

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201312041

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三维结构分析[J]. 广西植物, 2015, 35(3): 384—292

Chen Q, Jiang XM, Meng XY, et al. Enzymatic activity verification and protein three-dimensional structural analysis of theanine synthetase gene in *Camellia sinensis*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(3): 384—292

茶树茶氨酸合成酶基因的酶活性 验证与蛋白三维结构分析

陈 琪, 江雪梅, 孟祥宇, 张正竹, 宛晓春*

(安徽农业大学 茶与食品科技学院, 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 针对 NCBI 上已登录的茶氨酸合成酶与谷氨酰胺合成酶基因序列进行克隆、原核表达与酶活性验证, 利用多种生物信息学数据库和软件, 对 *CsTS* 与 *CsGS* 基因进行结构、性质和功能预测, 采用同源建模法对蛋白三维结构进行预测, 比较并预测催化作用位点的差异; 用系统进化树分析从裸子植物到高等被子植物的谷氨酰胺合成酶基因序列, 推测其进化的演变过程; 通过对原核表达的基因工程菌提取粗酶液进行酶活性测定。结果表明: 尽管茶树 *TS* 与 *GS* 序列高度同源, 但是原核表达后的融合蛋白仍然显示了不同的催化能力, 蛋白一、二级结构分析显示 *CsTS* 与 *CsGS* 差异不大, 但是通过同源建模形成的蛋白三级结构分析显示, *CsTS* 与 *CsGS* 存在 3 个催化位点上的差异, 这可能是导致其酶活性差异的关键。系统进化分析结果首次确定茶氨酸合成酶应为谷氨酰胺合成酶基因家族成员, 按照其细胞定位预测应为胞质型 *GS*, 其亲缘关系与同为双子叶植物的葡萄、陆地棉、巴西橡胶树、拟南芥较接近。

关键词: 茶氨酸合成酶; 谷氨酰胺合成酶; 蛋白三维结构; 同源性分析

中图分类号: Q949; S571.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0384-09

Enzymatic activity verification and protein three-dimensional structural analysis of *theanine synthetase* gene in *Camellia sinensis*

CHEN Qi, JIANG Xue-Mei, MENG Xiang-Yu, ZHANG Zheng-Zhu, WAN Xiao-Chun*

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

Abstract: The aim of this study was to analyze the highly homologous sequences of theanine synthetase genes and glutamine synthetase genes of tea plant, speculate their evolutionary relationship, predict their structures, natures, functions and differences of enzyme active sites, and then to provide a basis for *CsTS* genes function studies of tea. Two gene sequences logged on NCBI were cloned, the expression of enzymes activities was verified through HPLC and LC-MS and phylogenetic analysis was implemented within the searching result. The expression of enzymes in *E. coli* suggested *CsTS* and *CsGS* had different catalytic activities although their high homology. The primary and secondary protein structures of *CsTS* and *CsGS* were analyzed and the result showed that there was no significant difference between them, but the third protein structure analysis by homology modeling in the catalytic sites

收稿日期: 2014-04-28 修回日期: 2014-06-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31170283); 安徽省教育厅自然科学重点项目(KJ2013A112)。

作者简介: 陈琪(1980-), 女, 贵州贵阳人, 博士, 讲师, 主要从事茶树生物技术研究, (E-mail) chenqi@ahau.edu.cn。

*通讯作者: 宛晓春, 博士, 教授, 主要从事茶树次生代谢研究, (E-mail) xcwan@ahau.edu.cn。

showed three differences in the catalytic sites, which could lead to the difference of enzyme activity. In this research, *CsTS* gene sequences were firstly identified as the members of GS gene family through phylogenetic analysis. According to cellular localization prediction, *CsTS* should belong to cytoplasmic GS (GS1), for its kinship close to grape, upland cotton, rubber tree, arabidopsis etc.

Key words: theanine synthetase; glutamine synthetase; protein three-dimensional structure; homology analysis

茶氨酸(Theanine, N-乙基- γ -L-谷氨酰胺)是茶树体内中唯一的非蛋白质氨基酸, 目前仅在蕁(*Xerocomus badius*)和某些山茶属植物(*Camellia japonica*, *C. sasanqua*)中有报道(Casimir *et al.*, 1960; Tsushida *et al.*, 1984)。茶氨酸在新梢芽叶中约占游离氨基酸总量的 70%, 在鲜叶中约占茶叶干重的 1%~2%, 是影响茶叶风味的重要次生代谢物(宛晓春, 2003)。茶树作为一种多年生的耐铵性经济作物, 具有与其它植物不同的氮素代谢途径, 即茶树氮代谢与茶氨酸代谢紧密相联(杨贤强, 1987)。茶氨酸作为茶树氮储存与氮运转载体功能, 是茶树之所以耐铵的重要因素。茶氨酸合成酶(Theanine synthetase, TS)的发现对于研究茶树氮吸收与转运机制具有重要意义, 但对其基因序列研究表明该酶与植物谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)基因高度同源, 可以推测它们极有可能是 GS 家族成员。多数研究者认为 GS 是由 1 个小的基因家族编码, 这些基因至少编码 1 种质体型和 3 种(拟南芥中)到 5 种(玉米中)胞液型 GS 多肽(Masakazu *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006)。许多植物的 GS 基因已被克隆, 如大麦、玉米、水稻、豌豆等(Freeman *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Morey *et al.*, 2002), 但目前只在 *Camellia* 属的部分植物中检测到茶氨酸或克隆出 TS 基因, 因而研究 TS 与 GS 蛋白催化结构的差异及进化关系成为揭示茶树特殊耐铵性的关键。由于已登录的 *CsTS* 与 *CsGS* 基因同源性较高, 我们选择了在 ORF 框两端有差异位点的 2 条基因序列 TS (DD410895)与 GS (AB115184)进行克隆和原核表达, 并对它们的酶活性进行比较与测定, 验证它们的功能上可能存在的相关性; 同时利用生物信息学的手段分析二者在蛋白结构上的差异, 以解析酶活性差异的机制。

利用系统进化的分析手段可以为推测物种间在基因组结构的差异、发现未知基因、预测基因的功能、进行功能基因的克隆, 进而了解物种间的进化关系, 提供重要的参考, 而对蛋白的三维结构进行预测有助于推断基因的功能, 寻找其催化位点或活性中

心。通过对现存的众多农作物生物信息数据的搜索与分析, 寻找主要的 GS 基因, 构建了植物 GS 基因的系统进化树, 并利用此进化树分析茶树 TS 基因与之的进化关系, 同时利用 SWISS-MODEL 中已有的植物 GS 蛋白模板, 运用同源建模技术构建了 *CsTS* 模型, 并对其可能的催化位点进行了预测, 为进一步针对其基因功能的研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茶叶品种农井 43 采自大杨店实验茶园; DH5 α , Rosseta good 大肠杆菌菌株(*E. coli*)由本实验室保存。工具酶与试剂: 各种限制性内切酶、dNTP、Taq plus DNA 聚合酶、PMD-19T 克隆载体、DNA maker 等购自 TaKaRa 公司; Oligo(dT)、M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; pMAL-C2X 载体购自 Biolab 公司; In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit 购自 Clontech 公司; 氨苄青霉素、 β -巯基乙醇及其它常规试剂均为国产试剂。PCR 引物合成与测序: PCR 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成; 测序由上海 Invitrogen 公司完成。

1.2 茶树 *CsTS1* 与 *CsGS1* 基因原核表达载体的构建与功能验证

1.2.1 茶树叶片总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的获得 取一芽二叶的龙井 43 嫩叶, 在液氮中速冻, 采用史成颖等(2007)的方法, 提取茶叶的总 RNA。以 Oligo (dT)为引物, 取总 RNA 5 μ g, 逆转录合成 cDNA 第一链。

1.2.2 cDNA 特异片段的 RT-PCR 扩增 根据 GenBank 已登录的 TS (Theanine synthetase, Accession: DD410895)与 GS (Glutamine synthetase, Accession: AB115184)序列 ORF 部分, 设计两对引物: TS-F1: 5'-GCCAGATCTATG TCTCTTCTTTC-GA-3', TS-R1: 5'-TTGTCGACTTACGGTTTTC-CA GAGG-3'以及 GS-F1: 5'-GACGATATCATG-GCTCAGCTTTTCAGATCTC-3', GS-R1: 5'-GCA-GAATTCTCATGGTTTCCACAGGATGGT-3'。

建立 30 μL 反应体系: cDNA 1.6 μL (1.6 μg), 3 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液, 1.8 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primer up, 1.8 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primer down, 2.4 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.6 μL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 0.3 μL TaqDNA 聚合酶。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 20 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。循环结束后用 1.5% 琼脂糖进行凝胶电泳鉴定, 随后切胶回收, 与 PMD-19T 载体连接后转大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆测序。

1.2.3 构建 pMAL-C2X 表达载体 用 pMAL-C2X 表达载体进行目的片段的原核表达。由于使用 In-Fusion Kit 进行连接反应, 只需用带有载体两端各 15 个碱基的特定目的 DNA 引物进行 PCR, 便可将 PCR 产物与载体直接连接。设计特异引物: TS-F2: 5'-GAGGGAAGGATTTCAGAA TCT CTT CTT TCC GAT CTT TAC-3' 和 TS-R2: 5'-ACGACG-GCCAGTGCCAAG TTA CGG TTT CCA GAG GAT GG-3' 以及 GS-F2: 5'-GAGGGAAGGA TTTTCAGAA GCT CAG CTT TCA GAT CTC AT-3' 和 GS-R2: 5'-TACTCTAGAGGATCCGAA TCA TGG TTT CCA CAG GAT GG-3'。以 PMD-TS/GS 质粒 DNA 为模板, 采用高保真 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 扩增及 PCR 纯化过程同上, 转入 Rossetta Good 菌株中进行诱导表达。

1.2.4 pMAL-TS 诱导蛋白上清液进行酶促反应 将已加入 0.1 mmol/L IPTG 于 32 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 4 h 后的菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 去上清后用灭菌水洗涤菌泥, 洗去残留的培养液后, 将湿菌泥重悬于超声缓冲液 (100 mmol/L Tris 醋酸缓冲液, pH7.5, 10 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT) 中, 配制成 100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌液, 冰浴下超声 (超声 2 s 间隔 3 s, 60 次) 后 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清作为粗酶液。

酶促反应体系: 0.4 mL 反应液 (100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.5, 其中含 25 mmol/L Tris, 25 mmol/L L-Gln, 25 mmol/L $\text{EtNH}_2 \cdot \text{HCl}$, 25 mmol/L MgCl_2 , 250 $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇), 0.2 mL ATP (钠盐, 10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 mL 粗酶液, 总体积为 1.0 mL。该反应体系于 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 45 min 后, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 终止酶反应 (对照: 将粗酶提取液预先于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 终止酶活后加入反应体系)。反应混合液 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液用于产物 L-茶氨酸检测。

对照 1: 取 pMAL-C2X 空载体转入 Rossetta Good 中, 挑取单菌落按照上述方法诱导表达制备上清蛋白, 按照反应体系进行反应后检测茶氨酸含量。

对照 2: 取 pMAL-GS 表达载体, 挑取单菌落按照上述方法制备蛋白, 按照反应体系进行反应后检测茶氨酸含量。

1.2.5 酶促反应测定的 HPLC 分析条件 酶反应体系的高效液相色谱检测条件为 Aglient 1200 色谱系统, Aglient ZORBAX Eclipse XDB C18 柱 (4.6 $\times$ 250 mmol/L , 粒度 5 μm), 流动相为 0.05% (V/V) 甲酸 (液质联用使用) 或 0.05% 三氟乙酸 (液相用), 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量: 5 μL , 检测波长 199 nm。分析历时 55 min, 其中柱分离时间为 15 min, 然后逐步切换为纯乙腈冲柱 25 min, 再切换为流动相平衡 5 min (其间流动相与乙腈两相切换过渡时间均为 5 min)。

1.2.6 酶促反应结果的质谱验证 采用电喷雾质谱 (ESI-MS) 对酶促反应的产物进行鉴定, 在研究氨基酸碎裂的过程中采用质谱的 EPI (Enhanced product ion scan) 模式, 在正离子模式下所选择的离子喷雾电压和入口电压分别为 4 500 和 10 V, 在负离子模式下二者分别为 -3 200 和 -10 V, 电喷雾质谱 (ESI-MS) 离子化参数: 毛细管电压 15 V。毛细管温度 200, 气流速 20 个单位, 辅气流速 10 个单位; 质谱图 m/z 扫描区间为 50~400。

1.2.7 pMAL-GS 的酶活性测定 对构建的 pMAL-GS 表达载体按上述方法进行诱导表达, 并对表达的融合蛋白直接进行酶活性测定, 酶反应参见乔富廉 (2002) 的方法。对照 1: 取 pMAL-C2X 空载体转入 *E. coli* Rossetta Good 中, 挑取单菌落按照上述方法制备粗酶液进行反应后, 检测吸光值。对照 2: 取 pMAL-TS 表达载体, 按照上述方法进行检测。

1.3 茶树 CsTS1 与 CsGS1 基因的生物信息学分析

1.3.1 基本理化性质分析 利用 ExPASy 的 ProtParam 工具包在线分析蛋白的主要理化特性, DNASTAR 7.0 分析蛋白分子的结构特点, NetPhos 2.0 server 在线分析蛋白中可能存在的磷酸化位点。

1.3.2 蛋白 3-D 结构分析 利用 Inter ProScan, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 网站工具预测 CsTS1 与 CsGS1 蛋白的结构域, 通过 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>), 对蛋白质三级结构进行分析, 并且通过 Meta pocket (<http://sysbio.zju.edu.cn/metapocket/>) 进行同源

建模对 CsTS1-2 蛋白的催化活性位点进行预测。

1.3.3 序列比对方法 根据茶树中已知的 GS 基因及其编码的蛋白质序列,以 Gln-synt_C (Glutamine Synthetase Catalytic Domain)保守区域的蛋白序列为探针,在 GeneBank 中通过 blastp 检索蛋白质数据库, $E < 10^{-5}$ 的序列被认为是候选蛋白,再用 Pfam 软件预测这些候选蛋白的 Gln-synt_C 结构域,若存在 Gln-synt_C 结构域,则认为该候选蛋白属于 GS 蛋白家族,若未能检出 Gln-synt_C 结构域,则认为其不属于该家族,同时在比对结果中,选取具有编码序列(Coding Sequence, cds)全长的基因,用 Clustal X 软件进行氨基酸序列多重连配分析,参数为默认,去除差异过大的序列后得到从苔藓到裸子植物与被子植物在内的 17 种 61 条序列,用 MEGA4.1 (Tamura *et al.*, 2007)中的邻接(Neighbor-Joining)算法进行聚类分析并绘制系统发生树。

2 结果与分析

2.1 CsTS1 与 CsGS1 ORF 的扩增

以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应得到的产物如图 1 所示:PCR 产物略大于 1 000 bp,与 GenBank 中登录的该基因开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)全长(1 071 bp)相当。将所得片段纯化回收后连接至 PMD-19T 载体,进行测序后将测序结果分别与 DD410895/AB115184 比较,结果显示克隆所得的 TS 片段与 DD410895 有三个核苷酸的差异,而翻译成蛋白序列比较,只有 2 个氨基酸差别;而克隆的 GS 序列的一致性也为 99%,有 2 个核苷酸差异,考虑到选用的茶树品种不同,克隆出来基因上的碱基差异可能是种间差异造成的。

2.2 pMAL-TS/GS 的原核表达

以 PMD-TS/GS 质粒为模板,利用 In-fusion 的方法分别构建 pMAL-TS/GS 表达载体,将构建的 pMAL-TS 质粒转入表达载体 Rossetta good 后,挑取阳性克隆进行诱导表达,分别在不同的温度条件下进行诱导,可以看到在上清和沉淀中均有特异条带出现(图 2),由于目的蛋白在 39 kD 大小, pMAL-C2X 载体上携带的 Binding Protein 为 42 kD 大小,加上目的蛋白两端携带的氨基酸约有 6 kD 大小,所以最终形成的融合蛋白应在 88 kD 左右,根据标准蛋白分子量的迁移距离推定诱导得到 SDS-PAGE 上的特异蛋白大小与理论值相符,且得到了融合蛋

白的可溶性表达。



图 1 TS/GS 全长 cDNA 的扩增

1. DNA 分子量标准; 2,3. TS PCR 产物; 4,5. GS PCR 产物

Fig. 1 PCR product of TS/GS cDNA

1. DNA molecular marker; 2,3. PCR product of TS; 4,5. PCR product of GS.

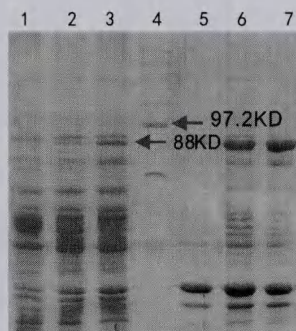


图 2 pMAL-TS 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

1. 诱导前上清; 2,3. 20 °C 与 37 °C 诱导后上清; 4. 蛋白质分子量标准; 5. 诱导前沉淀; 6,7. 20 °C 与 37 °C 诱导后沉淀。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of fusion protein pMAL-TS

1. Supernatant of pMAL-TS before induced; 2,3. Supernatant of pMAL-TS after induced at 20 °C and 37 °C; 4. Protein molecular marker; 5. Precipitation of pMAL-TS before induced; 6,7. Precipitation of pMAL-TS after induced at 20 °C and 37 °C.

2.3 pMAL-TS 酶活性测定

提取表达后的融合蛋白进行酶促反应,利用 HPLC 对反应产物进行检测,从图 3 可以看出,以三氟乙酸为流动相的检测体系可以很好的检测到茶氨酸的生成,并分离目的峰,通过添加茶氨酸内标,基本可以对酶促反应的产物进行定性。不过为了确证产物为茶氨酸,随后用 ESI-MS 对图中的色谱峰进行离子碰撞,并与茶氨酸标品的一级、二级 MS 谱图进行对比,可以确定酶促反应中生成的特异性产物为茶氨酸(图 4)。

在前期摸索实验中我们发现, pMAL-TS 可以利用谷氨酰胺与乙胺合成茶氨酸,但不能直接催化

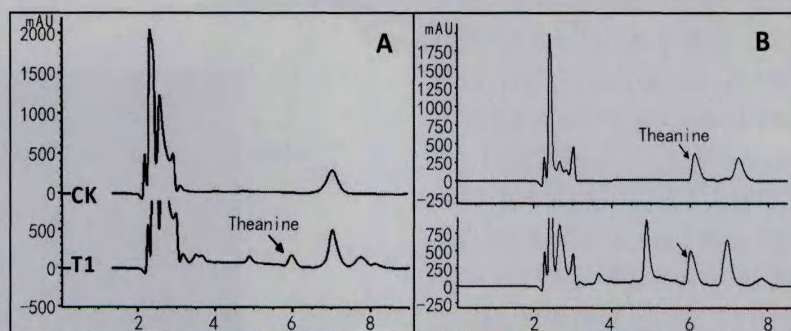


图 3 诱导表达蛋白粗酶液酶促反应结果的 HPLC 检测

A. 直接反应结果; B. 添加内标后反应结果 (CK 为灭活的 pMAL-TS 进行反应; T1 为 pMAL-TS 进行反应)。

Fig. 3 HPLC detection results of crude enzyme solution reaction by induced expression of protein

A. Direct response results; B. Reaction results of added theanine internal standard (CK is the reaction result of inactivation protein from pMAL-TS; T1 is the reaction result of pMAL-TS expression protein).

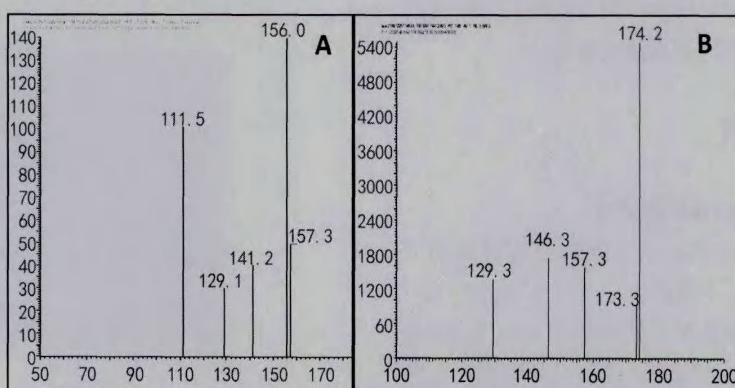


图 4 ESI-MS 鉴定色谱峰 A. 茶氨酸标品二级 MS 图; B. 色谱分离样品 MS 图。

Fig. 4 Identification the HPLC peaks by ESI-MS

A. Identification theanine standard by MS2; B. Identification enzyme reaction samples by ESI-MS.

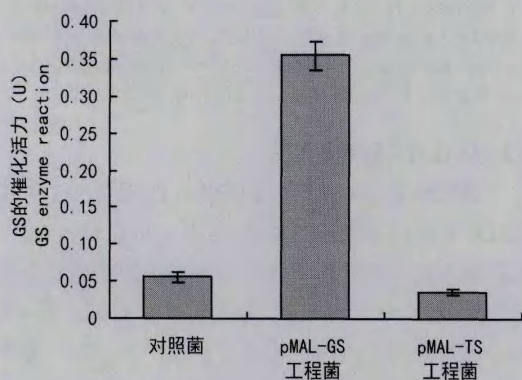


图 5 GS 酶促反应测定结果

Fig. 5 Result of GS enzyme reaction

谷氨酸与乙胺合成茶氨酸, 与 Sasaoka *et al.* (1965) 的报道不一致, 分析有两个可能性, 一是目前尚无体外纯化茶氨酸合成酶确认其底物为谷氨酸的明确报

道, 前人研究多以放射性同位素底物饲喂茶苗, 从而按照催化合成茶氨酸的速率推测其底物, 则其酶促底物也可能为谷氨酰胺; 二是由于细菌本身的内源蛋白催化谷氨酰胺合成茶氨酸, 即使是空的 *E. coli* DH5 α 也能利用谷氨酰胺与乙胺合成茶氨酸 (朱文娴等, 2008), 但本研究中, 并未发现这种现象, 无论是对照 1 (pMAL-C2X 空载体转化后的菌株) 还是对照 2 (转 pMAL-GS 的基因工程菌) 在同样体系下都未检测到茶氨酸的生成, 同时 pMAL-TS 也并不具备催化合成谷氨酰胺的能力, 说明尽管 CsTS 与 CsGS 基因的同源性很高, 蛋白结构也很相似, 但催化功能不同, 表明其蛋白结合位点与催化反应方式之间有着根本的差异。

2.4 pMAL-GS 酶活性测定

针对 2 种基因工程菌催化合成谷氨酰胺能力的

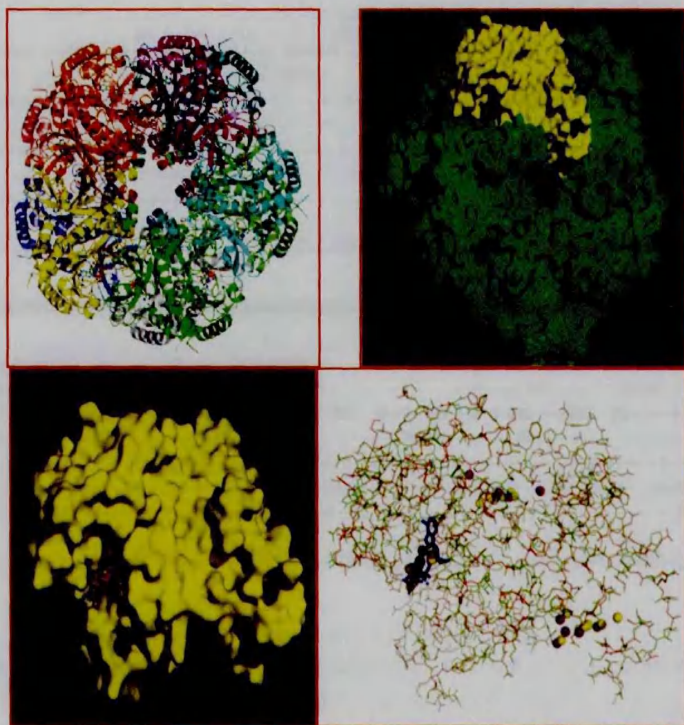


图 8 $CsTS1$ 与 $CsGS1$ 三级结构比对

A. 作为模板的 GS 鲁棒结构图(2d3a); B. 模板 GS 蛋白质全图; C. 模板 GS 蛋白质 C 链放大图; D. 模板 GS 与模型 TS 叠加图。

Fig. 8 The third structures of $CsTS1$ and $CsGS1$ A. GS ribbon structure of 2d3a; B. Complete map of the protein template GS;

C. C chain enlargement of template GS protein; D. GS template overlay map of the TS model.

稳定之外,其他参数与 GS 均相类似。

2.6 $CsTS1$ 与 $CsGS1$ 蛋白结构分析

2.6.1 $CsTS1$ 与 $CsGS1$ 蛋白二级结构分析预测 由图 6 可知, $CsTS1$ 与 $CsGS1$ 均以 α -螺旋为主,有许多亲水性区域,暴露于表面区域,但是除了几处细微的差异, $CsTS1$ 与 $CsGS1$ 蛋白二级结构的构成和比例基本一致。图 6 上为 $CsTS$ 序列,图 6 下为 $CsGS$ 序列。经 NetPhos 2.0 server 在线分析, $CsTS$ 蛋白中有 12 个丝氨酸(分别位于 15、29、35、59、115、209、253、256、259、314、336、345 位)、3 个苏氨酸(分别位于 104、293、321 位)及 5 个酪氨酸(分别位于 95、126、132、158、341 位)易被磷酸化(图 7);而 $CsGS$ 蛋白中有 13 个丝氨酸(分别位于 13、15、35、59、115、174、209、253、256、314、336、345 位)、4 个苏氨酸(分别位于 104、293、298、321 位)及 6 个酪氨酸(分别位于 95、126、132、150、263、341 位)易被磷酸化,其中部分位点有差异(下划线表示),表明它们受到的调控途径与底物活性可能存在一定的差异。

2.6.2 $CsTS$ 与 $CsGS$ 蛋白三级结构分析预测 蛋白

质三维结构的预测通常只在与已有晶体结构的蛋白序列进行比对,且序列相似度 $>30\%$ 的情况下序列模拟比较有效,否则很难保证预测结构的准确性。我们在 SWISS-MODEL 数据库中搜索到已通过 X-射线晶体衍射法加核磁共振确立三维结构的玉米 GS 基因(图 8:A),以之为模板,将靶序列 $CsTS1$ 与模板的结构进行比对,利用模板结构的信息建立靶序列的模型,从而对 $CsTS1$ 与 $CsGS1$ 的催化机制进行分析,有利于找寻影响酶活力的配体。图 8:B 是模板 GS 的空间结构图,其中 C 链标记为黄色,其余为绿色,标记为红色的是结合的小分子。对 C 链进行放大,可看到上面有一个结合位点结合着红色的小分子。以 $CsTS1$ 基因作为模型与模板进行叠加,运用 MetaPocket 软件可对模型的结合位点进行预测(图 8:D),其中模板 2d3a 为绿色,模型 $CsTS1$ 蛋白为红色,模板上面结合的真实小分子为蓝色,使用模板预测出的结合位点为紫色,而以 TS 为模型预测的结合位点为黄色。可见运用软件预测的结合位点与 GS 真实结合位点相符,对于 $CsTS1$ 与 $CsGS1$ 蛋白来说,均预测出三个酶反应的结合位

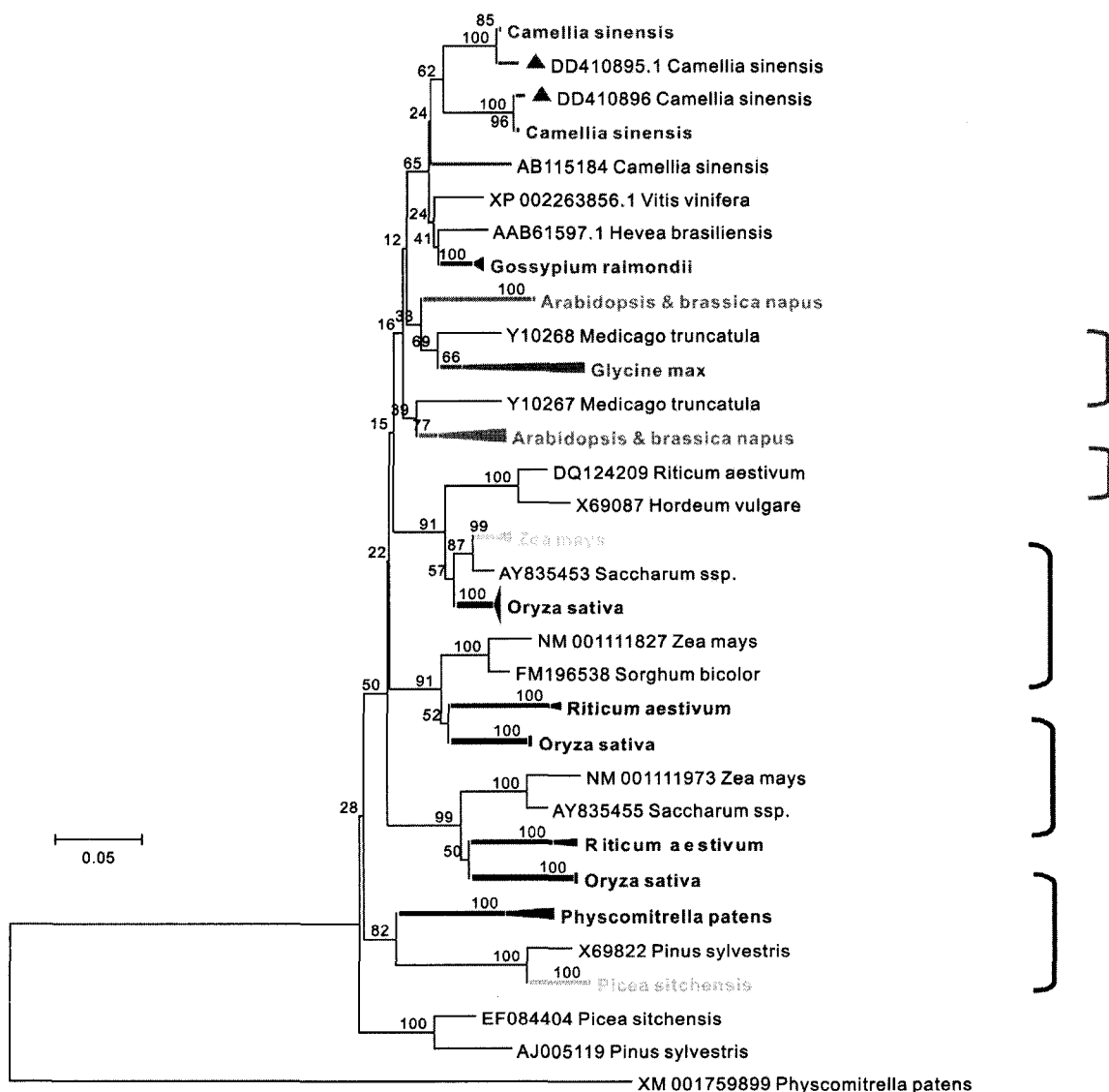


图 9 植物 GS 基因序列的进化树分析
Fig. 9 Phylogenetic relationships with plant GS proteins

点,但其所能结合的氨基酸位点有着细微的差别,这也许就是二者催化反应差异的原因所在,但需通过点突变等反向实验予以证实。

2.7 GS 蛋白系统进化树构建

利用 NCBI 数据库中的 Blast 软件将目的基因编码的氨基酸序列与 GeneBank 中的氨基酸序列进行比对和相似性搜索,并下载为 Fasta 文件,将来自山茶属、葡萄、拟南芥、水稻、小麦、大豆、苜蓿、樟子松、北美云松、小立碗藓等 17 个 GS 家族成员的共 61 条序列进行多序列连配分析(图 9)。收集了从苔藓类,裸子植物,被子植物等 17 种具有代表性的 GS 基因序列,从图 9 可以看出,序列大致分为三大类,

其中苔藓类与裸子植物归为一类,被子植物中的单子叶植物与双子叶植物分别为一类。对以水稻为代表的单子叶植物进行分析可知,稻属的 16 条序列按照 GS 组织特异性与功能分为三类,即叶部胞液型(GS1)、叶部质体型(GS2)与根部胞液型(GSr),其他单子叶植物的聚类与水稻相似。双子叶植物的聚类较为复杂,以拟南芥为代表的双子叶植物 GS 基因可分为胞液型(GS1)与质体型(GS2)两大类,可与大豆、甘蓝型油菜等植物中的 GS 聚类,但由于双子叶植物的复杂性,不同植物中 GS 基因多为单独分化。如山茶属中的 GS 基因与葡萄、陆地棉等物种同源性较高,由于偏木本的特性仍可单独划分为

三类,对山茶属 GS 基因进一步分析可知,两条茶氨酸合成酶基因序列分别与不同的 CsGS 序列聚类,而与 CsGS(AB115184)距离较远,由此可初步推论茶氨酸合成酶基因为 GS 基因家族成员,在进化过程中由于突变导致蛋白结构的变化从而改变了其催化的活性中心,形成新的酶功能。

3 讨论

在蛋白质的分析比较中,我们发现茶树茶氨酸合成酶与谷氨酰胺合成酶的高度同源性,谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS, EC6.3.1.2)是高等植物氮同化过程的关键酶,而茶氨酸合成酶同样在茶树氮素同化和转运过程中起重要作用。植物中几种不同类型的谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS, EC6.3.1.2)的主要功能在于:GS1 参与萌发种子中储存氮源的转运以及衰老叶片中氮源的再转移;GS2 主要定位于叶绿体,参与光呼吸中释放的氨的重新同化;部分植物根部存在的 GSr 主要与根部氮同化相关,起到减弱胞液中氨浓度增加的作用(Mifflin *et al.*, 2002; 李常健等, 2001)。对比茶氨酸合成酶的功能,茶树可通过将多余的氮源转为酰胺类的“氨”(主要为茶氨酸)储存,从而减缓过量氮肥对茶树的伤害,而储存的茶氨酸主要输送至新梢,提供嫩叶中旺盛的氮代谢需求,表明 CsTS 的功能与 GS 有很多共同之处,针对 CsTS 组织特异性的研究表明(Deng *et al.*, 2009),CsTS 在茶树各器官中均有表达,其中 CsTS1 在叶部表达量较高,而 CsTS2 在根部表达量较高,其表达均受到外源氮素营养的调控,结合系统进化树的结果分析表明, CsTS 的特性与胞液型 GS 相近。

对于为何只在山茶属部分植物中发现存在茶氨酸?为何 CsTS 与 GS 序列如此相近,而在别的植物中却未发现相类似的 GS 基因具有合成茶氨酸的功能?我们推测可能是由于茶树进化过程中存在正选择的作用,使得碱基突变导致氨基酸结合位点的变化从而改变了酶反应的结合底物,利用同源建模方式预测了 3 个置信度最高的底物结合位点,可见 CsTS1 与 GS 的底物结合位点在空间上很接近,但氨基酸位点有细微的差异,可能导致结合小分子构象产生差别,这可能是由于它们具有不同的酶催化功能,但还需要进行点突变试验予以证实。Takashi *et al.* (1998) 在细菌中发现有一类假单胞菌属的

Glutaminase 具有非特异性的转 γ -谷氨酰基功能,能催化甲胺或乙胺与谷氨酰胺一起合成 γ -谷氨酰甲胺或 γ -谷氨酰乙胺(茶氨酸),而 CsGS 与 CsTS 酶均具有转氨基的功能,差别只在于前者是将氨基转移到谷氨酸 5-羧基上形成酰胺键,而后者是将乙胺基转移到同一位点形成酰乙胺。我们据此推测,在茶树的进化过程中很可能还存在一类 GS,能同时催化氨基与乙胺基形成不同的产物,由于茶树基因组测序工作尚未完成,我们还未获得所有的 CsGS 序列,因此,相关研究工作还有待进行。

4 结论

本研究针对茶树中同源性较高的 CsTS1 与 CsGS1 基因进行克隆与原核表达,利用 HPLC 和 LC-MS 等方法证实了表达得到的融合蛋白的催化功能,证实茶树中的 TS 可以利用谷氨酰胺与乙胺合成茶氨酸,而尽管序列同源性较高的 CsGS1 却并不具备这一功能。随后运用生物信息学的手段针对茶树茶氨酸合成酶基因 CsTS 的蛋白结构进行分析,通过运用同源建模的方法构建蛋白三维模型,推测其催化活性位点,找到 3 个与谷氨酰胺合成酶的差异位点。同时在生物信息数据库中筛选了从苔藓到被子植物 17 个物种的 63 个具有 CDS 全长的谷氨酰胺合成酶基因,通过构建系统进化树分析,结果表明,茶树茶氨酸合成酶应属于植物谷氨酰胺合成酶基因家族成员。

参考文献:

- Casimir J, Jadot J, Renard M. 1960. Separation and characterization of N-ethyl- γ -glutamine in *Xerocomus badius* (*Boletus laevis*) [J]. *Biochim Biophysiol Acta*, **39**:462—468
- Deng WW, Ogita S, Ashihara H. 2009. Ethylamine content and theanine biosynthesis in different organs of *Camellia sinensis* seedlings [J]. *Zeitschrift für Naturforschung*, **64c**:387—390
- Freeman J, Marquez AJ, Wallsgrove RM. 1990. Molecular analysis of barley mutants deficient in chloroplast glutamine synthetase [J]. *Plant Mol*, **14**(3):297—311
- Li CJ (李常健), Lin QH (林清华), Zhang CF (张楚富). 2001. Progress of the studies on glutamine synthetase in higher plants (高等植物谷氨酰胺合成酶研究进展) [J]. *J Biol* (生物学杂志), **18**(4):1—3
- Lin QH, Li CJ, Zhang CF, *et al.* 2000. Comparative study of immunological properties on glutamine synthetase isozymes in rice plants [J]. *Acta Bot Sin*, **42**(5):471—475
- Li CJ (李常健), Lin QH (林清华), Zhang CF (张楚富). 2001. (下转第 377 页 Continue on page 377)

Karlsdottir L, Hallsdottir M, Thorsson AT, et al. 2008. Characteristics of pollen from natural triploid *Betula hybrids*[J]. *Grana*, **47**(1):52-59

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, **54**(2):201-220

Li MX(李懋学), Chen RY(陈瑞阳). 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants(关于植物核型分析的标准化问题)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **4**(2):297-302

Liu XS(刘学生), Chen L(陈龙), Wang JX(王金鑫), et al. 2013. Discovery and identification of natural triploid ploidy of Chinese jujube cultivar 'Pingguozao'('苹果枣')自然三倍体倍性的发现与鉴定[J]. *Acta Hortic Sin*(园艺学报), **40**(3):426-432

Liu KH(刘可慧), Yu FM(于方明), Zhang QM(张秋明), et al. 2010. Regenerating triploid citrus plants by embryo rescue technique(应用胚挽救技术获得三倍体柑橘植株)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(2):246-249

Shao JW(邵剑文), Li XH(李晓红), Han L(韩露), et al. 2004. A study on karyotypes of five species in *Lysimachia*(5种珍珠菜属植物的核型分析)[J]. *Acta Bot Yunan*(云南植物研究), **26**(4):427-433

Stebbins GL. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants [M]. London:Edward Arnold(Publishers) Ltd

Sun AQ(孙爱群), Xiang H(向红), Tian YZ(田应洲), et al. 2007. Study on karyotypes of four species in *Lysimachia*(珍珠菜属四种植物的核型分析)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **25**(5):509-512

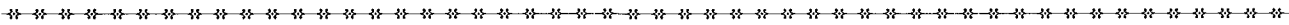
Yang SL, Lihua TLH, Tian JK, et al. 2009. Anti-tumor constituents of four medicinal plants from *Lysimachia* genus [J]. *Planta Medica*, **75**(4):412-412

Zheng W, Xu XD. 2011. Single-node stolonizing, an innovative propagation method for two landscape stoloniferous *Lysimachia* L. ground covers[J]. *Inter Conf Agric & Biosyst Eng*;317-319

Zheng W, Xu XD, Zhao KG, et al. 2009a. *Lysimachia christinae* 'Zixin': a new groundcover plant[J]. *Hortic Sci*, **44**(2):474-475

Zheng W, Xu XD, Dai H, et al. 2009b. Direct regeneration of plants derived from *in vitro* cultured shoot tips and leaves of three *Lysimachia* species[J]. *Sci Hortic*, **122**(1):138-141

Zhou XL(周筱玲), Liao L(廖亮), Chen Y(陈晔), et al. 1999. Study on karyotypes of two species in *Lysimachia*(Primulaceae) from China(两种过路黄的核型研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **19**(3):236-238



(上接第 392 页 Continue from page 392)

The review of higher plants glutamine synthetase(高等植物谷氨酰胺合成酶研究进展)[J]. *J Biol*(生物学杂志), **18**(4):1-3

Martin A, Lee J, Kichey T, et al. 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production[J]. *Plant Cell*, **18**:3 252-3 274

Masakazu T, Ulrika V, Brad B, et al. 2004. Arabidopsis thaliana GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts[J]. *Plant Cell*, **16**:2 048-2 058

Miflin BJ, Habash DZ. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops[J]. *J Exp Bot*, **53**:979-987

Morey KJ, Ortega JL, Sengupta-Gopalan C. 2002. Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by a multigene family, and members are regulated in an organ-specific and developmental manner[J]. *Plant Physiol*, **128**:182-193

Takashi T, Takeshi Y, Katsushige M, et al. 1998. γ -Glutamyl Transfer Reactions by glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -Glutamylmethylamide[J]. *Biosci Biotechnol & Biochem*, **62**(7):1 279-1 283

Sasaoka K, Kito M, Onishi Y. 1965. Some properties of the theanine synthesizing enzyme in tea seedlings[J]. *Agric & Biol Chem*, **29**:984-98

Shi CY(史成颖), Wan XC(宛晓春), Jiang CJ(江昌俊) et al. 2007. Method for high-quality total RNA isolation from tea plant [*Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze](提取高质量茶树总 RNA 的方法研究)[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报), **34**(3):360-363

Tsushida T, Takeo T. 1984. Occurrence of theanine in *Camellia japonica* and *Camellia sasanqua* seedlings [J]. *Agric Biol Chem*, **48**(11):2 861-2 862

Qiao FL(乔富廉). 2002. Analysis Determination Technique of Plant Physiology Experiment(植物生理学实验分析测定技术)[M]. Beijing(北京): China Agriculture Science and Technique Press(中国农业科技出版社):130

Shi CY(史成颖), Wan XC(宛晓春), Jiang CJ(江昌俊), et al. [J]. 2007. Method for high-quality total RNA isolation from tea plant (提取高质量茶树总 RNA 的方法研究)[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报), **34**(3):360-363

Wan XC(宛晓春). 2003. Tea Biochemistry(茶叶生物化学)[M]. 3rd Ed(第3版). Beijing(北京): China Agriculture Science and Technique Press(中国农业科技出版社):32-34, 319-350

Yang XQ(杨贤强). 1987. Physiological and biochemical basis of nitrogen metabolism characteristics of tea plant [*Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze](茶树氮代谢特点的生理生化基础)[J]. *J Tea Fujian*(福建茶叶), **1**:11-14

Yang XQ(杨贤强). 1987. The physiological and biochemical basis of nitrogen metabolism characteristics in tea plant(茶树氮代谢特点的生理生化基础)[J]. *Tea Fujian*(福建茶叶), **1**:11-14

Zhang CF, Peng SB, Peng XX, et al. 1997. Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice(*Oryza sativa* L.) roots[J]. *Plant Sci*, **125**:163-170

Zhu WX(朱文嫻), Li XH(黎星辉), Wang LY(王丽鸳), et al. 2008. Construction of *E.coli* recombinant engineered strain for theanine biosynthesis with GS gene embedded(利用 GS 基因构建茶氨酸生物合成工程菌的研究). [J]. *J Tea Sci*(茶叶科学), **28**(4):242-248