 kDa and the pI of 5.44. Cloning of the *GAD* gene in tea plant was carried out and the prokaryotic expression system of pMAL-c5X-*GAD* was built. After IPTG induction, SDS-PAGE result showed that the molecule weight is about 55 kDa. Determination of the enzyme activity in vitro was done using thin-layer chromatography (TLC). The products of this enzymatic reaction were separated by two different TLC solvents, BAW (Butanol: acetic acid: H<sub>2</sub>O, 4:1:2) and 75% phenol (Phenol: H<sub>2</sub>O, 3:1), individually. The product spot of GABA was detected by these two TLC solvents. The expression level of *GAD* in different tea tissues was analyzed using qRT-PCR. The results showed that the highest expression of *GAD* was in the root and the lowest in the bud. The expression of *GAD* showed a tissue specificity phenomenon, whose expression varied in different tissues.

**Key words:** *Camellia sinensis*; glutamic acid decarboxylase; prokaryotic expression; TLC; qRT-PCR

谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD, EC4.1.1.15) 是一种吡哆醛类裂解酶, 广泛分布于动植物、微生物细胞内, 可专一催化谷氨酸脱羧反应生成  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) [1]。GABA 是

重要的抑制性神经递质, 具有降血压、预防癫痫、抗抑郁、抗疲劳、控制哮喘和促进激素分泌等生理功能[2-5]。在食品科学领域, GABA 正作为新资源食品获得广泛关注[6]。近年来, 国内外对 GABA 茶有

收稿日期: 2017-07-02

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1608085QC60) 和国家自然科学基金 (31300576) 共同资助。

作者简介: 韩洁云, 硕士研究生。E-mail: hanjieyun@ahau.edu.cn

\* 通信作者: 邓威威, 副教授。E-mail: dengweiwei@ahau.edu.cn

较多的研究,主要集中在 GABA 茶加工过程中的处理温度、处理时间、气体种类等外部条件的优化<sup>[7]</sup>,而对 GAD 代谢过程影响 GABA 合成的研究报道较少。Tsushida 和 Murai 给茶叶饲喂 50 mmol·L<sup>-1</sup> [<sup>15</sup>N] L-谷氨酸并在厌氧条件下培育 6 h,在叶片中检测到有大量 [<sup>15</sup>N] GABA 生成,从而证明茶叶 GABA 来源于 L-谷氨酸<sup>[8]</sup>,此过程的关键酶是谷氨酸脱羧酶。

本实验从茶树品种舒茶早根部中克隆 GAD 基因,通过构建重组子在大肠杆菌中诱导表达。添加底物谷氨酸进行体外酶活检测,观察是否有脱羧产物 GABA 的生成。对产物 GABA 的测定主要有酶法、高效液相色谱法、毛细管气相色谱法、色质联用法、柱层析荧光定量法和氨基酸自动分析及电泳法等<sup>[9]</sup>,这些方法检测周期较长且试剂价格昂贵。本实验采用快速便捷的薄层色谱法(TLC),分别用两种展开剂进行层析分离酶促产物,从而快速检测 GAD 酶活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

成年茶树舒茶早芽(bud)、第1叶(the first leaf, FL)、第2叶(the second leaf, SL)、成熟叶(mature leaf, ML)、茎(stem)和根(root)采自安徽舒城德昌苗木培育基地,液氮冷冻后置于-80℃冰箱保存备用。

### 1.2 试剂与仪器

RNAprep pure Plant Kit 购自 TIANGEN 公司, PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time、*rTaq* 酶、T4 DNA Ligase Polymerase、SYBR Premix Ex *Taq* II 购自 Takara 公司, KOD-Plus-Neo 高保真酶购自 TOYOBO 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,限制性内切酶 *Bam*H I 与 *Hind* III 购自 NEB 公司, Plasmid Miniprep Purification Kit、pEASY-Blunt Zero 克隆载体、Trans1-T1 菌株、BL21 (DE3) 菌株购自 TRANS 公司, pMAL-c5X 表达载体由本实验室提供。

氨基青霉素、IPTG、甲叉聚丙烯酰胺、过硫酸胺(Aps)、四甲基二乙胺(TEMED)、Tris-HCl、购自上海生工生物工程有限公司,考马斯亮蓝 G-250、二硫苏糖醇(DTT)、MgCl<sub>2</sub>、Glu、GABA、茚三酮购自 Solarbio 公司,薄层层析 G254 硅胶板购自青岛海洋化工有限公司,正丁醇、乙酸、苯酚等试剂均为国产分析纯。

PCR 仪、凝胶成像系统、荧光定量 PCR 仪,

Bio-Rad 公司;电热恒温培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;HNY-2102C 立式恒温摇床,天津欧诺仪器仪表有限公司;紫外分光光度计、高速冷冻离心机,贝克曼公司;超声波细胞粉碎机,宁波新芝科器研究所;DK-8D 电热恒温水槽,上海一恒科技有限公司;层析缸,青岛海洋化工有限公司。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 登陆的 GAD 基因全长 cDNA 序列,找出其完整的 ORF(开放阅读框),利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性引物: *GAD-F* (5'-A TGGTTCTCTCAAAGACTGCTTCAGA-3'); *GAD-R* (5'-CTAGCAAATCACTTGTGTTTTCTAG C-3')。

经过多克隆酶切位点分析,分别在上下游引物加入 *Bam*H I 与 *Hind* III 酶切位点序列及保护碱基: *GAD-Bam*H I-F (5'-GGGATCCATGGTTCTCTCAA AGAC TGC-3'); *GAD-Hind* III-R (5'-GAAGCTTC TAGCAAATCACTTGTGTTT-3')。

根据荧光定量 PCR 的引物设计原则,对 GAD 基因进行引物设计,同时选择茶树中甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)为内参基因设计 qRT-PCR 引物: *GAD-RT-F* (5'-CGGAGCCAATGTTTCAGGTATG-3'); *GAD-RT-R* (5'-TCCCATCCAGTTTGCTTGTTTC-3'); *GAPDH-F* (5'-TTGGCATCGTTGAGGGTCT-3'); *GAPDH-R* (5'-CAGTGGGAACACGGAAAGC-3')。

### 1.4 方法

**1.4.1 茶树谷氨酸脱羧酶基因的扩增** 采用改良的 CTAB 法<sup>[10]</sup>提取舒茶早茶树根中总 RNA,按照 Takara 公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录,以获取的 cDNA 作为模板。使用 KOD-Plus-Neo 高保真酶对特异性引物 *GAD-F* 和 *GAD-R*,按照以下条件进行 PCR 扩增: 94℃ 2 min; 98℃ 10 s, 59℃ 30 s, 68℃ 45 s, 30 个循环; 68℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,对目的条带按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行回收纯化。

将纯化后的目的基因导入 pEASY-Blunt Zero 克隆载体,转化至 Trans1-T1 克隆菌株,挑取阳性单克隆送至通用公司测序。对测序结果正确的菌株进行质粒提取,以目的基因质粒为模板,使用 KOD-Plus-Neo 高保真酶对加酶切位点特异引物 *GAD-Bam*H I-F 和 *GAD-Hind* III-R 进行 PCR 扩增。回收纯化目的条带后,与 pEASY-Blunt Zero 克隆载体连接,转化至 Trans1-T1 克隆菌株,挑取阳性单克隆进行测序。

**1.4.2 pMAL-c5X-GAD 原核表达载体的构建及诱导**

表达 对测序验证无误的目的基因质粒和 pMAL-c5X 表达载体质粒, 分别用 *Bam*H I 与 *Hind* III 限制性内切酶进行双酶切, 再用 T4 DNA 连接酶将目的基因与 pMAL-c5X 表达载体在 16℃ 水浴条件下连接过夜, 将重组质粒命名为 pMAL-c5X-*GAD*。将重组质粒转化至表达菌株 BL21 (DE3), 用加入 Amp<sup>+</sup> 抗性的 LB 固体培养基进行阳性克隆的筛选并测序验证。挑取阳性菌落, 接种于 5 mL 加 Amp<sup>+</sup> 抗性的 LB 液体培养基中, 在 37℃、200 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养过夜。次日以 1:50 (V/V) 转入 LB 液体培养基扩大培养, 至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8, 取诱导前菌液 1 mL 后加入终浓度为 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG, 在 16℃、110 r·min<sup>-1</sup> 条件下诱导 20 h, 同时设置 pMAL-c5X 空载体为对照。

诱导结束取 1 mL 诱导后菌液, 4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 收集表达菌体, 用 1×PBS 重悬菌体, 在冰浴中超声破碎 (超声时间 3 s, 间歇时间 3 s, 总时间 90 次)。4℃、7 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 分别取 80 μL 破碎后上清和用 1 mL 的 1×PBS 重悬破碎后沉淀, 加 20 μL 5×PBS buffer, 沸水煮 5 min 得到诱导后上清和诱导后沉淀蛋白样。用相同方法制备诱导前和诱导后蛋白样, 进行 SDS-PAGE 分析, 采用考马斯亮蓝法染色 1~2 h, 过夜脱色后观察结果。

**1.4.3 TLC 法快速检测 *GAD* 体外酶活** 离心收集 100 mL 诱导后菌体, 1×PBS 重悬菌体后在冰浴中超声破碎, 低温高速离心取上清为粗酶液。酶促反应体系中加入终浓度为 30 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl (pH 7.6), 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的 MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 DDT 和 20 mmol·L<sup>-1</sup> 的底物 Glu, 再加入粗酶液定容至 2 mL, 充分混匀。以空载体诱导后提取的粗酶液作为对照, 在 37℃ 水浴中反应 4 h 后 100℃ 终止反应 5 min, 离心取上清。

采用 TLC 法快速测定 *GAD* 脱羧产物 GABA<sup>[11-14]</sup>。以 BAW (Butanol : Acetic acid : H<sub>2</sub>O, 4:1:2) 和 75% 苯酚水溶液 (phenol : H<sub>2</sub>O, 3:1) 为展开剂, 0.2% 的茚三酮为显色剂, 分别取 1 μL 20 mmol·L<sup>-1</sup> 的底物 Glu、标准品 GABA、酶促产物和空载体对照, 在 2 种展开剂中分别进行薄层层析。

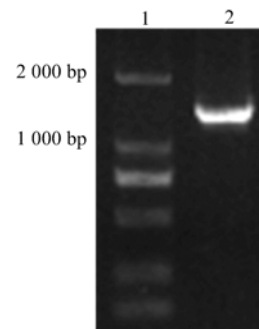
将配好的展开剂置于层析缸中密闭饱和和备用, 在层析硅胶板距顶端约 0.5~1.0 cm 处用毛细管进行点样, 待所有样品点晾干后, 将点样端放入盛有展开剂的层析缸中, 展开剂液面需低于样品点, 进行密闭展开。当带有样品的展开剂到达层析板另一端约 0.5~1 cm 时, 取出层析硅胶板并晾干, 均匀喷洒显色剂, 置于 100℃ 烘箱, 显色后观察。

**1.4.4 茶树各组织中 *GAD* 表达分析** 采用 1.4.1 中相同方法提取舒茶早茶树的芽、第 1 叶、第 2 叶、成熟叶、茎和根中总 RNA, 参照 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒定量反转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 分析 *GAD* 在茶树不同组织的表达情况, 以茶树中甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 为内参基因, 所用引物见 1.3。反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, 上下游引物各 0.8 μL, cDNA 模板 1.6 μL, 补足 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20 μL; 反应程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 39 个循环; 95℃ 延伸 10 min。每个组织样品设置 3 个生物学重复, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 法分析 *GAD* 相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GAD* 的扩增及原核表达载体的构建

以舒茶早根部 cDNA 为模板, 用特异性引物进行 PCR 扩增, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带长度与目的基因序列长度一致, 片段大小在 1 500 bp 左右 (如图 1)。将扩增得到的 *GAD* 导入 pEASY-Blunt Zero 克隆载体进行测序, 与已知序列比对结果相似度为 100%。对 *GAD* 质粒和 pMAL-c5X 表达载体质粒进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶过夜连接后转化至大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 经 Amp<sup>+</sup> 抗性筛选, 挑阳性单克隆测序验证。序列比对结果显示, 插入序列无误且没有出现移码, 原核表达载体 pMAL-c5X-*GAD* 构建成功。



1. DNA 分子量标准; 2. 扩增产物

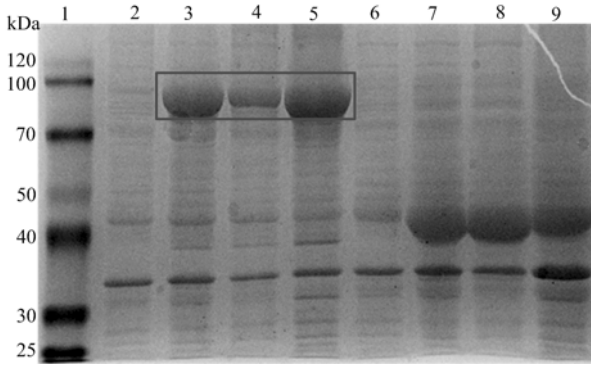
1. DNA Marker; 2. PCR product

图 1 *GAD* 扩增产物凝胶电泳检测

Figure 1 Agarose gel electrophoresis product of *GAD*

### 2.2 *GAD* 重组蛋白在大肠杆菌中的表达及体外酶活性检测

将重组质粒 pMAL-c5X-*GAD* 转化至大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 在 16℃、110 r·min<sup>-1</sup> 条件下经 IPTG 诱导 20 h, 以 pMAL-c5X 空载体为对照, 分别对总蛋白、可溶性蛋白与包涵体蛋白的表达情



1.蛋白质分子量标准; 2-5.pMAL-c5X-GAD 诱导前、诱导后、破碎上清、破碎沉淀; 6-9.pMAL-c5X 空载体诱导前、诱导后、破碎上清、破碎沉淀

1. Protein marker; 2-5. pMAL-c5X-GAD before induction; after induction; supernatant of lysate after sonication; precipitation of lysate after sonication; 6-9. pMAL-c5X before induction; after induction; supernatant of lysate after sonication; precipitation of lysate after sonication

图 2 谷氨酸脱羧酶基因蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析  
Figure 2 SDS-PAGE analysis of fusion protein GAD

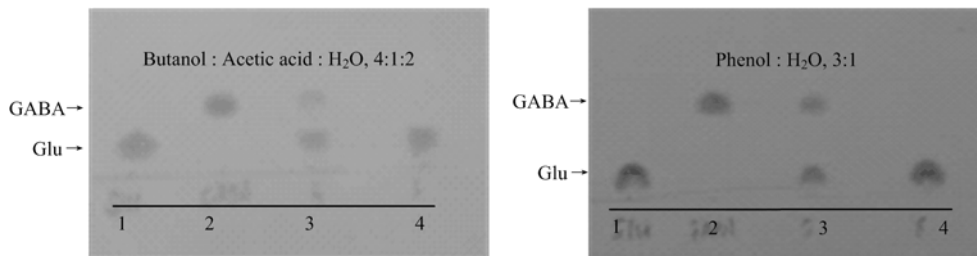
况进行 SDS-PAGE 分析。如图 2 所示: pMAL-c5X-GAD 诱导前无蛋白表达,与 pMAL-c5X 空载体相比其总蛋白、可溶性蛋白与包涵体蛋白均出现一条明

显的外源蛋白条带,蛋白大约为 95 kDa 左右。除去 40 kDa 的标签蛋白 MBP,可得出实际诱导的 GAD 目的蛋白大约为 55 kDa,与理论值 55.49 kDa 相符。

由于 GAD 蛋白具有可溶性,对重组表达菌株进行诱导后低温高速离心收集菌体,用 1X PBS 重悬后冰浴超声破碎得到的上清即为粗酶液(可溶性蛋白)。在适宜的酶促反应缓冲液中向粗酶液添加  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的底物 Glu,  $37^\circ\text{C}$  水浴反应 4 h。以相同处理的 pMAL-c5X 空载体粗酶反应产物为对照,以 GABA、Glu 标准品为参考,运用 TLC 方法进行体外酶活性检测。结果如图 3 所示,pMAL-c5X-GAD 体外酶反应产物中检测到其底物 Glu 含量有所下降,并且有脱羧产物 GABA 生成;而做相同处理的 pMAL-c5X 空载体中未检测到 GABA。该结果表明茶树中谷氨酸脱羧酶具有脱羧功能。

### 2.3 茶树各组织中 GAD 表达分析

图 4 表明,茶树各组织中 GAD 均有不同程度的表达:根>茎>成熟叶>第 2 叶>第 1 叶>芽。茶树根中 GAD 表达水平最高,茎中其次,芽中最低。随茶树新梢发育程度加深,GAD 表达水平呈上升趋势。

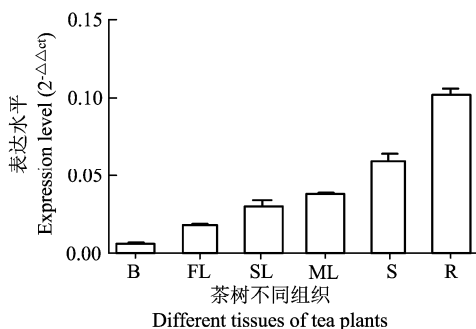


1. Glu; 2. GABA; 3. pMAL-c5X-GAD 体外酶反应产物; 4. pMAL-c5X 空载体

1. Glu; 2. GABA; 3. Products detection of enzymatic assays with recombinant pMAL-c5X-GAD; 4. pMAL-c5X

图 3 TLC 分析 GAD 体外酶活性

Figure 3 In vitro enzymatic activity analysis of GAD by TLC



B: 芽 Bud; FL: 第 1 叶 First leaf; SL: 第 2 叶 Second leaf; ML: 成熟叶 Mature leaf; S: 茎 Stem; R: 根 Root

图 4 谷氨酸脱羧酶 (GAD) 基因在茶树中不同组织中表达  
Figure 4 The expression profile of GAD in *Camellia sinensis* of different tissues of tea plant

## 3 结论

本实验从舒茶早茶树中克隆了 GAD,该基因 cDNA 的 ORF 全长为 1 482 bp,共编码 493 个氨基酸,其蛋白为细胞质蛋白,分子量为 55.49 kDa,理论等电点为 5.44。成功构建了 pMAL-c5X-GAD 重组表达载体,诱导表达出分子量约为 55 kDa 的目的蛋白,该蛋白与预测的蛋白分子量一致。谷氨酸脱羧酶在大肠杆菌中表达成功,将其破碎提取粗酶进行酶促反应。通过薄层色谱检测到 GAD 脱羧产物 GABA,说明茶树中谷氨酸脱羧酶具有脱羧功能。同时,对茶树各组织中 GAD 基因的表达水平分析,结果显示该基因属于组成型表达,具有明显的组织

表达特异性。本研究对于全面了解茶树谷氨酸脱羧酶的生物学功能具有重要意义, 并提供了一种新的酶活性尤其是产物 GABA 的快速检测方法。

### 参考文献:

- [1] 许建军, 江波, 许时婴. 谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的研究进展[J]. 食品工业科技, 2004, 25(7): 132-133.
- [2] 胡伟, 杨晓颖, 李美英, 等. 香蕉谷氨酸脱羧酶基因克隆与表达[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 429-434.
- [3] 李敬蕊, 田真, 吴晓蕾, 等. 小白菜 GAD 基因克隆及高氮条件下外源 GABA 的诱导表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(8): 1217-1227.
- [4] SHIMADA M, HASEGAWA T, NISHIMURA C, et al. Antihypertensive effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study[J]. Clin Exp Hypertens, 2009, 31(4): 342-354.
- [5] 杨帆, 金迪, 蔡东联, 等.  $\gamma$ -氨基丁酸茶对小鼠抗疲劳作用的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(2): 60-63.
- [6] 梁恒宇, 邓立康, 林海龙, 等. 新资源食品: $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(15): 119-123.
- [7] 廖明星. 茶叶中  $\gamma$ -氨基丁酸富集技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2004: 54-55.
- [8] TSUSHIDA T, MURAI T. Conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(11): 2865-2871.
- [9] 吴春兰, 黄亚辉. 不同茶树品种  $\gamma$  氨基丁酸含量及谷氨酸脱羧酶活性的研究[J]. 广东茶业, 2011 (5): 19-21.
- [10] 史成颖, 宛晓春, 江昌俊. 提取高质量茶树总 RNA 的方法研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 306-363.
- [11] 杨四润, 张冬莲, 方乔慧, 等.  $\gamma$ -氨基丁酸茶薄层检测方法建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(1): 33-39.
- [12] 赵宏飞, 宋伟, 裴家伟, 等. 食品中三种  $\gamma$ -氨基丁酸检测方法比较[J]. 中国乳品工业, 2008, 11(36): 51-55.
- [13] 黄亚辉, 曾贞, 郑红发, 等. GABA 茶中  $\gamma$ -氨基丁酸的 TLC 测定及提纯研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 11-15.
- [14] 张晖, 徐永, 姚惠源. 纸层析法定量测定米胚芽中的  $\gamma$ -氨基丁酸[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(3): 101-103.