

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.06.031

# 芜青中谷氨酸脱羧酶(Gad)酶性质的时空差异

彭彤<sup>1</sup>, 郭艳芳<sup>1</sup>, 何韵云<sup>1</sup>, 郭亦然<sup>2</sup>, 唐琳<sup>1</sup>, 陈放<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 北京航空航天大学生物科学与医学工程学院, 北京 100191)

**摘要:** 该文对芜青中谷氨酸脱羧酶(Gad)粗酶的提取和优化、酶活力最适反应条件、时空分布差异及光照影响等进行对比分析,同时利用超高效液相色谱法技术(UPLC)分析测定反应产物 $\gamma$ -氨基丁酸(Gaba)的含量.实验结果表明,提取Gad粗酶时加入纤维素酶能提高约70%酶活力.在最适条件对比实验中,对芜青芽苗、块根、茎生长点、茎及顶端分生组织分别进行测定,其中芽苗与顶端分生组织中的酶活力较高.光照对萌发中芽苗的Gad酶活力有较大影响,避光条件下酶活力下降约75%.结果表明,芜青芽苗Gad酶活力好且易于获取,转化谷氨酸反应生成 $\gamma$ -氨基丁酸的转化率高.

**关键词:** 芜青; 谷氨酸脱羧酶(Gad); 酶活力;  $\gamma$ -氨基丁酸(Gaba)

**中图分类号:** Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)06-1323-06

## The spatial and temporal variation of glutamate decarboxylase (Gad) property in *Brassica rapa* L. ssp *rapa*

PENG Tong<sup>1</sup>, GUO Yan-Fang<sup>1</sup>, HE Yun-Yun<sup>1</sup>, GUO Yi-Ran<sup>2</sup>, TANG Lin<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. School of biological science and medical engineering, Beijing University of Aeronautics and Astronautics, Beijing 100191, China)

**Abstract:** In this study, crude enzyme extraction method, diversity property and light influence of glutamate decarboxylase(Gad) in *Brassica rapa* L. ssp *rapa* were analyzed. Ultra Performance Liquid Chromatography(UPLC) method was used to measure the production in Gad catalyzed progress-Gamma-aminobutyric acid(Gaba). Adding 1% cellulase solution at homogenization step could improve the enzyme activity up to about 70% as much. Meanwhile, when pH were 4.5~6 with the temperature of 55°C, enzyme had reached its maximum activity, on the other hand  $Ca^{2+}$  and coenzyme Plp didn't have any contribution. Among the different developing stages of *Brassica rapa* L. ssp *rapa*, extraction of sucking seedling apical meristem could generate more Gaba. In general, with proper conditions, the sucking seedling could be the most efficient material and easily obtained.

**Keywords:** *Brassica rapa* L. ssp *rapa*; Glutamate decarboxylase (Gad); Enzyme activity; Gamma-aminobutyric acid(Gaba)

## 1 引言

芜青(*Brassica rapa* L. ssp *rapa*)为十字花科

芸薹属芜青种芜青亚种,俗称圆根、盘菜、蔓菁、恰玛古(维语)等,其味甜,肉质细嫩,于地中海沿岸、巴基斯坦、阿富汗等地起源,后传入美洲、亚洲等地

收稿日期: 2017-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(31100257)

作者简介: 彭彤(1985-),男,四川绵阳人,博士,研究方向:植物学天然产物化学. E-mail: pobo66@gmail.com

通讯作者: 陈放. E-mail: fangchenscu@163.com

栽培<sup>[1]</sup>. 它的环境适应性强, 分布范围广, 药食两用, 作为传统药见载于《维吾尔药志》、《中国中草药大全》等典籍. 维药中常以芫青成熟干燥的种子油即芫青子油入药, 其主要具有治疗黄疸、痢疾、青盲的功效. 中医以其块根、种子入药, 性能清肝明目, 利湿退黄等. 现代药理研究中表明, 芫青中含多种氨基酸、糖及脂类及黄酮类化合物<sup>[2]</sup>等, 其提取物也显示了抗氧化、抗癌及保肝的作用<sup>[3]</sup>. 而芫青中保肝和增加外周血流量活性成分为芫青酸即 4-(甲酰基-5-羟甲基-1 氢-吡咯-1-基)丁酸, 它的前体物质即为 Gaba<sup>[4]</sup>, 主要由谷氨酸脱羧酶(Gad)催化谷氨酸(Glu)进行脱羧反应生成. Gaba 是植物与微生物的代谢产物, 在哺乳动物大脑中作为一种重要的抑制性神经递质, 能够介导抗癫痫、抗焦虑的药物, 同时也是肌肉迟缓药物、抗惊厥药物、镇静药物等多种功能药物作用的重要靶标<sup>[5]</sup>.

施一公<sup>[6]</sup>等以大肠杆菌为研究对象, 发现 Gaba/Glu 的反向转运蛋白在 pH 为 6.5 以下才具备转运活性, 当 pH 为 4.5 时其活性达到最大. 而将具有更加广泛 pH 值优势的突变型大肠杆菌 Gad 酶基因与棒状杆菌重组后, Gaba 转化率在 pH=7 时达到最大<sup>[7]</sup>, 说明 pH 对于 Gad 酶活性的影响决定着 Gaba 的产量, pH 值改变对酶活有重要影响.

植物芫青中不同组织部分的 Gad 酶活力是否存在差异, Gaba 含量在哪个部位累计达到最高, 在国内外研究中提及甚少, 而目前文献中给出的 Gaba 等氨基酸含量测定法甚少<sup>[8]</sup>. 采用 2,4-二硝基氟苯(FDNB)柱前衍生法联用超高效液相测定 Gaba 含量, 比传统的高效液相法更高效准确<sup>[9]</sup>, 很好地揭示出了芫青中 Gaba 的分布差异.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

实验用植物芫青(西藏)于 2015 年 11 月采集, 新鲜组织 4℃ 保存, 种子阴干后室温保存. 超高效液相色谱仪(Waters, Miford MA, USA); 乙腈与甲酸(购自 Swell)、2,4-二硝基氟苯(FDNB)(购自百灵威)均为色谱纯; 超纯水; 精密电子天平(购自 Mettler Toledo); 电热恒温水槽(DK-8D, 购自上海一恒科学仪器有限公司);

### 2.1 方法

2.2.1 Gad 粗酶提取与优化 提取芫青中 Gad 酶时, 用液氮将组织冷冻预处理后以水: 组织 = 1g: 1g 的比例进行研磨仪匀浆, 离心后取上清. 纤

维素对照组在液氮处理后, 以浓度为 1% 纤维素酶液进行反应 20min, 70HZ 匀浆 3min.

2.2.2 单因素试验 植物中的 Gad 酶活性与种子的发育、成熟及组织衰老有关, 而不同种植物酶性质存在差异. 通过对单因素 pH(2-10)、温度(T=20~90℃)、辅酶磷酸吡哆醛(Plp=0~2mmol/L)、钙离子浓度(Ca<sup>2+</sup>=0~50μg/L)的摸索, 对比得出 γ-氨基丁酸(Gaba)体外最适转化条件, 实验中采用 2,4-二硝基氟苯(FDNB)对加入底物谷氨酸(Glu)反应后的溶液进行柱前衍生, 再将样品加入超高效液相色谱仪(Ultra Performance Liquid Chromatography/ UPLC)进行分析, 得出波形整齐、精确度高且稳定性好的结果.

2.2.3 比较不同产地芫青块根及芽苗酶活力 芫青中 Gad 酶活差异在不同产地品种以及同一产地品种的不同组织中都有体现. 实验选择来自西藏曲水(1#)、仁布(2#)及昌都(3#)三个地区的芫青块根及曲水、仁布两地种子萌发的芽苗进行酶活比较, 选取优势较大的材料, 利用 UPLC 分析方法对各种的芫青材料中的 Gaba 含量进行测定, 计算酶活.

2.2.4 光照对芽苗中酶的影响 芽苗作为植物生长发育中的重要阶段, 以其收获周期短、易萌发、产量大及酶活高等优势, 成为实验材料的首选. 本实验中, 在光照差异条件下, 萌发周期一致的芽苗 Gad 酶活有显著差异. 同时, 作为 L-谷氨酸代谢途径的另一重要组成, 芫青中谷氨酰胺(Gln)的含量及谷氨酰胺合成酶(GS)酶活与 Gad 之间呈现相关性.

## 3 结果与分析

### 3.1 Gad 酶的提取优化比较

植物中的纤维素含量高, 未经液氮冷冻的组织匀浆并不均匀, 冷冻预处理后的组织匀浆均质化程度更高, 经离心后提取的粗酶上清液呈淡黄色. 而加入纤维素酶处理的实验组研磨效果最好, 且上清中加入底物反应前后 Gaba 含量差值即 ΔGaba 由不加纤维素酶的 21.79mg/mL 提高到 36.4mg/mL(见图 1), Gad 酶活提高约 1.5 倍(见表 1), 1g 组织中的酶单位含量增大约两倍.

表 1 优化前后酶活力对比

Tab. 1 Compared with the results of using cellulase

方法	酶活力(U)	酶单位(U/wt)
无纤维素酶	2.01	13.41
有纤维素酶	3.43	22.87

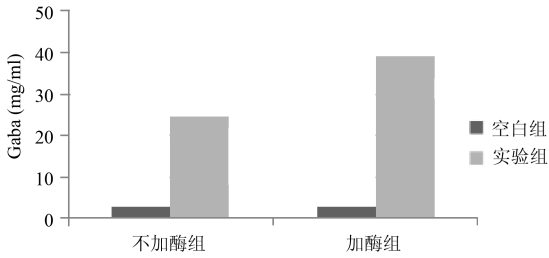


图1 优化前后 Gaba 含量变化

Fig. 1 Different content of Gaba after using cellulase.

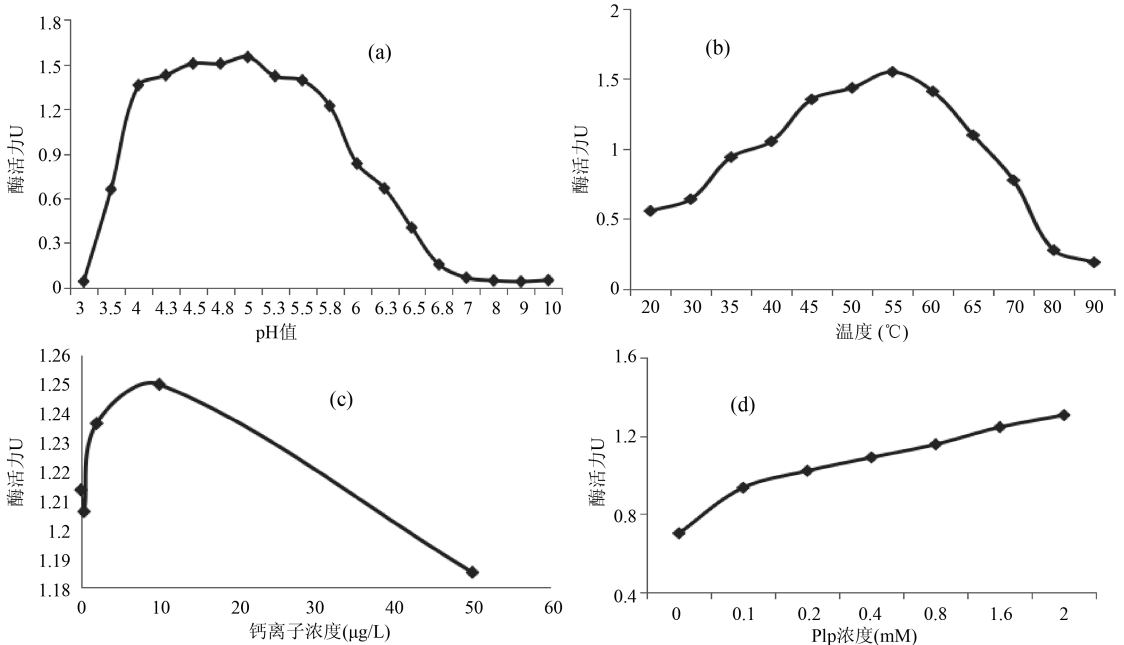


图2 不同条件对酶活力影响

a. pH; b. 温度; c. 钙离子浓度; d. Plp

Fig. 2 Gad enzyme activity at different pH

3.2.2 温度对酶活的影响 如图2(b),温度作为反应中重要条件,它的变化对产物含量的影响值得探索.实验数据表明温度在20~60℃时,Gaba含量快速升高,Gad酶活高,温度继续升高至T=60~90℃时,酶活迅速减小.T=55℃时,酶活达到最大,以T=55℃为反应最适温度.

3.2.3 钙离子浓度对酶活力的影响 如图2(c),相关文献曾报道过大豆、番茄、矮牵牛等植物的Gad酶蛋白结构中载有一段粘有钙调蛋白而延长的C-末端区域,植物源Gad酶与微生物和动物来源Gad酶的区别就在于植物源Gad多了一段30~50个氨基酸残基的钙调蛋白区域,不同的Gad酶亚型对钙离子/钙调蛋白(Ca<sup>2+</sup>/CaM)敏感程度不一,Ca<sup>2+</sup>对其活性的影响也存在差异或没有影响如Md型Gad1<sup>[10]</sup>.芜青中的Gad酶的结构及性质目前尚不明确,从实验结果来看,钙离子浓度从0

### 3.2 单因素试验分析

3.2.1 pH值对酶活的影响 pH值是溶液最重要的理化参数,也是对活性物质有较大影响的环境因素.Gad酶作为L-谷氨酸向Gaba转化的关键限速酶,其活性的大小与产物Gaba的含量有很大关联,实验数据表明pH在4到10之间变化时,酶活力先缓慢上升,在达到7以后迅速下降.而pH=4.4~5.6时,酶活力一直在上升,并于pH=5.0时,达到最大值.故选择以5.0作为反应的最适pH.

升高到50μg/L,酶活先升高再降低,最大差值为0.06U,对比pH和温度对酶活影响最大差值分别为1.51U和1.36U,由此,钙离子对芜青中Gad酶活的影响并不显著.

3.2.4 辅酶磷酸吡哆醛(Plp)对酶活的影响 如图2(d),磷酸吡哆醛(Plp)是Gad酶亚基结构中的组成部分,也是谷氨酸脱羧反应中的关键限速酶.Gad由Plp与脱辅基酶蛋白构成,Plp作为Gad酶的辅基,通过与脱辅基酶蛋白的解离和聚合调节酶的活性<sup>[11]</sup>.实验结果表明,当Plp浓度逐渐由0升到2mM时,酶活随之增大0.4U,由此,Plp对芜青中的Gad酶活有一定的影响.

### 3.3 不同产地芜青块根、芽苗的Gaba含量和酶活力比较

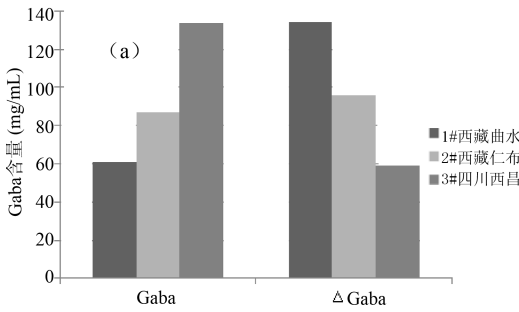
3.3.1 不同产地芜青芽苗中Gaba含量差异 产地对植物的发育、形态及理化性质都有不同程度的影

响,涉及到植物生长的方方面面.表 2 中,1#芽苗萌发自西藏曲水的芜青种子,它比 2# 西藏仁布的芜青芽苗酶活高出约 1.4 倍,而四川西昌的 3# 芽苗酶活最低,从 Gaba 含量来看,3# 芽苗最多,1# 芽苗最少.图 3(a)可看出,图左 1# 芽苗反应前的 Gaba 量本是最底的,但图右中 1# 反应后 Gaba 含量差值( $\Delta$ Gaba)最大,表明它的 Gad 酶活最好;3# 芽苗中反应前 Gaba 含量最高,而 $\Delta$ Gaba 含量较低,Gad 酶活较低.对不同产地的芜青来说,芽苗中 Gaba 含量最高的不一定酶活高,二者无线性关系.

表 2 不同产地芜青芽苗中 Gad 酶活力测定

Tab. 2 Gad enzyme activity in *Brassica rapa* L. ssp *rapa* seeding in different areas

不同产地	酶活力(U)	酶单位(U/wt)
1# 西藏曲水	13.00	86.73
2# 西藏仁布	9.31	62.04
3# 四川西昌	5.72	38.13



3.3.2 不同产地成熟期芜青块根中 Gaba 含量差异 不同产地芜青的不同组织中,Gaba 含量和酶活存在差异.表 3 中,1# 西藏曲水块根的酶活最低,2# 仁布块根最高,约为 1# 的 30 倍;Gaba 含量最高的是 3# 昌都块根,约为 1# 块根的 2 倍.该项实验中,1# 西藏曲水块根的酶活和 Gaba 含量均为最低(图 3(b)),但 1# 芽苗中酶活却是最高.同一植物中的不同部位酶活及性质也有差异.1# 曲水芜青的芽苗酶活力好,易获取,可作为后继科研以及应用的良好选择.

表 3 不同产地芜青块根中 Gad 酶活力测定

Tab. 3 Gad enzyme activity in *Brassica rapa* L. ssp *rapa* roots in different areas

不同产地	酶活力(U)	酶单位(U/wt)
1# 西藏曲水	0.33	2.18
2# 西藏仁布	9.03	60.18
3# 西藏昌都	4.13	27.57

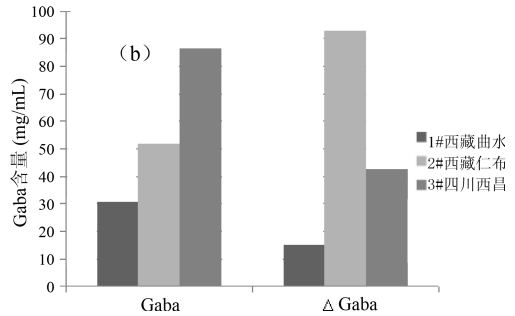


图 3 不同产地芜青中 Gaba 含量:a. 芽苗;b. 块根

Fig. 3 Gaba contents in *Brassica rapa* L. ssp *rapa* seeding in different areas

3.3.3 抽薹期芜青各组织部分的酶活力差异 芜青是二年生草本植物,在抽薹时期各种氨基酸转化及新陈代谢速率都很快.将这一时期的芜青各部分组织进行比较,发现地上部分比地下部分的 Gad 酶活高很多,地上部分的顶端分生组织中的酶活最强,而地区差异不大(图 4).

3.4 光照影响

正常光照条件下的芽苗中 Gaba 含量和酶活都较避光条件下更高,故进行种子萌发时应给以充分的光照,有利于更多更快的转化 L-谷氨酸生成 Gaba.谷氨酸一方面进行脱羧反应生成  $\gamma$ -氨基丁酸,另一方面通过转氨作用形成谷氨酰胺(Gln),光照对这两条途径都有一定影响,完全避光的条件下,谷氨酰胺(Gln)的含量要高于正常光照条件下培育的芽苗,而 Gaba 的含量则是有所下降,二者之间存在一定此消彼长的反比例关系(表 4).

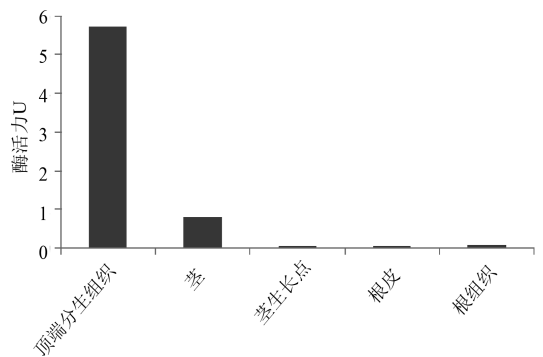


图 4 各部分组织酶活力比较

Fig. 4 Gad enzyme activity in bolting stage at different parts

表 4 光照影响芽苗中 Gad 酶活力

Tab. 4 The impact of sunshine when germination

条件	酶活力(U)	酶单位(U/wt)
正常光照	2.65	17.66
完全避光	0.65	4.36

### 3.5 超高效液相色谱法稳定性

为检验用于测定样品中 Gaba 含量的超高效液相色谱法(ACQUITY UPLC H-class system)是否稳定, 将未衍生的样品及标准品进行对比, 未衍生的代谢物对色谱图没有影响且标准品出峰时间稳定, 波形良好

(见图 5). 在实验测得最适 Gad 催化条件下能够得出 Gaba 的最大转化率, 且样品中非氨基酸类的其他物质对出峰和波形没有影响(见图 6). 对芫青不同组织中 Gaba 含量测定的结果能够直观的反映在一张图中, 顶端分生组织的 Gaba 含量最高(见图 7).

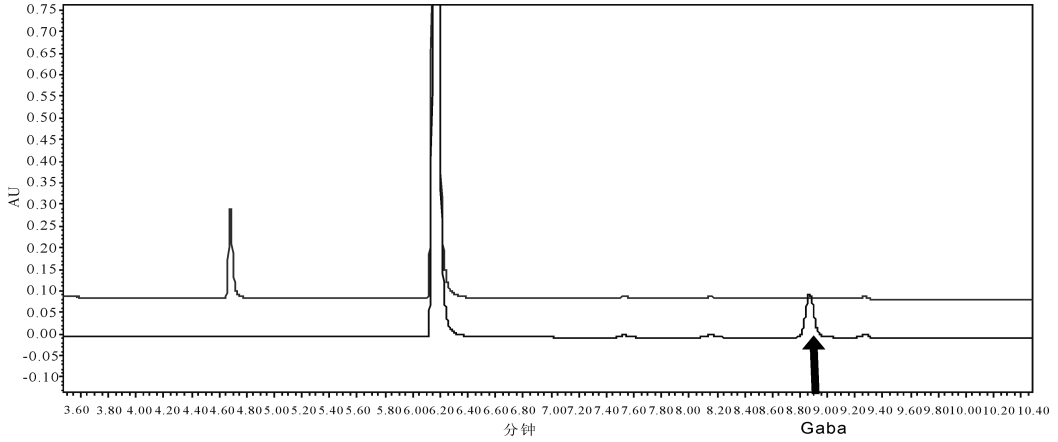


图 5 Gaba 标准品对比图  
Fig. 5 Gaba standards

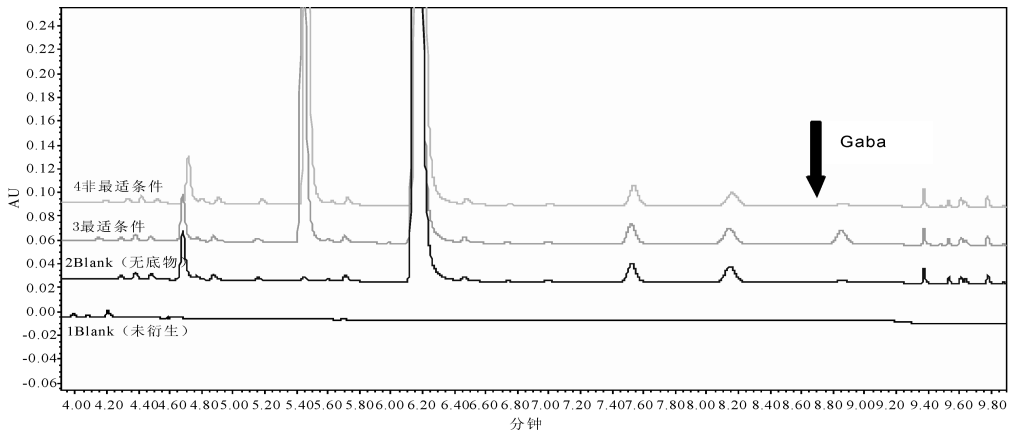


图 6 UPLC 方法稳定性  
由下至上依次为 1. 未衍生的空白样品 2. 未添加底物的衍生空白样 3. 最适条件下反应的产物 4. 非最适条件下反应的产物  
Fig. 6 Stable UPLC method

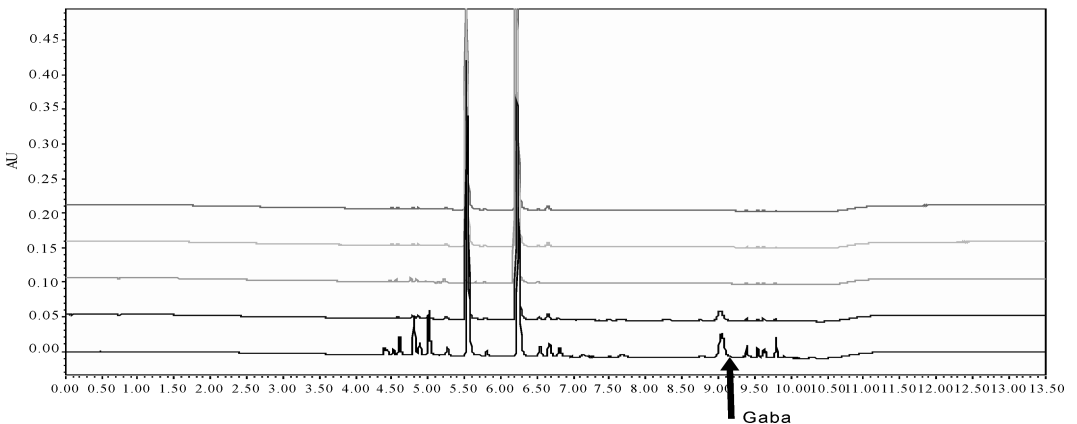


图 7 抽薹期芫青各组织部分  $\Delta$ Gaba 含量对比  
由下至上依次为 1. 顶端分生组织 2. 茎 3. 茎生长点 4. 根皮 5. 根组织  
Fig. 7  $\Delta$ Gaba content in bolting stage at different parts

## 4 讨 论

近年,对芜青中有效活性成分的研究逐渐增多,大都集中在黄酮、多糖、硫代葡萄糖苷及脂肪酸的提取及活性测定<sup>[12]</sup>,芜青中氨基酸还未见有相关大量报道;Gaba 作为一种神经递质<sup>[13]</sup>因其在调节神经元兴奋度上有着重要作用而逐渐成为科学研究的热点,而相关医药产品在临床上也得到广泛应用.如何更高效获取安全的 Gaba 已成为研究重点方向,尤其是利用高 Gaba 含量的植物,提高转化效率获取更多产物是可行的研究开发方向.

目前对植物中 Gaba 研究主要集中在水稻上,报道指出大米在 35℃ 水中浸泡萌发后, Gad 酶活力提高约 7 倍<sup>[14]</sup>,芜青种子在常温下萌发后芽苗中的酶活力比种子中提高约 5 倍.水稻作为粮食作物,将其用作工业生产原料有一定局限性,芜青作为常见经济作物在浙江、江苏、云南、西藏等地种植面积广、环境适应性强、产量高,一年四季均有出产<sup>[15]</sup>.该论文选取十字花科芸薹属芜青种芜青亚种芜青,针对目前芜青中有效活性成分研究主要集中于黄酮、多糖、硫代葡萄糖苷及脂肪酸的提取及活性测定,但其中氨基酸衍生物类活性物质 Gaba 鲜有报道的实际情况,对芜青中谷氨酸脱羧酶(Gad)粗酶的提取和优化、酶活力最适反应条件、时空分布差异及光照影响等进行对比分析,同时利用超高效液相色谱法技术(UPLC)分析测定反应产物  $\gamma$ -氨基丁酸(Gaba)的含量,获得了一系列有重要意义的实验结果,发现芜青芽苗作为植物源 Gaba 供体有良好的工业应用前景.该研究的相关结果可以作为一种简单有效且经济的方式,给工业化生产植物源 Gaba 提供了可行性方案.

### 参考文献:

[1] 张德纯. 蔬菜史话·芜青[J]. 中国蔬菜, 2012, 17: 43.  
 [2] 孙莲, 马彦玲, 巴图尔, 等. 芜青子化学成分的研究[J]. 华西药理学杂志, 2012, 27: 54.  
 [3] Fu R, Zhang Y T, Guo Y R, *et al.* Hepatoprotection using *Brassica rapa* var. *rapa* L. seeds and its bioactive compound, sinapine thiocyanate, for

CCl<sub>4</sub>-induced liver injury[J]. J Funct Foods, 2016, 22: 73.  
 [4] 陈放, 彭彤, 郭亦然, 等. 从植物芜青中提取纯化分离制备一种天然吡咯衍生物的方法: 中国, C07D207/333 [P]. 2013.  
 [5] 周小理, 赵琳.  $\gamma$ -氨基丁酸的生理功能及在食品中应用的研究进展[J]. 食品工业, 2011, 10: 58.  
 [6] Ma D, Lu P L, Shi Y G, *et al.* Structure and mechanism of a glutamate - GABA antiporter[J]. Nature: letter, 2012, 483: 632.  
 [7] Choi J W, Yim S S, Lee S H, *et al.* Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expressing glutamate decarboxylase active in expanded pH range[J]. Microb Cell Fact, 2015, 14: 21.  
 [8] Zhao M, Ma Y, Dai L L, *et al.* A High-Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of 21 Free Amino Acid in Tea [J]. Food Anal Method, 2013, 6: 69.  
 [9] 岑咏一, 刘震, 李旭峰, 等. UGT75B1、UGT71B6、UGT71C5 酶活性及酶反应动力学分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2014, 53: 169.  
 [10] Trobacher C P, Zarei A, Liu J Y, *et al.* Calmodulin-dependent and calmodulin-independent glutamate decarboxylases in apple fruit[J]. BMC Plant Biol, 2013, 13: 144.  
 [11] Shin S M, Kim H, Joo Y H, *et al.* Characterization of Glutamate Decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and Its CTerminal Function for the pH Dependence of Activity[J]. J Agr Food Chem, 2014, 62: 12186.  
 [12] 李雅双, 连路宁, 阿西娜, 等. 芜青化学成分及生物活性的研究进展[J]. 时珍国医药, 2013, 24, 9: 2247.  
 [13] Philip S, Kim K H, David D. GABA modulating bacteria - can our bacteria make us depressed [R]. Boston, Innovation and Scholarship Expo, 2015.  
 [14] Khwanchai P D, Chinprahast N N, Pichyangkura R, *et al.* Gamma-Aminobutyric Acid and Glutamic Acid Contents, and the GAD Activity in Germinated Brown Rice (*Oryza sativa* L.): Effect of Rice Cultivars[J]. Food Sci Biotechnol, 2014: 23: 373.  
 [15] 万文韬. 芜青[J]. 食品与生活, 2005, 5: 46.