



茶树谷氨酰胺合成酶同源基因的克隆及表达分析

史成颖, 李正国, 徐 乾, 李海婧, 汤之近, 邓威威, 宛晓春*

(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: 在实验室前期构建 cDNA 幼根文库获得谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS, EC 6.3.1.2)同源序列(contig48)的基础上设计引物, 通过 SMART RACE 技术克隆了该基因 cDNA 全长序列(命名为 GS1-2, GenBank 登录号: JQ925873.1)。结果显示: (1) GS1-2 基因全长为 1 710 bp, 开放阅读框长 1 071 bp, 编码 356 个氨基酸, 预测蛋白分子质量为 39.3 kD, 理论等电点为 5.65; 核酸序列分析表明, GS1-2 基因与从安吉白茶中克隆的茶氨酸合成酶基因相似性为 99%。(2) 将 GS1-2 基因克隆至原核表达载体 pET-32a 和 pMAL-c5x, 转化至大肠杆菌, IPTG 诱导表达融合蛋白, SDS-PAGE 检测结果表明, pET-32a-CsGS1-2 转至 Rosetta 中诱导表达的蛋白与预测蛋白大小一致, 主要以包涵体形式存在; 而 pMAL-c5x-CsGS1-2 转化大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达可产生可溶性蛋白。(3) 进一步构建茶树 GS1-2 酵母表达载体 pYES-DEST52-CsGS1-2 并转化至酿酒酵母(WAT11)菌液中, 添加底物(谷氨酸钠 100 $\mu\text{mol/L}$ 和盐酸乙胺 500 $\mu\text{mol/L}$)震荡培养并离心, UPLC-MS 测定酶反应产物结果初步表明, 目的蛋白不能催化盐酸乙胺和谷氨酸钠合成茶氨酸, 但可以合成谷氨酰胺。

关键词: 茶树; 谷氨酰胺; 茶氨酸; 基因克隆; 原核表达; 酵母表达; 酶活性

中图分类号: Q785; Q786; Q789

文献标志码: A

Clone and Expression of GS Homologue of Tea Plant (*Camellia sinensis*)

SHI Chengying, LI Zhengguo, XU Qian, LI Haijing,

TANG Zhijin, DENG Weiwei, WAN Xiaochun*

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

Abstract: In this study, based the homologous sequence of glutamine synthetase (contig48) screened out from young root cDNA library, we designed primers and cloned its full length (named as GS1-2, GenBank accession number: JQ925873.1) using SMART RACE. The results indicated that: (1) the full-length cDNA of GS1-2 is 1 710 bp with an open reading frame (ORF) of 1 071 bp, encoding 356 amino acids with deduced molecular weight of 39.3 kD and theoretical pI value of 5.65. The result of amino acid sequence alignment in NCBI indicated that it has high similarity with the cloned theanine synthetase from Anji white tea. (2) The gene was cloned into prokaryotic expression vector pET-32a and pMAL-c5x, which was further transformed into *Escherichia coli* Rosetta and BL21 to induce fusion protein with IPTG, respectively. The SDS-PAGE results showed that: after induction with IPTG, an insoluble inclusion body would be pro-

收稿日期: 2016-10-25; 修改稿收到日期: 2016-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(31170283, 31300576)

作者简介: 史成颖(1969—), 女, 博士, 编审, 主要从事茶树次生代谢研究和学报编辑。E-mail: shichengying@ahau.edu.cn

* 通信作者: 宛晓春, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事茶叶次生代谢研究。E-mail: xcwan@ahau.edu.cn

duced in *E. coli* Rosetta using the pET-32a expression vector, while a soluble protein could be induced in *E. coli* BL21(DE3) using the pMAL-c5x expression vector. (3) After the yeast expression vector pYES-DEST52-CsGS1-2 was constructed by Gateway technology, the gene was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* (WAT11), and with addition of substrates in medium, the glutamine concentration in strains with pYES-GS1-2 vector transformant was twice as high as that containing the pYES empty vector transformant using UPLC-MS analysis. The preliminary result suggested that the GS1-2 is capable of synthesizing glutamine instead of theanine.

Key words: tea plant; glutamine; theanine; gene clone; prokaryotic expression; yeast expression; enzymatic activity

茶是世界重要的经济作物,含有多种次生代谢物质,包括多酚类、茶氨酸和生物碱等^[1]。其中,茶氨酸作为谷氨酰胺的乙酰化衍生物,是茶树特有的次级代谢产物和茶树特征性的非蛋白质氨基酸。作为茶叶的呈味物质之一,茶氨酸对于茶叶滋味、品质有着重要的影响^[2]。同时,茶氨酸以非毒性形式储存和转运茶树中的氮。茶氨酸和谷氨酰胺在茶树初步的氮同化过程中起着重要作用^[3]。

已有研究结果表明,茶氨酸主要合成于茶树根部,从根部通过木质转运至芽叶^[4-6],但目前对茶树中茶氨酸的合成机理还知之甚少。2006年 Okada 等利用具有类似活性的细菌谷氨酰胺合成酶的一部分已知序列,即基于谷氨酰胺合成酶基因保守区域设计兼并引物从茶树嫩叶中克隆出 2 条茶氨酸合成酶序列(GenBank 登录号为 DD410985 和 DD410986),原核表达后具有茶氨酸合成酶活性并申请了专利^[7]。这 2 条茶氨酸合成酶与茶树细胞质中谷氨酰胺合成酶相似性极高,DD410985 与茶树细胞质中克隆的 CsGS1;1(*Camellia sinensis* GS1;1, AB115183)具有 97%相似性,DD410986 与茶树胞质中克隆的 CsGS1;3 (AB117934)具有 99%相似性,极可能就是谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)家族成员。此外,目前国内外研究者主要利用微生物中谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺酶、 γ -酰基转移酶及 γ -谷氨酰甲胺合成酶等,采用生物发酵法催化 L-谷氨酸或 L-谷氨酰胺合成茶氨酸^[8-14]。因此,茶树中合成的茶氨酸到底是谷氨酰胺合成酶或 γ -酰基转移酶等在特定条件下合成还是由专一茶氨酸合成酶合成还有待进一步研究。目前国内外研究者利用 cDNA 文库中筛选谷氨酰胺合成酶同源序列,或利用茶氨酸含量有差异的材料进行 cDNA-AFLP 及局部微阵列分析,希望获得茶氨酸合成相关基因^[15-16]。本课题组为挖掘茶氨酸合成相关的基因,在茶苗培养液中添加盐酸乙胺提取幼根 RNA 构建的茶树幼根 cDNA 文库中筛选出 2 条与

植物胞质谷氨酰胺合成酶同源性高的序列 *Contig47* 和 *Contig48*^[17]。

本研究通过 RACE 方法克隆了序列 *contig48* 的全长(命名为 GS1-2),利用生物信息学分析蛋白质信息,并将其 ORF 重组到表达载体 *pET-32a* 和 *pMAL-c5x*,分别导入细菌 *Rosetta* 和 *BL21(DE3)* 中进行原核表达。此外,利用 TOPO 定向克隆技术构建入门克隆,与 *pYES-DEST52* 载体交换获得重组表达质粒,测序正确后转化至真核酵母(WAT11),利用 UPLC-MS 分析可溶性蛋白酶活,以期阐明茶树氮代谢和茶氨酸代谢机理提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

茶树品种‘舒茶早’茶苗购自舒城 916 茶场,1 芽 2 叶采后液氮迅速冷冻处理,然后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 合成 总 RNA 的提取参照文献[18]并利用 RNA 试剂盒(天根)进一步纯化。以提取所得茶树总 RNA 为模板, Oligo(dT) 18 为引物,按 PrimeScriptII RTase(大连 TaKaRa)反转录酶操作说明书合成 cDNA 第 1 链。

1.2.2 基因全长的克隆及序列分析 运用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,以茶树幼根 cDNA 文库测序所得的 GS1-2 EST 序列设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异引物(表 1),以茶树 cDNA 为模板,利用高保真 DNA 聚合酶扩增目的基因。扩增体系和反应程序按 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit(北京 Clontech),采用嵌套方法进行。将非嵌套 PCR 产物稀释 100 倍后作为嵌套 PCR 反应模板,利用 DNAMAN 软件进行序列比对和拼接。cDNA 全长扩增体系为:cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, $5\times$ PS 缓冲液 $10\text{ }\mu\text{L}$, 全长 cDNA 扩增引物 GS1-2-P5/P6

表 1 GS1-2 基因全长克隆及验证引物

Table 1 Primers for clone of gene full length of GS1-2 and verification

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence(5'→3')	用途 Purpose
P1	TTGTGGGTGGCTCGTTACATCCTTGA	3'-RACE 非嵌套引物 GSP2 PCR primer for 3'-RACE
P2	TCAGGGTCGGGAGGGACACAGAGAA	3'-RACE 嵌套 nGSP2 Nested PCR primer for 3'-RACE
P3	CGCTAACGCTGTGTTTGATTGGGAGA	5'-RACE 非嵌套引物 GSP1 PCR primer for 5'-RACE
P4	CCATAAGAAGGTGTTGATGTCGGCGG	5'-RACE 嵌套引物 nGSP1 Nested PCR primer for 5'-RACE
P5	AAGCAGTGGTATCAACGCA	全长验证正向引物 Forward primer for full-length verification
P6	CGAGAACACAAACAGAGCCT	全长验证反向引物 Reverse primer for full-length verification

(10 μmol/L)各 1 μL,dNTP 4 μL(各 2.5 mmol · L⁻¹, TaKaRa),PrimerSTAR 酶 (TaKaRa) 0.5 μL,加 ddH₂O 至总体积 50 μL。PCR 扩增反应程序为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 10 s,68 ℃ 退火 3 min,共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物胶回收加“A”再次胶回收后连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa),转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5a,测序由 Invitrogen 公司完成。

通过设计嵌套引物的方法进行 RACE,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测、胶回收、TA 克隆后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。序列分析后,利用 DNASTar 序列分析软件对获得的 cDNA 序列进行开放阅读框(ORF)和氨基酸序列预测;运用在线分析软件(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)分析氨基酸序列及理化性质;通过 ExPASy 网站的 ProtParam tool 在线预测编码蛋白特征;在 NCBI 网站进行在线比对分析;利用 ClustalW 进行同源性分析;利用 MEGA 5.0 软件进行系统进化分析。

1.2.3 酶基因表达载体的构建及原核表达 (1) pET-32a-CsGS1-2 表达载体构建 根据 GS1-2 验证后正确的全长序列设计 ORF 序列特异引物 F(5'-CCGGAATTCATGTCTTTGCTATCAGATCTC-3', *Eco*R I 酶切位点)和 R(5'-CTGGTCGACTG-GCTTCCACAGCAGAGTGGT-3', *Sal* I 酶切位点),与同样双酶切的 pET-32a 载体连接后导入 DH5a 感受态细胞中培养,选取与 ORF 一致的重组子转化导入到 Rosetta 宿主菌(TRANS)中。

(2)pMAL-CsGS1-2 表达载体构建 运用 In-fusion 方法并根据表达载体 pMAL-c5x 载体的特点设计引物 F(5'-CCGCGATATCGTCGACATGTCTTTGCTATCA-3')和 R(5'-ATTCGGATC-CGTCGACTCATGGCTTCCACAG-3')。首先将 pMAL-c5x 单酶切,造成缺口,然后与载体部分互补

的 RT-PCR 产物相连构建原核表达载体。将构建的重组表达载体转化入 BL21(DE3)后,用菌落 PCR 及测序验证其正确性。

(3)基因原核表达 挑取阳性单菌落接种 3 mL LB 培养基(Amp⁺)中,37 ℃ 过夜(12 h)振荡培养。将过夜培养的菌液,以 1 : 100 比例接种至 100 mL LB 培养基(Amp⁺),继续培养 3 h (*OD*₆₀₀ ≈ 0.8),加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol · L⁻¹,37 ℃ 继续振荡培养 4 h,28 ℃ 诱导表达 8 h。收集菌体进行 SDS-PAGE 分析,观察重组蛋白表达情况。分别以未连接目的基因的 pET-32a 空载体及 pMAL-c5x 空载体作为对照。

1.2.4 真核表达载体的构建及活性检测 (1) 真核表达载体构建 根据 pENTR™ TOPO® 载体 (Invitrogen) 说明书,设计引物 F(5'-CACCATGTCTTTGCTATCAGATCTC-3')和 R(5'-TG-GCTTCCACAGCAGAGTGGT-3')。5' 端加上 4 个碱基 CACC,使扩增后目的基因 5'端含有 CACC 序列。利用定向 TOPO® 克隆技术构建入门载体 pENTR-CsGS1-2。然后与表达载体 pYES-DEST52 Gateway™ Vector (Invitrogen) 进行 LR 反应,产生重组表达质粒 pYES-CsGS1-2。将测序正确的重组表达质粒转化至酿酒酵母 WAT11 感受态细胞后均匀涂布于 SD-U 固体培养基上,置于 30 ℃ 培养箱中 48~72 h,直至长出酵母单菌落。

(2)真核诱导表达 挑取阳性克隆酵母菌株接种于 10 mL SD-U 葡萄糖培养基中,30 ℃ 振荡培养至 *OD*₆₀₀ 值为 1.0 左右,3 000 g 离心收集菌体,加入含 2%半乳糖的 SD-U 诱导培养基 5 mL 重悬菌体,重复离心及弃上清步骤 3 次,洗去培养基中残留的葡萄糖,最后用诱导培养基重悬菌体至 *OD*₆₀₀ 值为 0.6 左右,30 ℃、200 r/min 振荡培养 5 h。

(3)酶活检测 从未加底物前的培养基中取 2 mL 培养液,加入等体积甲醇,离心后过滤取上清作

为 pYES-GS1-2 转化子及 pYES 空载体起始样,诱导 6 h 后加入反应底物(终浓度谷氨酸钠为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、盐酸乙胺为 $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),继续培养 12 h;取诱导培养 6 h 后的培养基 2 mL,加入等体积甲醇,12 000 r/min 离心取上清,0.22 μm 滤膜过滤,作为 pYES-CsGS1-2 转化子及 pYES 空载体诱导反应结束样,样品-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

UPLC-MS 检测并验证样品上述 4 个样品中的茶氨酸及谷氨酰胺。UPLC-QQQ-MS 检测反应产物,用安捷伦的 MassHunter 软件收集和处理数据,通过比较 pYES-CsGS1-2 转化子及 pYES 空载体添加底物诱导 6 h 前后的差值计算谷氨酰胺生成量。

液相条件:液相柱 Phenomenex Kinetex XB-C₁₈,粒径 1.7 μm ,2.1 $\times$ 100 mm;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量 2 μL ,超高效液相色谱 1 200(Agilent)。A 相:0.1%乙酸;B 相:100%乙腈;流速:0.1 mL/min。

质谱条件:三重四级杆串联质谱,离子源为电喷雾(ESI⁺),扫描方式为母离子扫描,多反应监测(MRM),毛细管电压 3.5 kV,离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 茶树谷氨酰胺合成酶同源基因全长的克隆及序列分析

利用非嵌套和嵌套 PCR 方法,获得了 CsGS1-2 的 3'-RACE 和 5'-RACE 嵌套产物,并用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。测序结果(图 1)显示通过 5'-RACE 扩增获得 1 127 bp 片段,通过 3'-RACE 扩增获得 583 bp 片段。将 3'-RACE 和 5'-RACE 产物测序所得序列和已知的 EST 序列通过 DNAMAN 进行拼接,获得大小为 1 710 bp cDNA 全长序列。

根据拼接的全长序列设计引物(表 1),RT-PCR 进行全长验证。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测(图 2),将获得的片段和 pMD18-T 载体连接并克隆转化测序,然后与所得的拼接全长序列进行比对,获得验证后的 CsGS1-2 基因序列。将产物测序后加上引物外侧的核苷酸序列,得到该基因的 cDNA 全长序列,共 1 710 bp(GenBank 登录号为 JQ925873.1)。

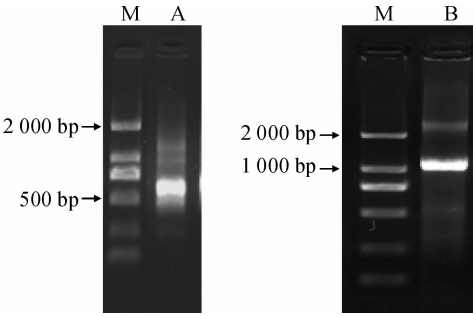
生物信息学分析显示 GS1-2 ORF 全长为 1 071 bp,共编码 356 个氨基酸,蛋白质分子量为 39.3 kD,理论等电点为 5.65。GS1-2 蛋白为亲水性非分泌不稳定蛋白,存在于过氧化物酶体,不跨膜运动,无信号肽序列存在,共有 27 个可能的磷酸化位点,其中,色氨酸(Ser)可能的磷酸化位点共有 15 个,苏氨酸(Thr)可能的磷酸化位点有 7 个,酪氨酸(Tyr)

可能的磷酸化位点有 5 个。基因分子进化分析表明其与葡萄亲缘关系较近。构建 GS1-2 与其他植物谷氨酰胺合成酶蛋白质序列进化树结果(图 3)表明,GS1-2 跟葡萄亲缘关系最近。进一步在 GenBank 中比对发现与安吉白茶的茶氨酸合成酶氨基酸序列(登录号 JN226569.1)相似性达 99%。

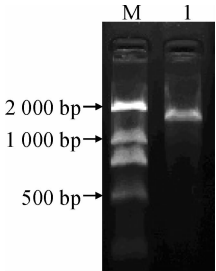
2.2 茶树谷氨酰胺合成酶同源基因 GS1-2 的原核表达

2.2.1 pET-32a-CsGS1-2 原核表达及蛋白检测
将纯化后的目标产物与 pET-32a 载体(已酶切)连接,获得重组质粒,菌落 PCR 验证,结果(图 4)显示重组质粒的 PCR 产物大小为 1 000 bp 以上,与 GS1-2 阅读框(ORF)扩增产物大小一致。

将构建好的表达载体 pET-32a-CsGS1-2 转入表达菌株 Rosetta,1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG、37 $^{\circ}\text{C}$ 、4 h 诱导表达,然后进行细胞总蛋白分析,10%分离胶 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。结果(图 5)显示 IPTG 诱导后含有 pET-32(a)-CsGS1-2 重组质粒的 Rosetta 表达菌株有明显的新蛋白条带,而对照只含空载体质粒的表达菌株除了分子标签蛋白条带外无新蛋白条带出现。GS1-2 基因编码蛋白质的分



A. 3'-RACE; B. 5'-RACE; M. DL2000
图 1 GS1-2 嵌套 PCR 产物的电泳检测
Fig. 1 Electrophoresis analysis of GS1-2 product by nested PCR



M. DL2000; 1. GS1-2 全长 GS1-2 full length
图 2 GS1-2 基因全长 PCR 产物的电泳检测
Fig. 2 Electrophoresis analysis of PCR product of GS1-2 full length

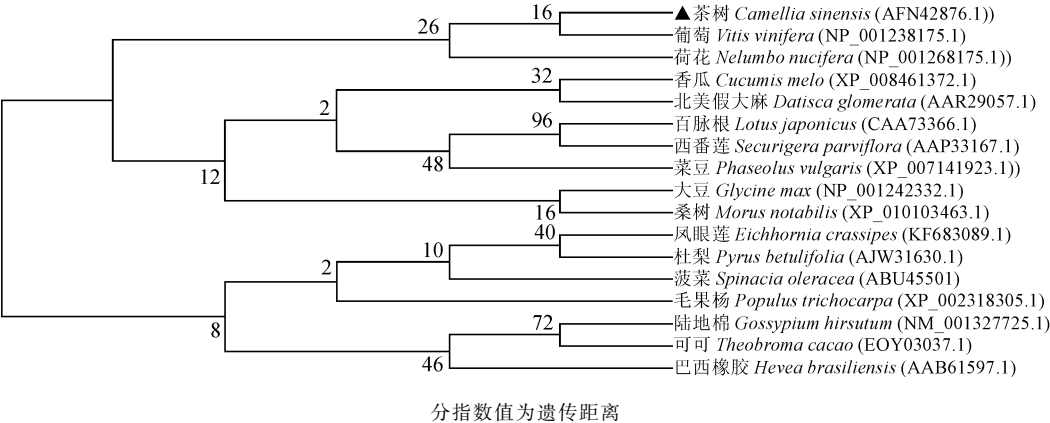


图 3 茶树 GS1-2 蛋白质与其他植物 GS 蛋白系统进化树
The values in the fig. mean genetic distance

Fig. 3 Phylogenetic tree of GS1-2 amino acid sequences from *Camellia sinensis* and other plant species

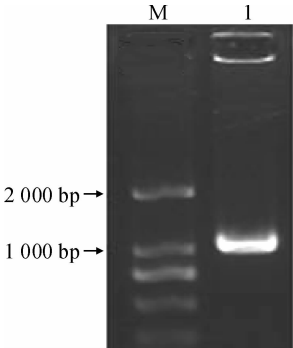
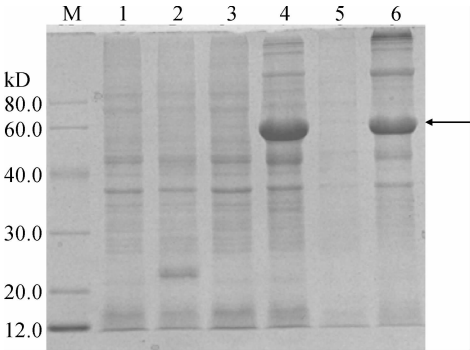


图 4 pET-32a-CsGS1-2 菌落 PCR 产物的电泳检测
Fig. 4 Electrophoresis analysis of colony PCR product of pET-32a-CsGS1-2



1. 诱导前空载体;2. 诱导后空载体;3. 诱导前重组载体;4. 诱导后重组载体;5. 诱导后上清;6. 诱导后沉淀;M. 标准蛋白分子量;箭头为 GS1-2 蛋白条带
图 5 pET-32a-CsGS1-2 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析
1. Empty vector before induction; 2. Empty vector after induction; 3. Recombinant vector before induction; 4. Recombinant vector after induction; 5. Supernatant of pET-32a-CsGS1-2 after induction; 6. Precipitation of pET-32a-CsGS1-2 after induction; M. Protein marker; the arrow points to the GS1-2
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of fusion protein pET-32a-CsGS1-2

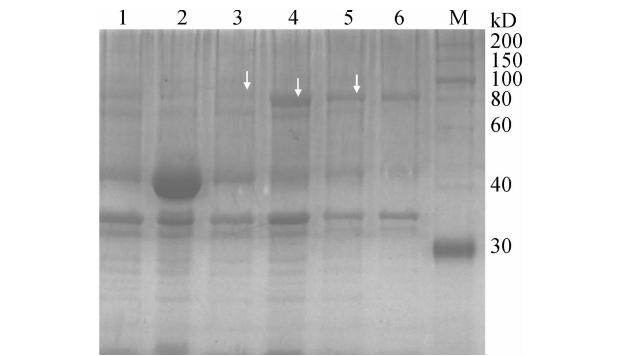
子量理论值为 39.3 kD,而空载 pET32a 表达的蛋白分子量为 19.5 kD,由此推测出 GS1-2 基因表达的融合蛋白分子量约为 59 kD,这与 SDS-PAGE 显示的表达蛋白大小基本一致。融合蛋白以包涵体形式存在于沉淀中,无法进一步进行活性测定。

2.2.2 pMAL-CsGS1-2 原核表达及蛋白检测 由于得到融合蛋白是以包涵体形式存在于沉淀中,无法进一步进行活性测定,因此选择 pMAL 载体进行表达。

将纯化的目标产物与 pMAL-c5x 载体(已单酶切)连接,获得重组质粒,菌落 PCR 验证显示与 GS1-2 阅读框扩增产物大小一致,构建表达载体 pMAL-GS1-2 转入表达菌株 BL21(DE3),28℃、0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导表达 8 h,然后进行细胞总蛋白分析,10%分离胶 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。电泳结果(图 6)显示:IPTG 诱导后含有 pMAL-GS1-2 重组质粒的 BL21 表达菌株有明显的新蛋白条带,只含空载体质粒的表达菌株(对照)除了分子标签蛋白条带外无新条带出现;GS1-2 基因编码蛋白质的分子量理论值为 39.3 kD,而空载 pMAL 表达的蛋白分子量为 42.5 kD,由此推测出 GS1-2 基因表达的融合蛋白分子量约为 82 kD,这与 SDS-PAGE 显示的表达蛋白大小基本一致,说明本试验成功构建了原核表达载体并诱导表达蛋白。在破碎后上清中也有目的蛋白出现,说明诱导表达的一部分是可溶的,可以提取粗酶液进一步进行酶活检测。

2.3 GS1-2 酵母表达

2.3.1 GS1-2 酵母表达载体 pYES-DEST52-CsGS1-2 的构建 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,用高保真酶克隆平末端产物。凝胶电泳结果(图 7)显示,条带



1. 诱导前空载体;2. 诱导后空载体;3. 诱导前重组载体;
4. 诱导后重组载体;5. 诱导后上清;6. 诱导后沉淀;
M. 标准蛋白分子量;箭头所指为 GS1-2 融合蛋白

图 6 pMAL-CsGS1-2 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

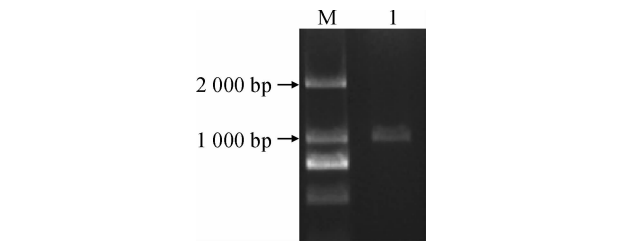
1. Empty vector before induction; 2. Empty vector after induction;
3. Recombinant vector before induction;
4. Recombinant vector after induction; 5. Supernatant of pMAL-CsGS1-2 after induction; 6. Precipitation of pMAL-CsGS1-2 after induction; M. Protein marker;
the arrows point to GS1-2 fusion protein

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of fusion protein of pMAL-CsGS1-2

与已知 CsGS1-2 ORF 较为一致。

将 PCR 产物纯化,连接至 pENTR™ TOPO® 载体,转化至 DH 5a。菌落 PCR 凝胶电泳显示条带与目标大小基本一致。挑取连接入门载体的阳性单克隆菌落,摇菌提取质粒,LR 重组反应与目的载体连接,转化至大肠杆菌,菌落 PCR 凝胶电泳显示,扩增条带与目的条带基本一致后送 Invitrogen 测序,结果显示 GS1-2 ORF 已成功地连接到克隆载体中且方向正确,去除终止密码子,共 1 068 bp,说明成功构建 pYES-DEST52-CsGS1-2 表达载体。后转化至酵母(WAT11)细胞中,菌落 PCR(图 8)显示,诱导表达并进行进一步的功能验证。

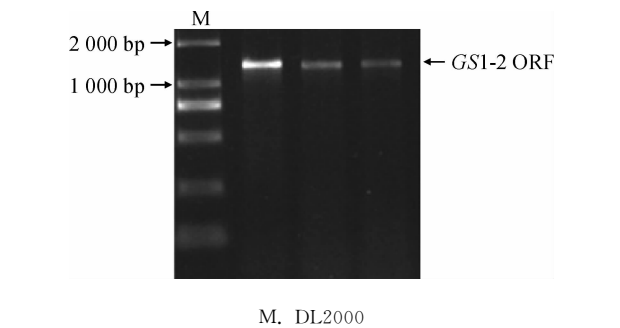
2.3.2 pYES-DEST52-CsGS1-2 重组载体在酿酒酵母中的诱导表达及酶活检测 通过向菌液中饲喂底物盐酸乙胺和谷氨酸钠的方式进行酶促反应,验证 CsGS1-2 基因功能。pYES-DEST52-CsGS1-2 在酿酒酵母的表达中未能检测到茶氨酸的生成,因此进一步对该酶是否能合成谷氨酰胺进行了初步分析。质谱分析结果显示(图 9),pYES-GS1-2 载体转化子组二级质谱中母离子峰的质荷比(m/z)为 147(图 9,B),子离子峰 m/z 为 130.0 和 84,数据与标准品谷氨酰胺(图 9,A)一致。pYES 空载体转化子组(图 9,C)与 pYES-CSGS1-2 载体转化子组与标品谷氨酰胺也基本一致,验证了酿酒酵母中表达的 GS1-2 重组蛋白具有合成谷氨酰胺的生物功能。经



M. DL2000; 1. GS1-2 ORF

图 7 CsGS1-2 ORF PCR 电泳

Fig. 7 PCR product of CsGS1-2 ORF



M. DL2000

图 8 酵母菌落 PCR 产物的检测

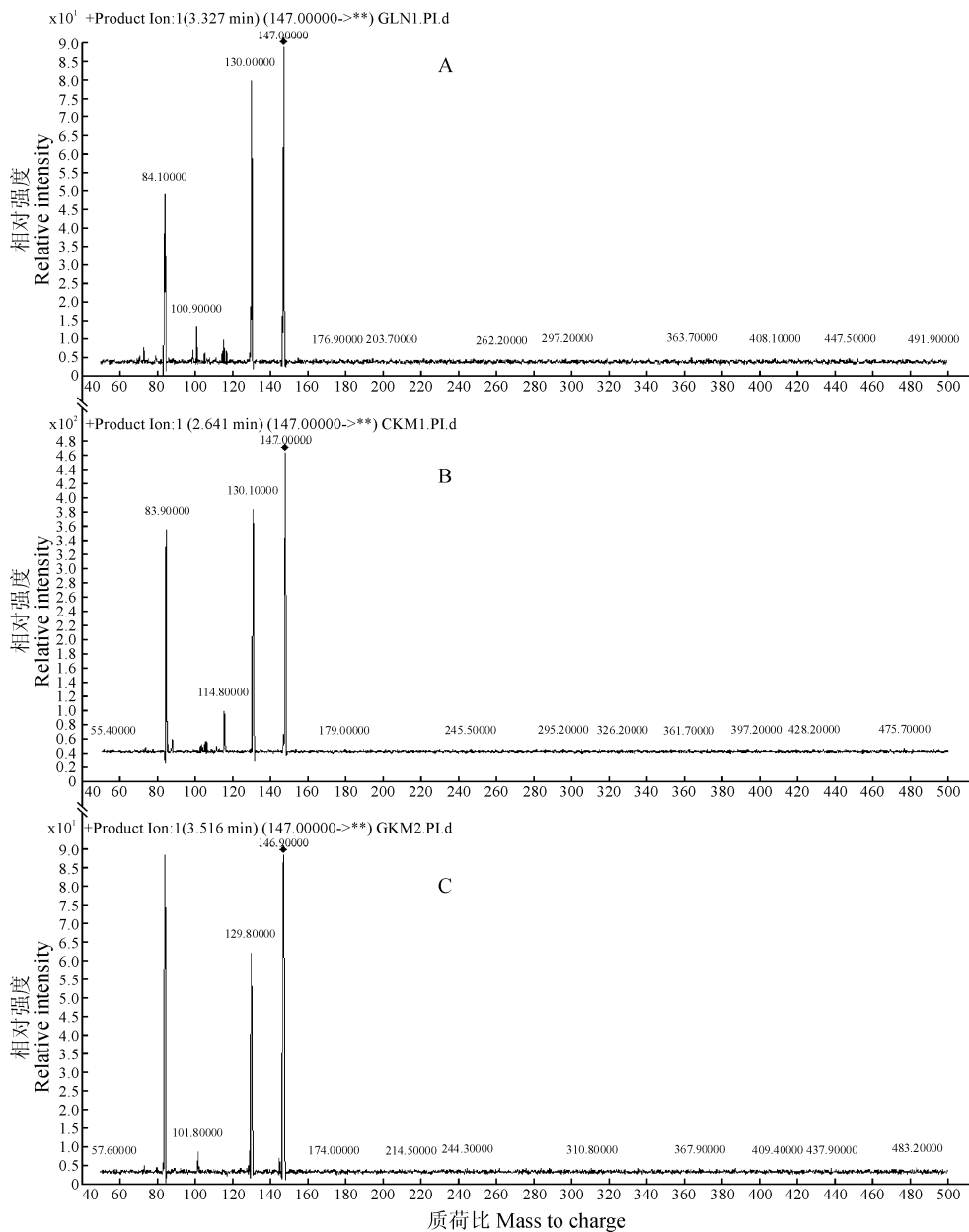
Fig. 8 Electrophoresis analysis of yeast colony PCR product

比较,pYES 空载体转化子和 pYES-CSGS1-2 转化子的谷氨酰胺含量通过菌液中饲喂底物谷氨酸钠和盐酸乙胺均得到一定的增加。定量分析后发现,谷氨酰胺含量的产生量在处理组(3.51 mg/L)中比对照组(1.81 mg/L)约高出 1 倍,说明 CsGS1-2 具有合成谷氨酰胺的功能。

3 讨论

植物中除了 20 种常规蛋白质氨基酸,不少植物还能合成非蛋白质氨基酸,如豌豆中高丝氨酸、O-乙酰高丝氨酸,黄豆中 N⁶-乙酰赖氨酸及茶树中茶氨酸等。它们是普通氨基酸的结构类似物,能在植物不适宜环境条件下储存氮源,调节植物生长。茶氨酸是谷氨酰胺合成酶结构类似物,在茶树中以无毒形式储运茶树中的氮,对茶树氮代谢起着重要作用。

目前,茶树中茶氨酸合成机制还不甚明确。已有的结果显示茶氨酸合成酶极可能就是 GS 家族成员^[7]。目前茶氨酸的大量合成主要利用微生物中的谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺酶、γ-酰基转肽酶及 γ-谷氨酰甲胺合成酶等,采用生物发酵法催化 L-谷氨酸或 L-谷氨酰胺合成茶氨酸^[8-14]。在本实验室前期构建茶树幼根 cDNA 文库并筛选出谷氨酰胺合成酶同源序列^[17]的基础上,利用 RACE 克隆基因全长,进行原核和酵母表达,并通过 UPLC-MS 分析其功



A. 谷氨酰胺标品; B. pYES-C_sGS1-2 转化子; C. pYES 空载体转化子

图 9 GS1-2 重组蛋白反应产物的 UPLC-MS 分析

A. Standard sample; B. pYES-C_sGS1-2 vector transformant; C. pYES empty vector transformant

Fig. 9 Reaction product from recombinant GS1-2 proteins by UPLC-MS detection

能。结果显示,该基因全长为 1 710 bp,开放阅读框 ORF 长 1 071 bp, 编码 356 个氨基酸,预测蛋白分子质量为 39.3 kD,理论等电点为 5.65,和已登录的茶氨酸合成酶(DD410895)及安吉白茶中筛选的茶氨酸合成酶高度相似,蛋白水平上有 5 个氨基酸的差异,但在酵母表达中未能检测到茶氨酸,而谷氨酰胺含量较空载表达明显增加。因此推测尽管氨基酸序列相似性很高,但催化功能不同,可能原因是在蛋白催化中它们与底物的结合位点还是有着较大的差异,导致茶氨酸合成酶对乙胺具有较高的亲和力,而

具有相似结构的 GS1-2 则对氨具有较高的亲和力^[19];GS 蛋白对谷氨酸的亲合力高度敏感,易受改变,如 1、2 个氨基酸的突变会导致 GS 活性有很大的改变^[20]。有报道菜豆中 GS 的一个半胱氨酸残基被丙氨酸或丝氨酸替换就足以改变亚基的构成和 GS 酶分子的四级结构,从而导致酶活的完全丧失^[21]。

由于 GS1-2 与登录的安吉白茶相似性高达 99%,本实验的目的是检验该基因是否具有茶氨酸合成的功能,因此添加的底物为谷氨酸钠和盐酸乙

胺。原核表达未能检测到茶氨酸,进一步采用酵母表达, UPLC-MS 分析结果初步显示可合成谷氨酰

胺。下一步将添加谷氨酰胺合成酶的底物谷氨酸钠和铵盐进一步分析其合成谷氨酰胺的能力。

参考文献:

- [1] 宛晓春. 茶叶生物化学(3版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2008.
- [2] NAKAGAWA M. Chemical components and taste of green tea [J]. *Jarq*, 1975, **9**(3): 156-160.
- [3] KONISHI S, KASAI Z. Effect of shading on carbon dioxide-¹⁴C assimilation by tea leaves, and the metabolism and regulation of theanine and related compounds in tea plants. I [J]. *Nippon Dojo-Hiryogaku Zasshi*, 1968, **39**(5): 264-269.
- [4] OH K, KATO T, XU H L. Transport of nitrogen assimilation in xylem vessels of green tea plants fed with NH₄-N and NO₃-N[J]. *Pedosphere*, 2008, **18**(2): 222-226.
- [5] KITO M, KOKURA H, IZAKI J, *et al*. Fate of radioactive carbon of theanine labeled with ethylamine-1-¹⁴C in tea seedlings[J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1966, **30**(6): 623-624.
- [6] WICKREMASINGHE R L, PERERA K P W C. Site of biosynthesis and translocation of theanine in the tea plant[J]. *Tea Quart*, 1972, **43**(Pt. 4): 175-179.
- [7] OKADA Y, KOSEKI M, CHU M, *et al*. Protein and cDNA sequences of two theanine synthetases from *Camellia sinensis* [P]. JP2006254780, 2006-09-28.
- [8] ABELIAN V H, OKUBO T, MUTOH K, *et al*. A continuous production method for theanine by immobilized *Pseudomonas nitroreducens* cells[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, **57**(3):481-483.
- [9] TACHIKI T, YAMADA T, MIZUNO K, *et al*. γ -glutamyl transfer reactions by glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -glutamylmethanamide[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, **62**(7): 1 279-1 283.
- [10] SUZUKI H, IZUKA S, MIYAKAWA N, *et al*. Enzymatic production of theanine, an “umami” component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial gamma-glutamyl-transpeptidase [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**(6): 884-889.
- [11] SUZUKI H, IZUKA S, MINAMI H, *et al*. Use of bacterial gamma -glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of gamma -D-glutamyl compounds[J]. *Appl. Environ Microbiol.*, 2003, **69**(11): 6 399-6 404.
- [12] YAMAMOTO S, WAKAYAMA M, TACHIKI T. Theanine production by coupled fermentation with energy transfer employing *Pseudomonas taetrolens* Y-30 glutamine synthetase and Baker’s yeast cells[J]. *Bios. Biotechnol. Biochem.*, 2005, **69**(4): 784-789.
- [13] 王贤波. 催化合成茶氨酸的菌株筛选与重组菌的构建 [D]. 杭州: 中国农业科学院茶叶研究所, 2006.
- [14] 朱文娴, 王丽鸳, 成浩, 等. 催化合成茶氨酸的基因工程菌的构建及重组基因的表达 [J]. *江苏农业学报*, 2008, **24**(3): 257-262.
- ZHU W X, WANG L Y, CHENG H, *et al*. Construction of *E. coli* recombinant strain for biosynthesis of theanine and expression of recombination gene[J]. *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, 2008, **24**(3): 257-262.
- [15] LI N, DESILVA J. Theanine: its occurrence and metabolism in tea[J]. *Annual Plant Reviews*, 2011, **42**: 171-206.
- [16] 李娟. 安吉白茶高氨基酸相关基因分离与鉴定[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [17] 史成颖, 宛晓春, 江昌俊, 等. 茶树嫩根 cDNA 文库的构建及 ESTs 分析[J]. *南京农业大学学报*, 2009, **32**(1): 126-130.
- SHI C Y, WAN X C, JIANG C J, *et al*. Construction of cDNA library for tender Roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and analysis of its expressed sequence tags [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2009, **32**(1): 126-130.
- [18] 史成颖, 宛晓春, 江昌俊, 等. 提起茶树高质量总 RNA 的方法研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2007, **34**(3): 360-363.
- SHI C Y, WAN X C, JIANG C J, *et al*. Method for high-quality total RNA isolation from tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze][J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2007, **34**(3): 360-363.
- [19] 陈琪, 江雪梅, 孟祥宇, 等. 茶树茶氨酸合成酶基因的酶活性验证与蛋白质三维结构分析[J]. *广西植物*, 2015, **35**(3): 384-392.
- CHEN Q, JIANG X M, MENG X Y. Enzymatic activity verification and protein 3-dimensional structural analysis of CsTS gene in *Camellia sinensis* [J]. *Guihaia*, 2015, **35**(3): 384-392.
- [20] UNNO H, UCHIDA T, SUGAWARA H, *et al*. Atomic structure of plant glutamine synthetase: A key enzyme for plant productivity[J]. *Journal of Biology Chemistry*, 2006, **281**: 29 287-29 296.
- [21] BETTI M, GARCIA-CALDERON M, PEREZ-DELGADO C M, *et al*. Glutamine synthetase in legumes: recent advances in enzyme structure and functional genomics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, **13**: 7 994-8 024.