

杜小姣, 梁小红, 葛永强, 等. 大叶落地生根谷氨酸脱羧酶基因 (*KdGAD*) 的克隆与表达[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 34-42.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.006

# 大叶落地生根谷氨酸脱羧酶基因 (*KdGAD*) 的克隆与表达

杜小姣<sup>1</sup>, 梁小红<sup>2</sup>, 葛永强<sup>1</sup>, 段雪娇<sup>1</sup>, 张利娟<sup>3</sup>, 钟天秀<sup>4</sup>

(1. 深圳市日昇园林绿化有限公司, 广东 深圳 518040; 2. 北京林业大学林学院草坪研究所, 北京 100083; 3. 暨南大学深圳旅游学院, 广东 深圳 518053; 4. 华南农业大学林学与风景园林学院草业科学系, 广东省草业工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

**摘要:** 为研究大叶落地生根中胎生苗发育的分子机制, 利用 RACE-PCR 技术从大叶落地生根中克隆了 1 个新的谷氨酸脱羧酶基因 (*KdGAD*)。该基因开放阅读框长度为 1 509 bp, 编码 502 个氨基酸残基, 分子量为  $5.657 \times 10^4$ , 等电点为 5.43。其氨基酸序列与蓖麻的同源性最高, 与人参的进化关系最近, 含有保守的 Ser (S)-x-x-Lys (K) 基序和 Trp (W) 残基。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, 该基因在大叶落地生根的茎中表达量最高, 且受渗透胁迫 (甘露醇处理) 的诱导下调表达。

**关键词:** 大叶落地生根; 谷氨酸脱羧酶; 基因克隆; 基因表达

**中图分类号:** S682.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0034-09

## cDNA cloning and expression analysis of glutamate decarboxylase gene (*KdGAD*) in *Kalanchoe daigremontiana*

DU Xiao-jiao<sup>1</sup>, LIANG Xiao-hong<sup>2</sup>, GE Yong-qiang<sup>1</sup>, DUAN Xue-jiao<sup>1</sup>, ZHANG Li-juan<sup>3</sup>, ZHONG Tian-xiu<sup>4</sup>

(1. Shenzhen Risheng Landscape Company Limited, Shenzhen 518040, China; 2. Turfgrass Research Institute, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Shenzhen Tourism College of Ji'nan University, Shenzhen 518053, China; 4. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangdong Engineering Research Center of Grassland Science, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To better understand the molecular mechanisms of plantlet formation involved in *Kalanchoe daigremontiana*, a glutamate decarboxylase (GAD) gene, *KdGAD*, was identified using rapid amplification of cDNA end (RACE) PCR. *KdGAD* gene consisted of an ORF of 1 509 bp, which was predicted to encode a 502 amino acid residue protein of  $5.657 \times 10^4$  with an isoelectric point of 5.43. The sequence analysis of the *KdGAD* revealed homology to *Ricinus communis*. Phylogenetic analysis showed that *KdGAD* protein was most related to *Panax ginseng*. In addition, *KdGAD* protein possessed a Ser (S)-X-X-Lys (K) active site and a single tryptophan (W) residue. Real-time PCR analysis revealed that *KdGAD* transcript was expressed highly in stem and down-regulated under osmotic stress (treatment with mannitol).

**Key words:** *Kalanchoe daigremontiana*; glutamate decarboxylase; gene cloning; gene expression

收稿日期: 2016-05-17

基金项目: 深圳市知识创新项目 (20160093); 北京林业大学与深圳市日昇园林绿化有限公司产学研合作项目

作者简介: 杜小姣 (1987-), 女, 河南邓州人, 本科, 工程师, 主要从事园林绿化工作。 (Tel) 15889600573; (E-mail) 15889600573@163.com

通讯作者: 钟天秀, (E-mail) zhongxinbi@163.com

谷氨酸脱羧酶 (*GAD*) 主要存在于细胞质, 催化谷氨酸脱羧产生  $\gamma$ -氨基丁酸 (*GABA*) 和  $\text{CO}_2$ , 被认为是 *GABA* 合成的关键酶<sup>[1-2]</sup>。谷氨酸是一种酸性氨基酸, 由高等植物氮代谢第一步合成产生。由谷氨酸合成的谷氨酸盐和天冬酰胺, 通过韧皮部运输到植物各组织, 进行其他氨基酸和蛋白质

的合成。谷氨酸在韧皮部和果实中的浓度都很高。谷氨酸脱羧产物  $\gamma$ -氨基丁酸是一种功能性非蛋白质氨基酸,具有增进脑活力、安神、调节激素分泌、降血压、治疗癫痫、增强记忆力、改善更年期综合症等多种生物学功能<sup>[3-6]</sup>;在植物细胞逆境防御、氮素存储、激素合成及生长发育等过程中也有重要作用<sup>[7]</sup>。例如,在低温和热胁迫下,GABA 会大量积累<sup>[8-9]</sup>。

目前,已从矮牵牛<sup>[10]</sup>、土豆<sup>[11]</sup>、拟南芥<sup>[12]</sup>、水稻<sup>[13]</sup>、烟草<sup>[14]</sup>、香蕉<sup>[15]</sup>等多种植物中克隆和鉴定了 *GAD* 基因。Kisaka 等<sup>[16]</sup>从西红柿幼苗根部克隆出 *GAD* 基因,通过反义技术沉默该基因表达,获得的转基因西红柿植株中谷氨酸含量大大增加,相对于野生型植株,谷氨酸含量提高至少 2 倍以上,游离总氨基酸含量也相对提高。Sorrequieta 等<sup>[17]</sup>发现 *GAD* 基因活性降低后,GABA 含量显著下降。而且,敲除 *GAD* 基因可以导致拟南芥根发育异常。过表达缺失钙调蛋白(CaM)结合域的 *GAD* 基因,细胞内 GABA 含量显著升高,谷氨酸含量降低,植物生长发育异常,由于皮层薄壁组织细胞无法伸长而出现短茎现象<sup>[18]</sup>。植物细胞内低浓度的 GABA 能促进茎的延伸,而当浓度大于 250  $\mu\text{mol/L}$  时,就产生抑制作用,同时诱导 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 的表达和乙烯的产生<sup>[19-20]</sup>。在花粉管向雌蕊柱头伸长的过程中,GABA 含量大量增加,GABA 刺激花粉管的生长<sup>[21]</sup>。因此,*GAD* 在植物发育过程中的正常表达非常重要,调控植物体多项生命活动。

大叶落地生根是一种常见的园艺植物,常用来做盆景和地被。大叶落地生根胎生苗的发生过程同时具有胚胎发生和器官发生的特征,是研究无性生殖的理想模型。北京林业大学草坪研究所利用抑制消减杂交技术(SSH)构建了大叶落地生根胎生苗和普通叶片的 SSH-cDNA 文库,并从该文库中筛选出一条与 *GAD* 基因片段同源的表达序列标签(EST)。本研究以该 EST 片段为基础,采用 RACE-PCR 技术克隆大叶落地生根 *GAD* 的 cDNA 基因(*KdGAD*),利用生物信息学方法分析 *KdGAD* 基因的序列、编码的蛋白质结构和系统发育,并研究该基因在大叶落地生根不同组织和渗透胁迫诱导下的表达变化,为该基因的进一步研究利用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料的培养

大叶落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)种植于北京林业大学草坪研究所温室,培养基质为腐叶土、蛭石和珍珠岩按 4:2:1 混合,在 16 h 光照/8 h 黑暗、光照度 1 389 lx、温度 (30 $\pm$ 3)  $^{\circ}\text{C}$  下培养。叶片采集后快速在液氮中固定,置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存。

### 1.2 总 RNA 的提取和反转录

使用 TaKaRa MiniBEST universal RNA 提取试剂盒(No.9769)提取大叶落地生根叶片总 RNA,并在 -80  $^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 1.3 *KdGAD* 基因的克隆和测序

根据差减文库的测序结果,分别设计上游引物 F1 和下游引物 R1(表 1)。以总 RNA 为模板,按照 PrimeScript<sup>TM</sup> II High Fidelity RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司产品)的操作说明合成第一链 cDNA,使用 TaKaRa TksGflex DNA polymerase (No.R060A)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{l}$ ,包括 1  $\mu\text{l}$  cDNA 模板、1  $\mu\text{l}$  TksGflex DNA Polymerase (1.25 U/ $\mu\text{l}$ )、F1 Primer (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、R1 Primer (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、2 $\times$ Gflex buffer (Mg<sup>2+</sup>, dNTP plus) 25  $\mu\text{l}$ 、dH<sub>2</sub>O 21  $\mu\text{l}$ 。反应程序为:98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 30 个循环。以上述 PCR 产物为模板,进行二次 PCR,反应体系及条件同上。取 5  $\mu\text{l}$  PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA 提取试剂盒(Ver. 3.0, No.9762)回收,用 R1 为特异引物对回收后的 DNA 测序。

根据获得的 *KdGAD* 基因 cDNA 片段序列设计 5' RACE Outer PCR 特异引物 R01 和 Inner PCR R0(表 1)。使用 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech Cat. No.634923)对反转录总 RNA 合成 cDNA。使用 TaKaRa TksGflex DNA 聚合酶(No.R060A)进行 PCR 扩增。Outer PCR 反应完成后,立即取反应液 1  $\mu\text{l}$  进行 Inner PCR 反应。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA 提取试剂盒(Ver. 3.0, No.9762)回收。接着用 TaKaRa DNA 连接试剂盒(Ver.2.1, No.6022)中的连接酶,将 PCR 产物与 T-Vector pMD<sup>TM</sup> 18 (No.3271)进行连接,转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 JM109 (No.9052)中,涂布平板,37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。挑选阳性

菌落,提取质粒,用 KdGAD R02 引物和 KdGAD R1seq 引物进行测序。其中 KdGAD R1seq 引物序列为:5'-GTGGTGACCGGGTATTCATCCA-3'。

根据获得的 *KdGAD* 基因 cDNA 片段序列设计 3'RACE Outer PCR 特异引物 F01 和 Inner PCR 特异引物 F02(表 1)。以 1  $\mu$ l RNA 为模板,使用 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript<sup>TM</sup> RTase(No.6106)反转录合成 cDNA。使用 TaKaRa TksGflex DNA 聚合酶(No.R060A)进行 PCR 反应。两轮 PCR 反应完成后,PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。经胶回收和连接克隆,用 M13-47 引物对质粒进行测序分析。具体步骤同上述 5'RACE。

对 *KdGAD* 基因 cDNA 片段 5'端和 3'序列进行拼接,获得 *KdGAD* 基因的全长序列。并分别设计上游引物 YZF1 和 YZF2 及下游引物 YZR1(表 1)。以上述大叶落地生根叶片第一链 cDNA 为模板,进行两轮 PCR 反应。第一轮 PCR 反应使用引物 YZF1 和 YZR1,第二轮 PCR 反应使用引物 YZF2 和 YZR1。用 TaKaRa TksGflex DNA 聚合酶(No.R060A)进行 PCR 扩增。取 5  $\mu$ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。PCR 纯化后的产物使用 KdGAD YZF2 Primer、KdGAD YZR1 Primer、KdGAD F1 Primer 引物进行测序。

#### 1.4 *KdGAD* 基因的生物信息学分析

应用 NCBI 数据库中 ORF Finder 软件寻找 *KdGAD* 序列中的开放阅读框(ORF),推导编码的氨基酸序列。应用 Expasy 软件中 ScanProsite、ProtParam、TMPred、ProtScale 程序分析 *KdGAD* 基因编码蛋白质的保守结构域、分子量、等电点、跨膜结构域和亲疏水性<sup>[22]</sup>。用 BLAST 程序检索相似蛋白质,利用 ClustalX 2.1 软件对不同物种的氨基酸序列进行多重比对<sup>[23]</sup>。利用 MEGA 6.0(邻接法)构建氨基酸序列系统进化树,并用 bootstrap 校正<sup>[24]</sup>。根据 NPS@ web server 网站中的 PHD 方法预测蛋白质的二级结构<sup>[25]</sup>。应用在线分析工具 Phyre 分析 *GAD* 蛋白质三级结构<sup>[26]</sup>。

#### 1.5 *KdGAD* 基因表达的荧光定量分析

以大叶落地生根 *actin* 基因作为内参基因,上、下游引物分别为 Actin-F 和 Actin-R(表 1),根据 *KdGAD* 基因序列信息设计荧光定量的上游引物 F2 和下游引物 R2(表 1)。以大叶落地生根的根、茎、叶、叶柄总 RNA 分析 *KdGAD* 基因在不同组织中的表达

情况。对大叶落地生根幼苗进行渗透胁迫处理(300 mmol/L甘露醇处理),分别在处理的 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h 采集叶位相同叶片,每个处理设 3 个重复,3 个重复混合取样,提取总 RNA 分析 *KdGAD* 基因在渗透胁迫下的表达情况。按照 1st Strand cDNA 合成试剂盒(TaKaRa 公司产品)操作说明合成 cDNA,根据 SYBR FAST qPCR Kit Master Mix(2 $\times$ ) Universal (KAPA Biosystems)试剂盒进行 PCR 扩增。荧光定量反应体系为:SYBR FAST qPCR Kit Master Mix(2 $\times$ ) Universal 5.0  $\mu$ l,上下游引物(10  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ l,cDNA 1.0  $\mu$ l,ROX 校正染料 0.2  $\mu$ l,dH<sub>2</sub>O 3.4  $\mu$ l,共 10.0  $\mu$ l。反应在 ABI7900HT 实时定量 PCR 仪上进行,反应条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s。采用 2 <sup>$\Delta\Delta C_t$</sup> 法分析结果。

表 1 *KdGAD* 基因克隆和鉴定中所用的引物序列

Table 1 PCR primer sequences used in cloning and identification of *KdGAD* gene

名称	序列(5'→3')	长度(bp)
F1	ACTACGTGATGGACCCAGTCAA	22
R1	ACTTATTTGGTAAAGCAAGCCG	22
R01	CATCGCGTTTCCTTGGCAGTTC	22
R02	TGAGTTCTTCAGGCAAATCAGC	22
R1seq	GTGGTGACCGGGTATTCATCCA	22
F01	TTCCTCTAGTGGCATTCTCTTT	22
F02	AGGGAAGACTTTTCTCGCACTT	22
YZF1	ATATAAGACCCCCGCGCTCAC	22
YZF2	ATTAAGCAACTCCTGCGACGAT	22
YZR1	GAGAAACAATATAACTTATTTGG	22
F2	CCTTTTCTTTACCCCGACCT	20
R2	GAGGGTGAATGTGGGTTGAT	20
Actin-F	GACTATGAGGCTGAGTTGGAGAC	23
Actin-R	TCAATGAAGGCTGGAAAAGG	20

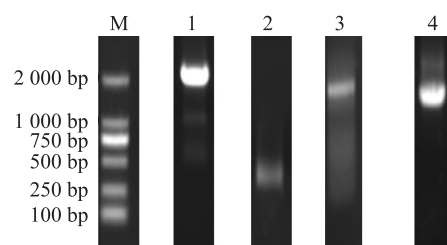
## 2 结果与分析

### 2.1 *KdGAD* 基因的核苷酸序列和编码氨基酸序列

以大叶落地生根叶片第一链 cDNA 为模板,用引物 F1 和 R1 进行 PCR 扩增,获得约 1 000 bp 的目



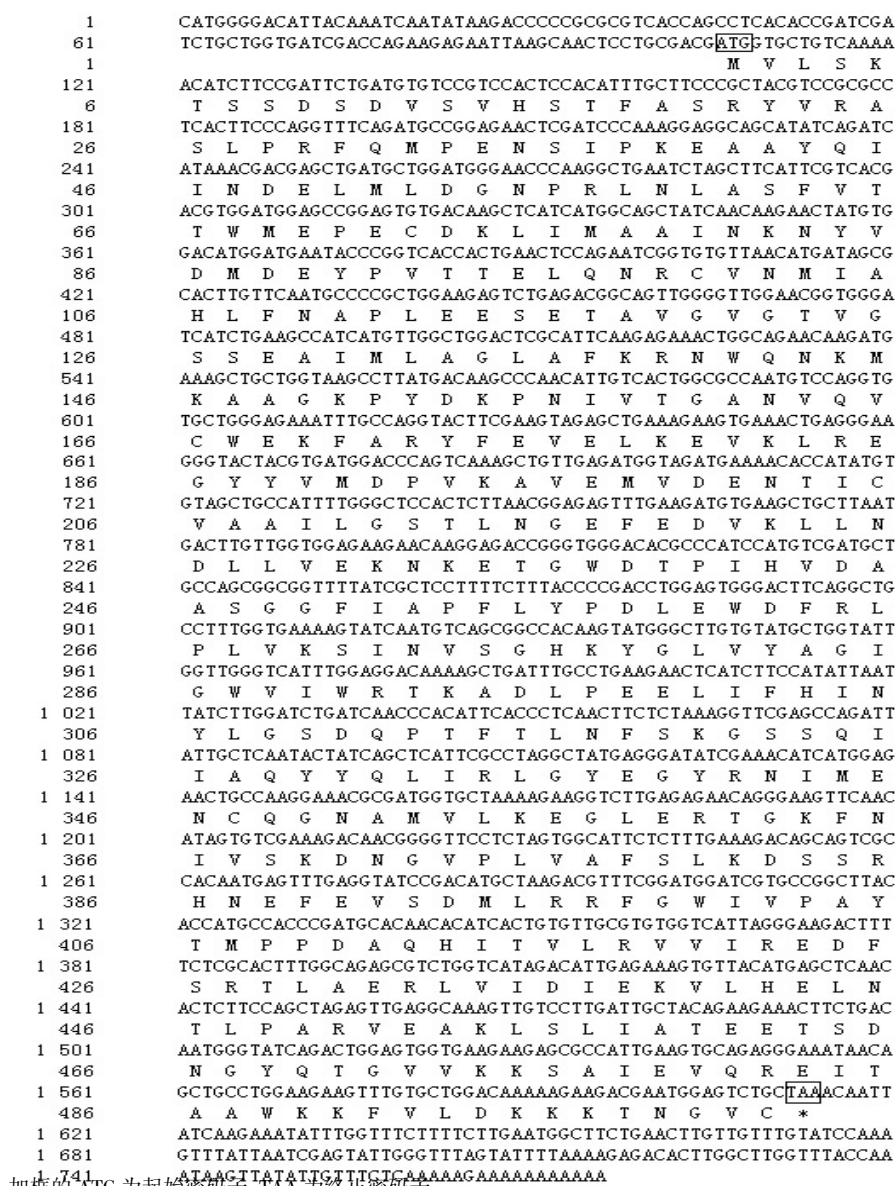
的片段;根据获得的 *GAD* 基因 cDNA 片段序列分别设计 3'RACE 和 5' RACE 特异引物,获得约 300 bp 和 1 000 bp 的目的片段,将获得的 cDNA 片段 5'端和 3'端序列进行拼接,以大叶落地生根叶片第一链 cDNA 为模板,设计验证引物,获得约 1 700 bp 的目的片段(图 1)。因此,大叶落地生根 *GAD* 基因的 cDNA 全长为 1 776 bp (GenBank 登录号: KU740357),命名为 *KdGAD*,含有 1 509 bp 完整开放阅读框(ORF),编码 502 个氨基酸(图 2),不包括 PolyA 尾的长度为 1 765 bp,5'UTR(非编码区)105 bp,3'UTR 162 bp。



M: D2000 DNA marker; 1: 根据差减文库设计引物验证 *KdGAD* 基因; 2: 3' RACE; 3: 5' RACE; 4: RACE 结果验证。

图 1 大叶落地生根 *KdGAD* 基因同源扩增、RACE 克隆以及序列验证

Fig.1 RT-PCR amplification, RACE cloning and sequence verification of *KdGAD* gene in *Kalanchoe daigremontiana*



加框的 ATC 为起始密码子, TAA 为终止密码子。

图 2 大叶落地生根 *KdGAD* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and coded amino acid sequences of *KdGAD* gene of the *Kalanchoe daigremontiana*

## 2.2 KdGAD 蛋白质氨基酸序列及其系统进化树

KdGAD 蛋白质氨基酸序列与蓖麻(XP\_002528515.1)、巨桉(XP\_010062316.1)、毛果杨(XP\_006372416.1)、野生大豆(KHN24164.1)、鹰嘴豆(XP\_004503101.2) GAD 蛋白质的相似性分别为 88%、87%、86%、85%、84%。通过 SIB 中的 Motif Scan 程序,预测 KdGAD 蛋白质中存在一些保守基序,包括 2 个 N-糖基化位点(272~275、317~320)、7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(6~9、66~69、235~238、292~295、379~382、428~431、476~479)、4 个 MYRISTYL 酰基化位点(122~127、211~216、279~284、357~362)、3 个蛋白激酶 c 磷酸化位点(361~363、379~381、383~385)、2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(82~90、182~188)、1 个依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白磷酸化位点(495~498)、2 个组氨酸脱羧酶(51~438、

44~441)、1 个依赖吡哆醛的脱羧酶保守区域(33~381)、1 个 HAT (Half-A-TPR) 重复(143~176)、1 个凝血因子 V LSPD 重复(406~414)。

将大叶落地生根 KdGAD 与其他 4 种植物中谷氨酸脱羧酶氨基酸序列比对,可以看出,不同植物 GAD 氨基酸序列在几个重要功能位点的序列保守性很高,如 PLP 结合域、CaM 结合域(图 3)。为了明确大叶落地生根 KdGAD 与其他植物中类似蛋白质的进化关系,选取了 19 种植物中的 25 个 GAD 蛋白质序列进行分析。利用 Mega6.0 中相邻连接法构建系统进化树(图 4),采用默认参数,自检举 1 000 次,对生成的系统树进行 Bootstrap 校正。结果表明,KdGAD 与人参(ADB82905.1) GAD 蛋白质的进化关系最近,聚为一枝,并且与高粱(XP002468208.1)、水稻(EAY89173.1)属于同一大枝。

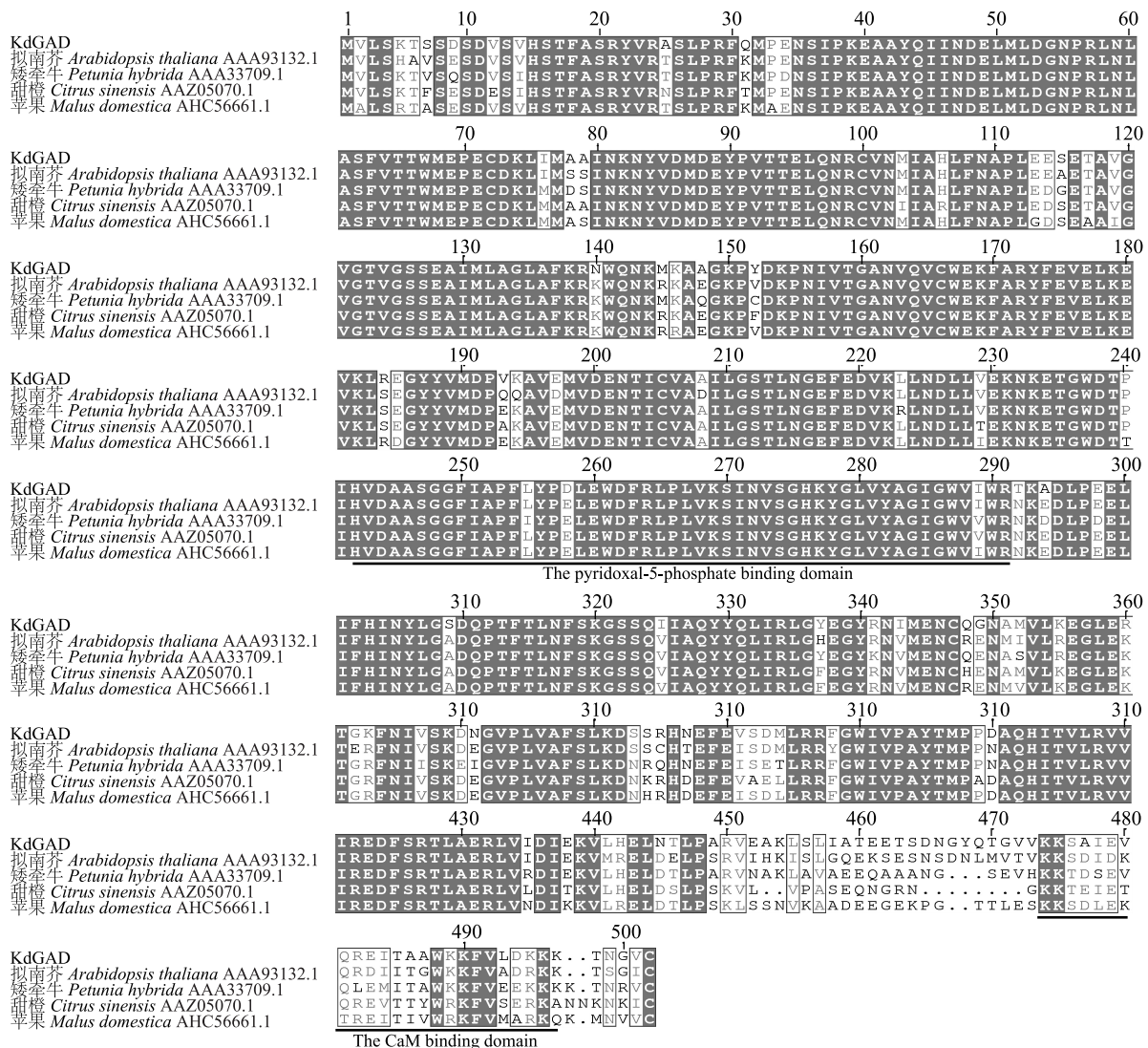


图3 大叶落地生根谷氨酸脱羧酶与其他植物的类似蛋白质氨基酸序列比对

Fig.3 Multiple alignment of amino acid sequences of KdGAD and other known GADs of plant origin

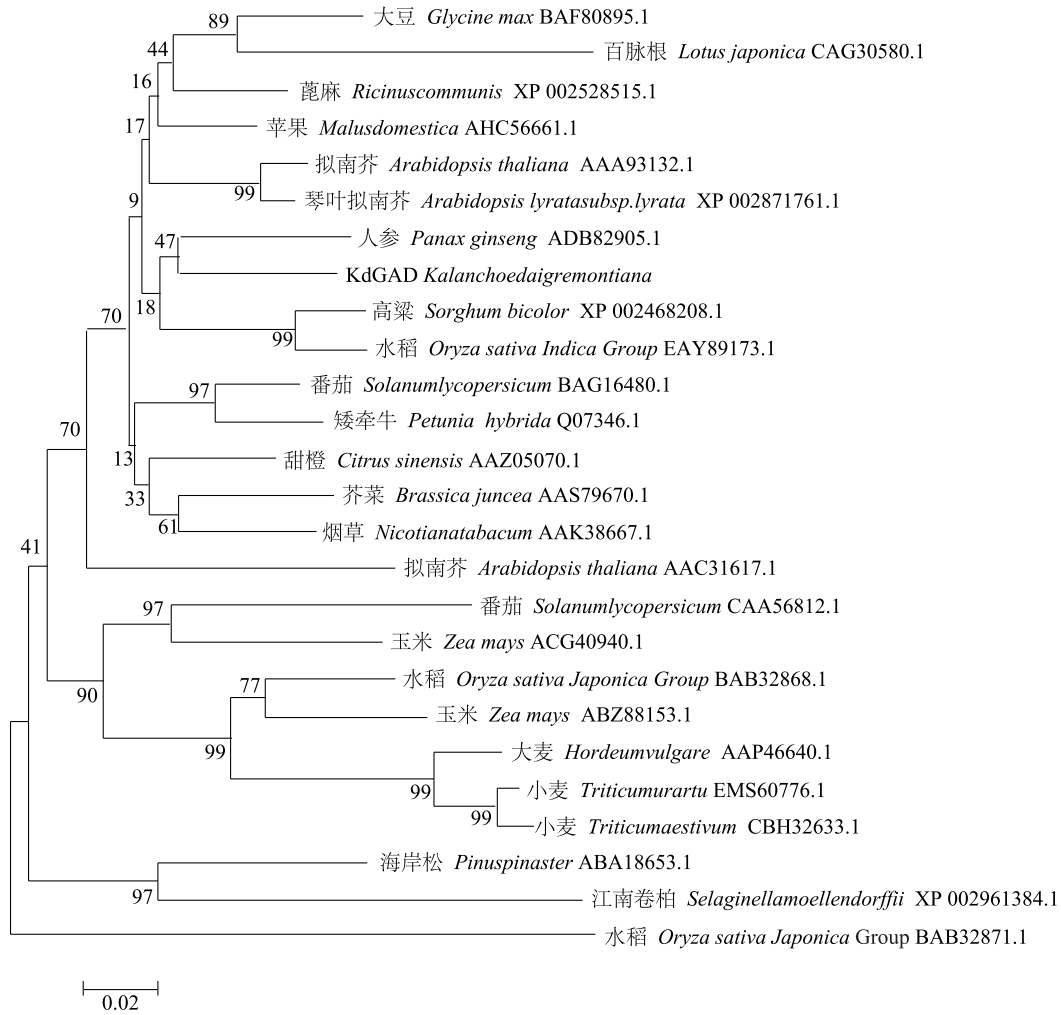


图4 大叶落地生根谷氨酸脱羧酶与其他植物类似蛋白质氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of GADs of *Kalanchoe daigremontiana* and other plants

### 2.3 *KdGAD* 的理化性质及三级结构预测

*KdGAD* 蛋白质的理论分子量为  $5.657 \times 10^4$ , 理论等电点为 5.43。脂溶指数为 91.63, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.177, 不稳定系数为 32.97, 表明该蛋白质是一个稳定的蛋白质。二级结构预测结果表明, *KdGAD* 含有 43.23% 的  $\alpha$ -螺旋, 18.33% 的  $\beta$ -折叠和 38.45% 的随机卷曲, 没有信号肽及其剪切位点, 是水溶性的非分泌型蛋白质, 有 7 个明显的跨膜区 (表 2), 被定位于内质网膜上 (预测精度为 80%)。

通过 Phyre 在线预测网站预测 *KdGAD* 的三维结构, 结果表明, *KdGAD* 蛋白质为二聚体, 一共有 16 个  $\alpha$ -螺旋和 12 个  $\beta$ -折叠 (图 5)。

### 2.4 *KdGAD* 基因的组织表达分析

利用荧光实时定量 PCR 对 *KdGAD* 基因在大叶

落地生根中的表达情况进行检测, 结果显示 *KdGAD* 在茎中表达量最高 (图 6)。*KdGAD* 在各组织中均有表达, 不具有组织特异性。

表 2 预测的 *KdGAD* 跨膜区域

Table 2 Predicted *KdGAD* membrane-spanning regions

类型	预测的跨膜螺旋位置	跨膜螺旋中心位置	可信度 (分数)
膜内向膜外	117 (117) ~ 137 (135)	127	498
	201 (201) ~ 218 (218)	209	94
	236 (236) ~ 256 (256)	246	494
	270 (270) ~ 290 (290)	280	222
膜外向膜内	117 (119) ~ 137 (137)	127	1 270
	239 (239) ~ 260 (260)	251	536
	273 (273) ~ 290 (290)	282	135





图中螺旋为 $\alpha$ -螺旋,箭头为 $\beta$ -折叠,曲线为无规则卷曲。

图5 KdGAD蛋白质的三维结构示意图

Fig.5 The three-dimensional structure of KdGAD

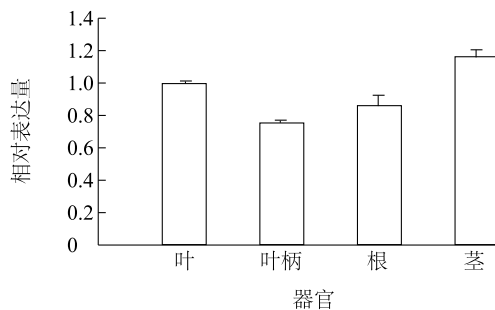


图6 KdGAD基因在大叶落地生根不同器官中的表达

Fig.6 Expression profiling of KdGAD gene in different organs in *Kalanchoe daigremontiana*

### 2.5 KdGAD基因的诱导表达

用300 mmol/L甘露醇对大叶落地生根进行渗透胁迫处理,以实时荧光定量PCR法分析KdGAD基因的表达动态。结果(图7)显示,在甘露醇处理下KdGAD基因的表达总体呈现下降趋势,在处理12 h后KdGAD的表达量达到最低值。

## 3 讨论

本研究克隆和鉴定了大叶落地生根谷氨酸脱羧酶基因(KdGAD),通过NCBI-BLAST同源性比对,发现其编码的氨基酸序列与蓖麻(XP\_002528515.1)的相似性最高(88%),与人参进化关系最近,与水稻、高粱聚为同一亚枝。KdGAD基因包含1 509 bp完整开放阅读框(ORF),编码502个氨基酸,理论分子量为 $5.657 \times 10^4$ ,理论等电点为5.43。三维结构与拟南芥AtGAD1(3HBX) $\beta$ 链晶体结构类似。

多重序列比对结果表明,大叶落地生根谷氨酸脱羧酶(KdGAD)与拟南芥、矮牵牛、甜橙、苹果中的GAD氨基酸序列相似性极高,仅有极少数氨基酸残

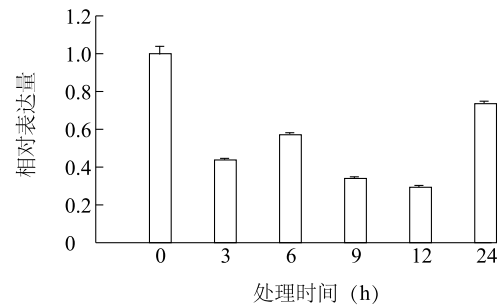


图7 大叶落地生根叶片KdGAD基因在300 mmol/L甘露醇渗透胁迫诱导下的表达情况

Fig.7 Expression profiling of KdGAD gene in response to the 300 mmol/L mannitol treatment in *Kalanchoe daigremontiana* leaves

基不同,氨基酸序列中含有5'-磷酸吡哆醛(PLP)结合位点和钙调蛋白(CaM)结合位点。PLP结合位点的特征序列是Ser(S)-x-x-Lys(K),其中Lys残基对PLP结合至关重要,催化谷氨酸的 $\alpha$ -脱羧产生GABA<sup>[27]</sup>。根据是否依赖CaM/Ca<sup>2+</sup>GAD分为2类:一类是依赖CaM/Ca<sup>2+</sup>的GAD,如拟南芥<sup>[28]</sup>、土豆<sup>[29]</sup>;另一类是不依赖CaM/Ca<sup>2+</sup>的GAD,如水稻<sup>[30]</sup>。在依赖CaM/Ca<sup>2+</sup>的GAD中,通常会出现一个CaM蛋白结合位点,其中Trp(W)残基对CaM蛋白的结合十分重要,而且Trp(W)残基是植物中特有的氨基酸残基位点<sup>[31]</sup>。大叶落地生根谷氨酸脱羧酶(KdGAD)中含有Ser(S)-x-x-Lys(K)基序和Trp(W)残基,说明KdGAD是一个依赖CaM/Ca<sup>2+</sup>的GAD,需要与PLP辅因子结合才具有催化活性。

在不同组织中KdGAD基因的表达量不同,在茎中表达量最高,说明KdGAD可能参与植物器官发育的调控。高等植物中,韧皮部和果实部分谷氨酸含量最高<sup>[32]</sup>,可能是KdGAD基因在茎中表达量最高的原因。在胁迫(甘露醇)处理下,KdGAD基因表达量逐渐下降,这与Lee等<sup>[33]</sup>研究结果一致。随细胞内Ca<sup>2+</sup>或H<sup>+</sup>浓度提高,GAD活性增强,催化谷氨酸的脱羧反应。通过二元机制,植物积累GABA以抵御环境胁迫。真空环境引起细胞酸性中毒,GABA大量积累抵御环境胁迫<sup>[34]</sup>。在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或甘露醇处理下,会产生大量的活性氧,植物为了防止活性氧对细胞的伤害,在超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)等抗氧化酶的作用下,消耗H<sup>+</sup>,将活性氧还原分解。H<sup>+</sup>浓度的下降,可能是KdGAD基因表达量下降的原因之一。本研究对大叶落地生根谷氨酸

脱羧酶进行克隆和生物信息学分析,结果表明 *KdGAD* 基因具有组织特异性,对渗透胁迫有响应,但是关于 *KdGAD* 基因是否在大叶落地生根中参与胚胎建成和抗逆境胁迫响应途径还需要进一步的试验验证。

### 参考文献:

- [1] HUANG W M, REED-FOURQUET L, WU E, et al. Molecular cloning and amino acid sequence of brain L-glutamate decarboxylase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(21): 8491-8495.
- [2] 朱云辉,段元锋,郭元新. 苦荞发芽过程中  $\gamma$ -氨基丁酸的富集及其他生理指标的变化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 332-335.
- [3] HAYAKAWA K, KIMURA M, KASAHA K, et al. Effect of a  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar - Kyoto rats [J]. British Journal of Nutrition, 2004, 92(3): 411-417.
- [4] BAEK S H, PARK S, LEE H G. Hypocholesterolemic action of fermented brown rice supplement in cholesterol-fed rats: cholesterol-lowering action of fermented brown rice[J]. Journal of Food Science Chicago, 2005, 70(8): 527.
- [5] LEVENTHAL A G, WANG Y, PU M, et al. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys[J]. Science, 2003, 300(5620): 812-815.
- [6] ZAREIAN M, OSKOU EI AN, FORGHANI B, et al. Production of a wheat-based fermented rice enriched with  $\gamma$ -amino butyric acid using *Lactobacillus plantarum* MNZ and its antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16: 194-203.
- [7] BOUCHE N, FROMM H. GABA in plants: just a metabolite? [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(3): 110-115.
- [8] AURISANO N, BERTANI A, REGGIANI R. Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acid metabolism in rice roots under anoxia[J]. Plant and Cell Physiology, 1995, 36(8): 1525-1529.
- [9] MAYER R R, CHERRY J H, RHODES D. Effects of heat shock on amino acid metabolism of cowpea cells[J]. Plant Physiology, 1990, 94(2): 796-810.
- [10] BAUM G, CHEN Y, ARAZI T, et al. A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(26): 19610-19617.
- [11] GALLEGÓ P P, WHOTTON L, PICTON S, et al. A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characterisation of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(6): 1143-1151.
- [12] ZIK M, ARAZI T, SNEDDEN W A, et al. Two isoforms of glutamate decarboxylase in *Arabidopsis* are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(6): 967-975.
- [13] AKAMA K, AKIHIRO T, KITAGAWA M, et al. Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2001, 1522(3): 143-150.
- [14] YEVTUSHENKO D P, MCLEAN M D, PEIRIS S, et al. Calcium/calmodulin activation of two divergent glutamate decarboxylases from tobacco[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(389): 2001-2002.
- [15] 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.
- [16] KISAKA H, HIROAKI T, MIWA T. Antisense suppression of glutamate decarboxylase in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) results in accumulation of glutamate in transgenic tomato fruits[J]. Plant Biotechnology, 2006, 23(3): 267-274.
- [17] SORREQUIETA A, FERRARO G, BOGGIO S B, et al. Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate[J]. Amino acids, 2010, 38(5): 1523-1532.
- [18] BAUM G, LEV-YADUN S, FRIDMANN Y, et al. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants[J]. The EMBO Journal, 1996, 15(12): 2988.
- [19] KATHIRESAN A, MIRANDA J, CHINNAPPA C C, et al.  $\gamma$ -aminobutyric acid promotes stem elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene[J]. Plant Growth Regulation, 1998, 26(2): 131-137.
- [20] MOLINA-RUEDA J J, PASCUAL M B, PISSARRA J, et al. A putative role for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in vascular development in pine seedlings[J]. Planta, 2015, 241(1): 257-267.
- [21] PALANIVELU R, BRASS L, EDLUND A F, et al. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels[J]. Cell, 2003, 114(1): 47-59.
- [22] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[M]. Walker; Humana Press, 2005: 571-607.
- [23] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [24] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [25] COMBET C, BLANCHET C, GEOURJON C, et al. NPS@: network protein sequence analysis[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(3): 147-150.
- [26] KELLEY L A, STERNBERG M J E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server[J]. Nature Pro-



- tocols, 2009, 4(3): 363-371.
- [27] ZIK M, FRIDMANN-SIRKIS Y, FROMM H. C-terminal residues of plant glutamate decarboxylase are required for oligomerization of a high-molecular weight complex and for activation by calcium/calmodulin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2006, 1764(5): 872-876.
- [28] TURANO F J, FANG T K. Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117(4): 1411-1421.
- [29] GALLEGO P P, WHOTTON L, PICTON S, et al. A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characterisation of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 27(6): 1143-1151.
- [30] AKAMA K, AKIHIRO T, KITAGAWA M, et al. Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2001, 1522(3): 143-150.
- [31] ARAZI T, BAUM G, SNEDDEN W A, et al. Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(2): 551-561.
- [32] KISAKA H, HIROAKI T, MIWA T. Antisense suppression of glutamate decarboxylase in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) results in accumulation of glutamate in transgenic tomato fruits[J]. *Plant Biotechnology*, 2006, 23(3): 267-274.
- [33] LEE J, KIM Y, JEONG D, et al. Isolation and characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) gene and their differential expression in response to abiotic stresses from *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(7): 3455-3463.
- [34] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2006, 1757(5): 509-517.

(责任编辑:张震林)