

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201510003

武鑫, 李萌萌, 邓骋, 等. *CaXMT* 和 *TCS1* 突变体基因串联共表达及体外酶活检测分析 [J]. 广西植物, 2016, 36(12):1505-1510

WU X, LI MM, DENG C, et al. Tandem coexpression of *CaXMT* and mutants of *TCS1* and analysis of enzyme activity *in vitro* [J]. Guihaia, 2016, 36(12): 1505-1510

CaXMT 和 *TCS1* 突变体基因串联共表达及体外酶活检测分析

武鑫, 李萌萌, 邓骋, 邓威威, 张正竹*

(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: 咖啡碱和可可碱是茶叶生物碱的主要组分,且咖啡碱是茶叶重要的滋味物质,随着咖啡碱在食品和药物领域的应用愈发广泛,咖啡碱的生物合成成为新的研究热点。目前市场上的咖啡碱主要靠化学合成,为了探索其生物合成途径,该研究将咖啡黄嘌呤核苷甲基转移酶(*coffee xanthosine methyltransferase*, *CaXMT*)基因和茶树咖啡碱合成酶(*tea caffeine synthase*, *TCS1*)基因的4个突变体分别串联至同一大肠杆菌表达载体 *pMAL-c5X*,诱导融合蛋白共表达,并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。结果表明:目的蛋白成功表达后,应用超声破碎法制备含有目的蛋白的粗酶液,添加底物黄嘌呤核苷(*xanthosine*, *XR*)和甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸(*S-adenosyl-L-methionine*, *SAM*)进行体外酶促反应,将反应产物进行高效液相色谱检测。检测结果显示,*pMAL-CaXMT-TM2/3/4* 的体外酶促反应产物仅有可可碱生成,均未见咖啡碱生成。该研究结果为构建生物合成咖啡碱和可可碱的串联共表达载体奠定了基础,也为进一步研究生物合成咖啡碱和可可碱提供了新思路。

关键词: 咖啡碱, 串联共表达, 体外活性

中图分类号: Q571.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)12-1505-06

Tandem coexpression of *CaXMT* and mutants of *TCS1* and analysis of enzyme activity *in vitro*

WU Xin, LI Meng-Meng, DENG Cheng, DENG Wei-Wei, ZHANG Zheng-Zhu*

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

Abstract: Caffeine and theobromine as the major component of alkaloids in tea, while caffeine is the important taste compound. As the application of caffeine increased extensively in the fields of food and medicine, caffeine biosynthesis becomes a new hotspot. Nowadays, exploring the method of caffeine biosynthesis is of great significance, when caffeine synthesis mainly relies on chemical synthesis on the market. This research concatenated coffee xanthosine methyltransferase gene (*CaXMT*) and four mutants of tea caffeine synthase gene (*TCS1*) respectively in the same expression vector *pMAL-c5X*, then induced coexpression of the fusion protein, which was analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis, and chromatography were added into the crude enzyme solution by sonication methionine. At last, *in vitro* enzymatic reaction products were detected by high performance liquid. The results showed that only theobromine generated in the products of *pMAL-CaXMT-TM2/3/4* without caffeine. This research provides the information for establishing tandem gene coexpression vector which was used for the biosynthesis of caffeine and theobromine and new ideas to study on caffeine biosynthesis.

Key words: caffeine, tandem gene coexpression, *in vitro* activity

收稿日期: 2015-10-07 修回日期: 2015-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(31170649, 31570692) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31170649, 31570692)].

作者简介: 武鑫(1989-),女,陕西潼关人,硕士研究生,主要从事茶叶生物化学与天然产物研发方面的研究,(E-mail)348778774@qq.com.

*通讯作者: 张正竹,教授,博士生导师,主要从事茶叶化学与加工、食品风味化学领域的研究,(E-mail)zzz@ahau.edu.cn.

咖啡碱(1,3,7-三甲基黄嘌呤)和可可碱(3,7-二甲基黄嘌呤)一同被归类为嘌呤生物碱,存在于茶、咖啡以及大部分软饮料中(Ashihara et al, 2008)。咖啡碱不但能刺激神经系统和呼吸系统,增强无氧运动时的耐力,而且具有利尿、抗癌的作用(吴命燕等,2010;Panayiotis et al,2013)。咖啡碱的制备方法主要分为人工合成、生物合成、天然提取,其中人工合成是咖啡碱的主要来源,但人工合成具有安全性小、污染环境等问题(李海霞等,2011)。随着咖啡碱广泛应用于食品和医药行业,其生物合成由于低污染、低残留等优点而受到关注。因此探索其生物合成方法具有重要的现实意义。

茶树中的咖啡碱主要分布在新梢部位,其中嫩芽叶中含量最多,而咖啡碱合成的前体物质可可碱仅存在于幼嫩叶片中(宛晓春等,2015;Ashihara & Crozier,1999)。咖啡碱的主要生物合成途径是黄嘌呤核苷(XR)→7-甲基黄嘌呤核苷(7-MXR)→7-甲基黄嘌呤(7-MX)→可可碱(Tb)→咖啡碱(Cf),该反应途径由四步组成,包括三步甲基化反应和一步脱核苷反应(Koshiishia et al,2001;Kato et al,1996)。生物合成途径中催化前两步的酶是咖啡黄嘌呤核苷甲基转移酶,催化后两步反应的酶是茶树咖啡碱合成酶(Ashihara et al,1996;Waldhauser et al,1997;Kato et al,1999)。基于 *TCS1* 突变体单独表达基础上,将4个突变体 *TMX* 分别与 *CaXMT* 基因串联在表达载体 pMAL-c5X 上,通过 SDS-PAGE 检测验证了串联基因蛋白的共表达。诱导融合蛋白成功表达后,进一步通过体外酶促反应来验证串联表达载体的活性,并采用 HPLC 进行检测酶促反应产物,试图通过添加底物黄嘌呤核苷来直接生成咖啡碱。但是结果未见有咖啡碱生成,仅 pMAL-CaXMT-TM2/3/4 的 HPLC 检测结果显示有可可碱生成。本研究尝试以黄嘌呤核苷为反应底物,通过串联共表达系统中 *CaXMT* 和 *TMX* 的共同作用,进行酶促反应生物合成咖啡碱和可可碱,将对探索生物合成咖啡碱和可可碱起到一定作用。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

菌株 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 和 *E. coli* transT1 购自北京全式金公司;菌株 pMAL-CaXMT-TCS1 和 pMAL-TMX 由安徽农业大学茶树生物学与资源利

用国家重点实验室提供;质粒 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 rTaq 酶、PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、T4 DNA Ligase Polymerase 购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶 *Sal* I、*Sbf* I、*Not* I 购自 Fermentas 公司,DNA Marker、Protein Marker II 购自北京全式金公司,质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,氨苄青霉素、氯霉素、IPTG 购自上海生工生物工程有限公司。液相色谱所用试剂均为色谱级,其他试剂均为国产分析纯。

1.2.2 主要仪器 高效液相色谱仪、粒径 5 μm 的 ODS 250 mm × 4.6 mm C18 反相柱,美国 Waters 公司;电子分析天平, METTLER TOLEDO 公司;PCR 仪、凝胶成像系统、Power PAC 3000 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;超声波细胞破碎仪,宁波新芝仪器研究所;高速冷冻离心机,Eppendorf 公司;电热恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司。高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂。

1.3 方法

1.3.1 *TCS1* 突变体 *TMX* 基因的克隆与测序 突变体 *TMX* 突变位置与 *TCS1* 相比,分别为 TM1 673CGT→CAT;TM2 949GTT→ATG, TM3 811TTT→TGG;TM4 814GCA→CCA(Jin et al,2014)。据 GenBank 报道的 *TCS1* 基因 ORF 序列,设计一对扩增引物,在上游引物 5'端引入 *Sal* I 酶切位点,下游引物 5'端引入 *Sbf* I 酶切位点。上游引物 TM-F 为 5'-AT-AGTCCGACATGGACCTAGCTACTGCGG-3',下游引物 TM-R 为 5'-CTCCCCTGCAGGCTATCCATCAATCTTG-G-3',分别以提取的 *TMX* 质粒为模板,按照 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 说明书进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶检测,用 Axygen 公司胶回收试剂盒纯化目的基因片段。将目的基因连接到克隆载体 pMD19-T 上,转化入感受态细胞 transT1 中经菌落 PCR 检测,挑取阳性菌落送 Invitrogen 公司测序。

1.3.2 pMAL-CaXMT-TMX 表达载体的构建 测序正确的单菌落和 pMAL-CaXMT-TCS1 进行培养,提取质粒 pMD19-TM1/2/3/4 和 pMAL-CaXMT-TCS1,用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Sbf* I 进行双酶切,回收目的基因片段 *TMX* 和表达载体片段 pMAL-CaXMT。使用 T4 DNA Ligase Polymerase 对两个回收片段进行过夜连接,并转入 *E. coli* transT1 感受态细胞,构建

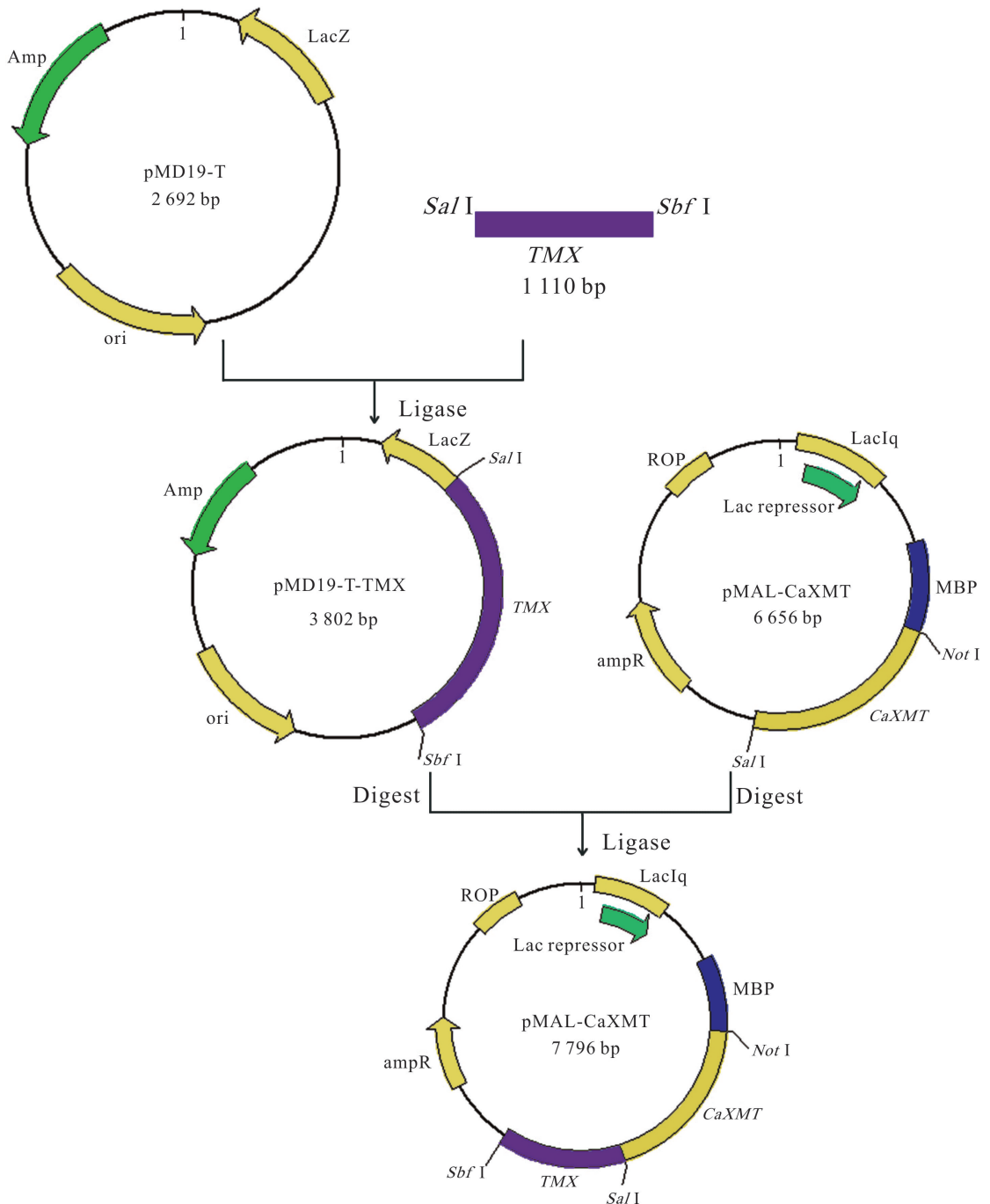


图 1 pMAL-CaXMT-TMX 串联表达载体构建流程图

Fig. 1 Construction of tandem gene coexpression vector

重组表达质粒,通过含氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选,挑取阳性菌落送 Invitrogen 公司测序。使用 DNASTAR 软件对结果进行序列对比分析。

1.3.3 串联融合蛋白的诱导表达 表达过程参考金璐(2012),操作过程为提取重组表达载体质粒,转入表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 中,涂布到含

氨苄青霉素($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和氯霉素($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 LB 平板上。筛选阳性菌落于 3 mL LB 培养基中, 37°C 振荡过夜培养。取 800 μL 过夜菌液接种于 40 mL LB 培养基,继续 37°C 振荡培养,至检测 OD 值为 0.6~0.8,取 1 mL 菌液作为诱前对照,然后加入终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG, 16°C 下振荡培

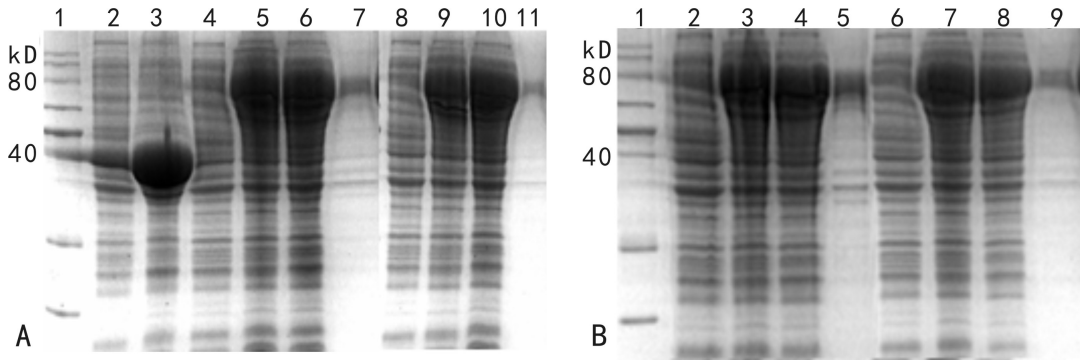


图 2 pMAL-CaXMT-TM1/2/3/4 诱导蛋白 SDS-PAGE 电泳图 A. pMAL-CaXMT-TM1/2 诱导蛋白 SDS-PAGE 电泳图 [1. 蛋白标准分子量 (120 kD); 2, 4, 8. pMAL-c5X、pMAL-CaXMT-TM1、pMAL-CaXMT-TM2 诱导前总蛋白; 3, 5, 9. MBP、pMAL-CaXMT-TM1、pMAL-CaXMT-TM2 诱导后总蛋白; 6, 10. pMAL-CaXMT-TM1、pMAL-CaXMT-TM2 诱导后可溶性蛋白; 7, 11. pMAL-CaXMT-TM1、pMAL-CaXMT-TM2 诱导后包涵体蛋白]。B. pMAL-CaXMT-TM3/4 诱导蛋白 SDS-PAGE 电泳图 [1. 蛋白标准分子量 (120 kD); 2, 6. pMAL-CaXMT-TM3、pMAL-CaXMT-TM4 诱导前总蛋白; 3, 7. pMAL-CaXMT-TM3、pMAL-CaXMT-TM4 诱导后总蛋白; 4, 8. pMAL-CaXMT-TM3、pMAL-CaXMT-TM4 诱导后可溶性蛋白; 5, 9. pMAL-CaXMT-TM3、pMAL-CaXMT-TM4 诱导后包涵体蛋白]。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the induced pMAL-CaXMT-TM1/2/3/4 expression A. SDS-PAGE analysis of the induced pMAL-CaXMT-TM1/2 [1. Protein Marker II 120 kD; 2, 4, 8. Total protein of pMAL-c5X, pMAL-CaXMT-TM1, pMAL-CaXMT-TM2 uninduced; 3, 5, 9. Total protein of MBP, pMAL-CaXMT-TM1, pMAL-CaXMT-TM2 induced; 6, 10. pMAL-CaXMT-TM1, pMAL-CaXMT-TM2 supernatant of lysate after sonication; 7, 11. pMAL-CaXMT-TM1, pMAL-CaXMT-TM2 precipitation of lysate after sonication]. B. SDS-PAGE analysis of the induced pMAL-CaXMT-TM3/4 expression [1. Protein Marker II (120 kD); 2, 6. Total protein of pMAL-CaXMT-TM3, pMAL-CaXMT-TM4 uninduced; 3, 7. Total protein of pMAL-CaXMT-TM3, pMAL-CaXMT-TM4 induced; 4, 8. pMAL-CaXMT-TM3, pMAL-CaXMT-TM4 supernatant of lysate after sonication; 5, 9. pMAL-CaXMT-TM3, pMAL-CaXMT-TM4 precipitation of lysate after sonication].

养 20 h。诱导结束后,取菌液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 20 min,制样进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3.4 体外酶促反应活性的检测 诱导结束经冷冻离心得菌体,加 4 mL Lysis Buffer(现加 DTT,终浓度为 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 重悬菌体。冰浴条件下超声破碎后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,得上清即为粗酶液。1.5 mL 酶反应体系: $156\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄嘌呤核苷, $749\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ S-腺苷甲硫氨酸, $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,加粗酶液补至 1.5 mL。反应在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行,分别于 2、4、8 h 取反应液 500 μL ,通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 水相滤膜,进行 HPLC 检测。以 pMAL-c5X 空载体相同处理做对照。

高效液相色谱检测条件:流速 $1\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$;流动相中,A 相为 0.2% 乙酸,B 相为纯乙腈;线性变化范围为 0~4 min,A 相 95%,B 相 5%;4~10 min,A 相 40%,B 相 60%;10~13 min,A 相 95%,B 相 5%;13~30 min,A 相 95%,B 相 5%。紫外检测器吸收波长为 274 nm。

2 结果与分析

2.1 TM1/2/3/4 基因的克隆

以质粒为模板,用引物 TM-F 和 TM-R 对 TMX

基因进行 PCR 扩增, 1.2% 的琼脂糖凝胶检测。分子量在 1 000 bp 偏上出现一条较为明亮的条带,为目的产物条带,其大小与 TCS1 基因 ORF 的长度 1 110 bp 相符。PCR 产物经胶回收、连接、转化、测序,测序结果同原 TMX 相同。

2.2 pMAL-CaXMT-TM1/2/3/4 串联表达载体的构建

提取 PMD19-TM1/2/3/4 质粒和 pMAL-CaXMT-TCS1 质粒,分别用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Sbf* I 进行双酶切,并对目的基因片段 TMX 和表达载体片段 pMAL-CaXMT 进行胶回收。其中分子量在 1 000 bp 偏上的条带为 TMX 条带,分子量在 2 000 bp 以上的条带为表达载体片段条带。

将目的基因片段连接到表达载体,得重组质粒 pMAL-CaXMT-TM1/2/3/4(图 1),并转化至 transT1 感受态细胞,菌落 PCR 检测,筛选阳性菌落送公司测序。结果通过软件分析,正确即构成 pMAL-CaXMT-TM1/2/3/4 串联表达载体,可用于之后融合蛋白的诱导表达。

2.3 串联表达载体融合蛋白的诱导表达

重组质粒 pMAL-CaXMT-TM1/2/3/4 转化至 BL21(DE3)pLysS,经初步培养和扩大培养,利用

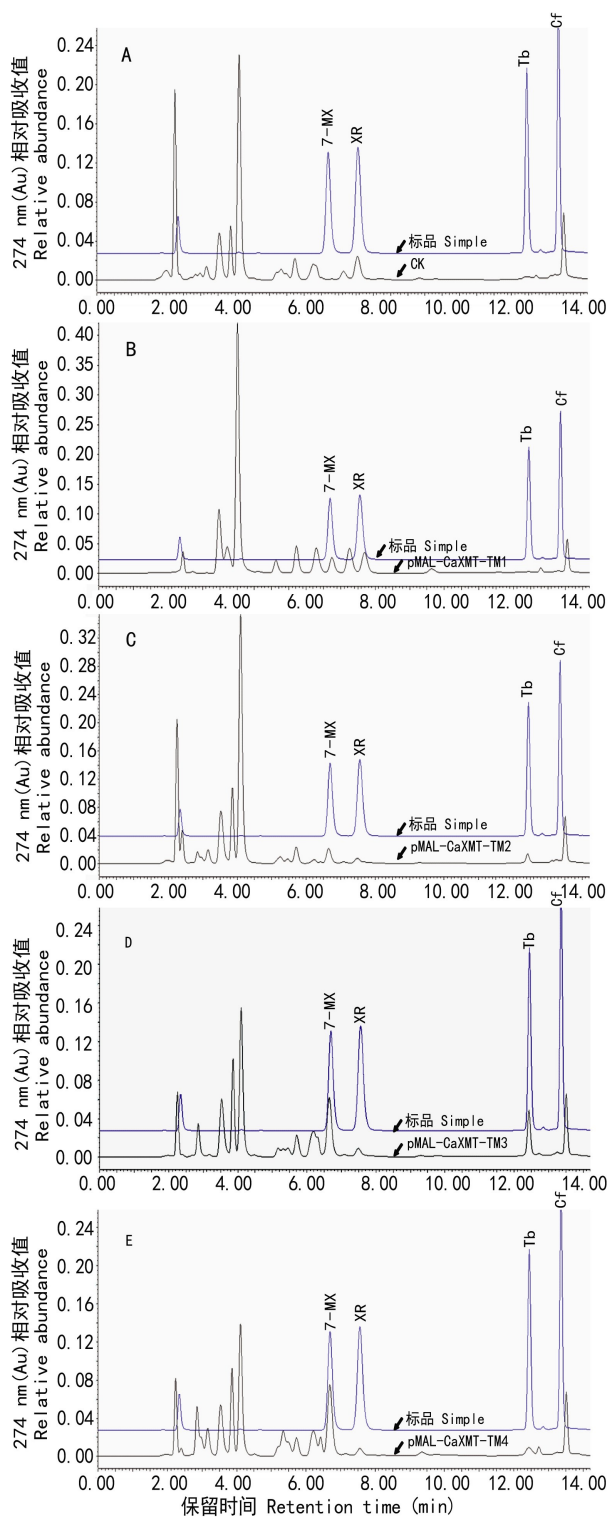


图3 pMAL-CaXMT-TMX 体外酶活性的 HPLC 分析

A. 对照组; B. pMAL-CaXMT-TM1; C. pMAL-CaXMT-TM2;
D. pMAL-CaXMT-TM3; E. pMAL-CaXMT-TM4。

Fig. 3 *In vitro* activity analysis of pMAL-CaXMT-TMX by HPLC A. Control group; B. pMAL-CaXMT-TM1;

C. pMAL-CaXMT-TM2; D. pMAL-CaXMT-TM3; E. pMAL-CaXMT-TM4.

IPTG 诱导目的蛋白和载体标签子 MBP 的融合表达,16 °C 时可使诱导后融合蛋白大量表达在上清中。融合蛋白的 SDS-PAGE 检测(图 2)显示在 81 kD 左右位置有明显的外源蛋白条带,减去诱导后蛋白大小为 40 kD 的表达载体 pMAL-c5X 标签子 MBP,可推算出实际蛋白大小为 41 kD,与已知 *CaXMT* 和 *TMX* 的蛋白理论值大小 41.8 kD 和 41.3 kD 相符。由于两个串联基因蛋白大小相近,两个目的基因蛋白条带叠加在一起,表现出一条较粗的条带。

2.4 体外酶活性的 HPLC 检测

CaXMT 基因和 *TMX* 基因串联表达的体外酶促反应产物经 HPLC 检测,结果见图 3。对照组 CK 既无 7-甲基黄嘌呤生成,也无咖啡碱生成(图 3:A)。与对照组相比,样品组添加的 XR 均减少。样品组 pMAL-CaXMT-TM1 体外酶促反应产物仅有 7-甲基黄嘌呤生成(图 3:B),由图 3:C、D、E 可以看出样品组 pMAL-CaXMT-TM2/3/4 体外酶促反应产物均有可可碱(Tb)生成,但是产物未见咖啡碱(Cf)生成。

3 讨论

咖啡碱合成酶突变体 *TMX* 的单独表达中,体外活性检测结果显示,TM1 只能催化 7-甲基黄嘌呤生成可可碱,TM2/3/4 均能催化 7-甲基黄嘌呤生成可可碱和咖啡碱,但是咖啡碱含量较低(李萌萌等, 2014)。本研究构建的 pMAL-CaXMT-TMX 大肠杆菌串联表达系统,成功诱导双基因融合蛋白表达后, HPLC 检测活性结果显示,体外酶促反应产物均无咖啡碱生成,但 pMAL-CaXMT-TM2/3/4 体外酶促反应产物均有可可碱生成。这与预期的结果有一定偏差,可能存在以下原因:一是两个基因的表达不均衡引起,即两个基因串联在同一表达载体中,前一个基因被选择性过表达,后一个基因表达偏低造成的(Lee & khosla, 2007)。Lee & khosla (2007) 成功实现了多个基因在大肠杆菌中的共表达,并且通过添加底物和诱导剂进行低温诱导后检测到目的产物,但是产量偏低。刘新平等(1996)构建的双顺反子表达载体,通过减小第一顺反子基因的大小来增加目的蛋白的表达量。二是两个基因串联共用一个启动子,无法实现基因表达的分别调控。何彰华等(2011)构建的多基因串联共表达载体,每个基因带

有各自的启动子,利用同尾酶组合实现四个基因串联共表达,且可以通过改变各基因启动子的强弱,进而调节各基因的表达量。

共表达系统包括多质粒共转化系统和多顺反子系统(赵志虎等,2000),该研究中双基因串联共表达系统属于多顺反子系统,是将两个基因通过一个共用酶切位点先后串联到 pMAL-c5X 表达载体上。该系统中两个基因有各自的翻译起始及终止信号,能独立翻译,实现了双基因在大肠杆菌中融合蛋白的可溶性表达,避免了多质粒共转化系统中需要添加多种抗生素来筛选标记。

目前,有关研究已经明确了咖啡碱在植物中的生物合成途径,但是鲜有关于生物合成咖啡碱应用到实际生产的报道。本研究初步探索了通过添加底物 XR 和甲基供体 SAM,应用大肠杆菌双基因共表达系统来生物合成咖啡碱和可可碱,但是并未达到预期结果,反应产物只检测到可可碱。因此,要达到生物合成咖啡碱的目的,还需要做很多后续研究。接下来可以从改造现有的表达载体,实现多基因共表达,并且促进各基因均衡表达等进行深入研究。

参考文献:

ASHIHARA H, SANO H, CROZIER A, 2008. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering [J]. *Phytochemistry*, 69:841-856.

ASHIHARA H, CROZIER A, 1999. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants [J]. *Adv Bot Res*, 30: 117-205.

ASHIHARA H, MONTERIO AM, GILLIES FM, et al, 1996. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee [J]. *Plant Physiol*, 111: 747-753.

HE ZH, WANG Y, ZHAO J, et al, 2011. Construction of a vector suitable for the tandem coexpression of multiple genes by a single plasmid [J]. *Chin Biotechnol*, 31(1): 40-45. [何彰华, 王洋, 赵珺, 等, 2011. 一种多基因串联共表达载体的构建 [J]. *中国生物工程杂志*, 31(1): 40-45.]

JIN L, 2012. Research on caffeine biosynthesis and molecular regulation of tea [D]. Hefei: Anhui Agricultural University: 20-22. [金璐, 2012. 茶树咖啡碱生物合成途径研究及其分子调控 [D]. 合肥: 安徽农业大学硕士毕业论文: 20-22.]

KOSHIISHIA C, KATO A, YAMAB S, et al, 2001. A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves; utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle [J]. *FEBS Lett*, 499: 50-54.

KATO M, KANEHARA T, SHIMIZU H, et al, 1996. Caffeine biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis*: *in vitro* studies on N-methyltransferase activity involved in the conversion of xanthosine to caffeine [J]. *Physiol Plant*, 98: 629-636.

KATO M, MIZUNO K, FUJIMURA T, et al, 1999. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves [J]. *Plant Physiol*, 120(2): 579-586.

LU JIN, BHUIYA MW, MENG M, et al, 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for caffeine and theobromine production [J]. *PLoS ONE*, 9(8): 1-11.

LI MM, DENG WW, JIN L, et al, 2014. Site-directed mutagenesis for caffeine synthase gene (*tcs1*) of *Camellia sinensis* and expression *in vitro* [C]//SI ZM. The 16th annual meeting of China association for science and technology—proceedings of the 12th forum of young tea science scientists. Kunming: China Association for Science and Technology. [李萌萌, 邓威威, 金璐, 等, 2014. 茶树咖啡碱合成酶基因 TCS1 的定点突变及体外表达分析] [C]//司智敏. 第十六届中国科协年会——分12 茶学青年科学家论坛论文集. 昆明: 中国科学技术协会.]

LEE H Y, KHOSLA C, 2007. Bioassay-guided evolution of glycosylated macrolide antibiotic in *Escherichia coli* [J]. *PLoS Biol*, 5(2): 243-250.

LIU XP, CHEN SM, CHEN NC, et al, 1996. Construction and application of a dicistronic expression vector [J]. *Prog Biochem Biophys*, 23(2): 156-159. [刘新平, 陈苏民, 陈南春, 等, 1996. 一种双顺反子表达载体的构建及应用的研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 23(2): 156-159.]

LI HX, CHEN R, ZHOU D, et al, 2011. Research progress on synthesis and pharmacological effects of caffeine [J]. *W Chin J Pharm Sci*, 43(3): 243-253. [李海霞, 陈榕, 周丹, 等, 2011. 咖啡因的合成及其药理作用的研究进展 [J]. *华西药理学杂志*, 26(2): 182-187.]

PLATRITIS P, ANDREOU E, PAPANDREOU D, 2013. Caffeine effect on exercise performance and disease issues: an updated mini review [J]. *Nutri Food Sci*, 43(3): 243-253.

WALDHAUSER SSW, GILLIES FM, CROZIER A, et al, 1997. Separation of the N-7 methyltransferase, the key enzyme in caffeine biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 45(7): 1407-1414.

WAN XC, XIA T, ZHANG ZZ, et al, 2015. Secondary metabolism of tea plant [M]. Beijing: Science Press: 65-67. [宛晓春, 夏涛, 张正竹, 等, 2015. 茶树次生代谢 [M]. 北京: 科学出版社: 65-67.]

WU MY, FAN FY, LIANG YR, et al, 2010. The physiological functions of caffeine and their related mechanisms [J]. *Tea Sci*, 30(4): 235-242. [吴命燕, 范方媛, 梁月荣, 等, 2010. 咖啡碱的生理功能及其作用机制 [J]. *茶叶科学*, 30(4): 235-242.]

ZHAO ZH, ZHANG YS, LIU CX, et al, 2000. New strategy for soluble expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* [J]. *Lett Biotechnol*, 11(3): 164. [赵志虎, 张用书, 刘传暄, 等, 2000. 外源蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的新策略 [J]. *生物技术通讯*, 11(3): 164.]