

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

茶树查尔酮异构酶、黄酮醇合成酶和无色
花色素还原酶等基因的克隆与表达分析

**Molecular Cloning and Expression Analysis of Chalcone
Isomerase, Flavonol Synthase and Leucoanthocyanidin Reducase
Genes of Tea Plant (*Camellia sinensis*)**

硕 士 研 究 生：马春雷

指 导 教 师：陈 亮

申请学位类别：硕 士

专 业：茶 学

研 究 方 向：分子生物学

培 养 单 位：茶叶研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

**Molecular Cloning and Expression Analysis of Chalcone
Isomerase, Flavonol Synthase and Leucoanthocyanin Reducase
Genes of Tea Plant (*Camellia sinensis*)**

Ms. Candidate: MA Chun-lei

Advisor: CHEN Liang

Major: Tea Science

Specialty: Molecular Biology

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June, 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

中 国 农 业 科 学 院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		茶树查尔酮异构酶、黄酮醇合成酶和无色花色素还原酶基因的克隆与表达分析				
论文作者		马春雷	专 业	茶 学	研究方向	分子生物学
指导教师		陈亮		培养单位（研究所）		茶叶研究所
姓名		职称	硕（博） 导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	张志芳	研究员	博导	中国农业科学院生物技术研究所	分子生物学	/
	梁月荣	教授	博导	浙江大学农业与生物技术学院	茶树分子生物学	
答 辩 主 席	朱 诚	教授	博导	浙江大学生命科学学院	植物分子生理学	
答 辩 委 员	梁月荣	教授	博导	浙江大学农业与生物技术学院	茶树分子生物学	
	成 浩	研究员	博导	中国农业科学院茶叶研究所	茶 学	
	鲁成银	研究员	硕导	中国农业科学院茶叶研究所	茶 学	
	江和源	副研究员	硕导	中国农业科学院茶叶研究所	茶 学	
			硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
			硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
			硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
会议记录（秘书）			杨珍伟			
论文答辩时间地点			2007 年 6 月 15 日，杭州			

本研究受

国家 863 计划项目(2006AA10Z171)

浙江省“钱江人才”计划(2006R1042)

人事部和教育部留学回国人员科研基金
(2005-134, 2005-383)资助

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
Amp	Ampicillin	氨卞青霉素
ATP	Adenosine-5'-triphosphate	腺苷三磷酸
bp	Base pair	碱基对
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EST	Expressed sequence tags	表达序列标签
IPTG	Isopropyl thiogalactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
LB	Luria-Bertani	LB 培养基
pI	isoelectric point	等电点
OD	Optical density	光密度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	苯丙氨酸解氨酶
CHS	Chalcone synthase	查尔酮合成酶
CHI	Chalcone isomerase	查尔酮异构酶
DFR	Dihydroflavonol 4-reductase	二氢黄酮醇 4-还原酶
FLS	Flavonol synthase	黄酮醇合成酶
ANR	Anthocyanidin reductase	花色素还原酶
ANS	Anthocyanidin synthase	花青素合成酶
LAR	Leucoanthocyanin reductase	无色花色素还原酶
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	cDNA 末端快速扩增技术

摘要

茶叶是世界上最流行的无酒精健康饮品之一，含有许多有价值的次生代谢产物，如类黄酮、咖啡碱等。其中类黄酮是由类苯基丙烷等前体缩合而成一组天然化合物，它们在植物的生长、发育和防御疾病等方面有着重要作用。而且，这些化合物具有较强的抗氧化活性，对于改善人体健康的效果也非常突出。因此，分离克隆茶树类黄酮生物合成途径中相关酶的基因具有重要的理论意义和实践价值。主要研究结果如下：

1. 在原有茶树EST基础上，利用T₄RNA连接酶介导的 5'RACE技术获得了茶树查尔酮异构酶（CHI）基因的全长序列，其在GenBank的登录号是DQ904329，其序列全长 1 163 bp，其中开放阅读框长 723 bp，编码 240 个氨基酸，3'端有一个明显的多聚腺苷酸加尾信号，推测的蛋白分子量约为 26.4 kD，pI为 5.19。序列分析表明它在GenBank已登录的植物中与番茄CHI基因序列的亲缘关系比较近。
2. 根据原有 EST 设计引物，利用 RT-PCR 技术获得了茶树黄酮醇合成酶（FLS）基因全长序列，在 GenBank 登录号为 EF205150，其序列全长 1 317 bp，其中开放阅读框长 996 bp，编码 331 个氨基酸，3'端有一个明显的多聚腺苷酸加尾信号，推测的蛋白分子量约为 37.5 kD，pI 为 5.80。序列分析表明它在 GenBank 已登录的植物中与葡萄 FLS 基因序列的亲缘关系比较近。将该基因重组到表达载体 pET-32a(+)中进行原核表达，经 IPTG 诱导、SDS-PAGE 检测，结果表明茶树黄酮醇合成酶基因能在大肠杆菌 BL21 中表达，电泳检测到一条大约 61kD 的外源蛋白，与预测的融合蛋白分子量相符。
3. 利用 3'RACE 技术获得了茶树无色花色素还原酶（LAR）的 3'端，将其与原有 EST 片段拼接，得到了 LAR 基因的全长序列，其在 GenBank 的登录号为 EF205148，其序列全长 1 301 bp，其中开放阅读框长 1 029 bp，编码 342 个氨基酸，3'端有一个明显的多聚腺苷酸加尾信号，推测的蛋白分子量约为 37.5 kD，pI 为 5.81。同源性分析表明得到的LAR序列与亚洲棉(*Gossypium arboreum*)、洋莓 (*Fragaria ananassa*) 和葡萄 (*Vitis vinifera*) 的氨基酸序列相似性分别为 70%、68%、71%。十种植物的联配表明其氨基酸序列较为保守。
4. 利用半定量PCR技术检测了类黄酮的主要成分——儿茶素含量不同4个茶树品种中与类黄酮合成相关的查尔酮合成酶(CHS)、黄烷酮 3-羟化酶(F3H)、黄酮醇合成酶(FLS)、二氢黄酮醇 4-还原酶(DFR)、无色花色素还原酶(LAR)、花色素还原酶(ANR)和花青素合成酶(ANS)等 7 个基因的表达情况，结果表明 DFR 和 LAR 基因的表达量与茶树中儿茶素含量呈一定的相关性，而其它基因则与其相关性不大。

关键词 茶树 查尔酮异构酶 黄酮醇合成酶 无色花色素还原酶 基因克隆 原核表达

Abstract

Tea is the most popular non-alcoholic and healthy beverages in the world, which has plentiful secondary metabolic products, such as, flavonoids, purine, etc. Flavonoids are a diverse group of plant natural products synthesized from phenylpropanoid and acetate-derived precursors, which play important roles in plant growth, development, and defense against microorganisms and pests. These compounds often possess antioxidant activity, and the potential health benefits of tea might mostly be because of this property of flavonoids and other phytochemicals. Isolation and cloning of important functional genes of tea plant (*Camellia sinensis*), which involved in flavonoids biosynthesis pathway, has crucial significance for using biotechnology method to regulate the metabolism of tea plant. The main results are as follow:

1. The chalcone isomerase (CHI) gene, which was an important functional gene of catechins biosynthesis pathway, was cloned from tea plant by using EST sequencing and RACE (rapid amplification of cDNA ends) approaches. The full-length cDNA of chalcone isomerase gene is 1 163bp (GenBank accession No. DQ904329), containing a 723bp open reading frame (ORF) encoding a 240 amino acids protein, and its 3' untranslated region has an obvious polyadenylation signal. The deduced protein molecular weight was 26.4 kD and its theoretical isoelectric point was 5.19. Sequence analysis result showed that it is closely related with that of *Lycopersicon esculentum*.
2. The flavonol synthase (FLS) gene was cloned from tea plant by using RT-PCR approaches based on our previous EST sequencing project. The full-length cDNA of flavonol synthase gene is 1 317bp (GenBank accession No. EF205150), containing a 996bp ORF encoding a 331 amino acids protein, and its 3' untranslated region has an obvious polyadenylation signal. The deduced protein molecular weight was 37.5 kD and its theoretical isoelectric point was 5.80. Sequence analysis result showed that it is closely related with that of *Vitis vinifera*. The gene was then constructed into expression vector pET-32a (+) for over expression in prokaryotic cells. The SDS-PAGE showed that induced by IPTG, the flavonol synthase proteins was expressed in *Escherichia coli* BL21, and its molecular weight was found to be about 61 kD by checking with SDS-PAGE, nearly equal to the predicted.
3. The 3'-end fragment of leucoanthocyanin reductase (LAR) gene was amplified using 3' RACE PCR technology. Then complete LAR gene was obtained by BLAST comparison the 3'-end fragment and the other fragment that we have known, and splicing according to the overlapping region. The full-length cDNA of LAR gene is 1 301bp (GenBank accession No. EF205150), containing a 1 029bp ORF encoding a 342 amino acids protein, and its 3' untranslated region has an obvious polyadenylation signal. The deduced protein molecular weight was 37.5kD and its theoretical isoelectric point was 5.81. The deduced amino acid sequence of LAR gene from tea plant showed high identity with that of other plants, for instance 71%, 70% and 68% with *Vitis vinifera*, *Gossypium arboreum* and *Fragaria ananassa*, respectively.
4. Four different catechin content cultivars were selected from our tea germplasm appraisal database

to assay the gene expression level of the seven genes, chalcone synthase、flavanone 3-hydroxylase、flavonol synthase、dihydroflavonol 4-reductase、leucoanthocyanidin reductase、anthocyanidin reductase and anthocyanidin synthase, which were involved in the flavonoids biosynthesis. The result showed that, the DFR and LAR transcripts were expressed increased with the increasing of tea catechin content. Nevertheless, the others did not show this tendency clearly.

Key word: Chalcone isomerase, Flavonol synthase, Gene cloning, Leucoanthocyanidin reductase, Prokaryotic expression, Tea plant (*Camellia sinensis*)

目 录

英文缩略表	III
第一章 文献综述与研究思路	1
1.1 植物基因克隆技术	1
1.1.1 序列克隆.....	1
1.1.2 功能克隆.....	1
1.1.3 定位克隆.....	2
1.1.4 表型克隆.....	2
1.1.5 cDNA末端快速扩增技术.....	3
1.2 茶树功能基因克隆进展	4
1.2.1 茶多酚代谢关键酶基因的克隆.....	5
1.2.2 与咖啡碱合成有关酶基因的克隆.....	7
1.2.3 茶叶香气相关基因的克隆.....	7
1.2.4 茶氨酸合成相关基因的克隆.....	8
1.2.5 茶树中光反应相关基因的克隆.....	8
1.2.6 茶树中抗逆相关基因克隆.....	9
1.2.7 其它基因的克隆.....	9
1.2.8 EST策略分离功能基因.....	10
1.3 本研究的目的意义和思路	10
第二章 茶树查尔酮异构酶基因克隆及序列分析	12
2.1 材料和方法	12
2.1.1 材料	12
2.1.2 主要试剂和溶液.....	12
2.1.3 总RNA的提取.....	12
2.1.4 引物设计.....	13
2.1.5 合成cDNA第一链.....	13
2.1.6 单链cDNA的环化.....	14
2.1.7 巢式PCR反应.....	14
2.2 结果和分析	15
2.2.1 RNA质量.....	15
2.2.2 PCR扩增结果和cDNA全长的获得.....	15
2.2.3 序列同源性和蛋白质二级结构预测.....	16
2.2.4 系统树分析.....	17
2.3 讨论	17
第三章 茶树黄酮醇合成酶基因克隆、序列分析及原核表达	19
3.1 材料和方法	19

3.1.1 材料	19
3.1.2 主要试剂和溶液.....	19
3.1.3 引物设计.....	20
3.1.4 cDNA合成及PCR扩增.....	20
3.1.5 PCR产物的回收、克隆和测序.....	21
3.1.6 原核表达引物设计.....	22
3.1.7 原核表达载体的构建.....	22
3.1.8 重组质粒的双酶切和PCR鉴定.....	24
3.1.9 外源基因的诱导表达.....	25
3.2 结果和分析	25
3.2.1 RNA质量.....	25
3.2.2 PCR扩增结果和cDNA全长的获得.....	25
3.2.3 序列同源性和蛋白质二级结构预测.....	25
3.2.4 系统树分析.....	27
3.2.5 黄酮醇合成酶基因的PCR与酶切鉴定.....	27
3.2.6 外源基因的诱导表达.....	27
3.3 讨论	30
第四章 茶树无色花色素还原酶基因克隆及序列分析与类黄酮合成相关	
七个基因表达的RT-PCR分析	31
4.1 材料和方法	31
4.1.1 材料	31
4.1.2 主要试剂和溶液.....	31
4.1.3 引物设计.....	31
4.1.4 cDNA合成及PCR扩增.....	32
4.1.5 PCR产物的回收、克隆和测序.....	32
4.1.6 半定量PCR引物设计.....	33
4.1.7 基因表达的RT-PCR分析.....	33
4.2 结果和分析	34
4.2.1 PCR扩增结果和cDNA全长的获得.....	34
4.2.2 序列同源性和蛋白质二级结构预测.....	37
4.2.3 系统树分析.....	37
4.2.4 不同品种间的相对表达含量分析.....	38
4.3 讨论	39
第五章 主要结论和展望	41
5.1 克隆得到了茶树查尔酮异构酶基因	41
5.2 茶树黄酮醇合成酶基因的克隆及其原核表达	41
5.3 克隆获得了茶树无色花色素还原酶基因	42
5.4 利用半定量PCR的方法检测了不同基因的表达情况	42

5.5 展望	42
参考文献	44
致 谢	49
作 者 简 历	50

第一章 文献综述与研究思路

茶是一种由山茶科植物茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]幼嫩芽叶, 经不同的生产流程制成的饮料。2005 年世界茶叶栽培面积已达 256.1 万公顷, 总产量 341.9 万吨, 直接贸易额 40 多亿美元(<http://www.faostat.fao.org>)。茶已成为栽培规模最大、产量最多、消费人群最广的饮料作物之一。

现代研究表明, 茶叶富含黄酮类、生物碱类和其他许多重要的次生代谢物质, 它们对人体有重要的生理保健作用, 如防龋齿、抗菌抗病毒抗氧化、降血压降血脂降胆固醇、抗癌抗突变等(Sawai et al, 1998; Shi et al, 1994)。因此, 从茶叶中提取有效成分加工制成医药和保健品已成为茶树综合利用的重要方向。而品种对茶叶的质量至关重要, 随着茶叶市场向多元化发展, 优良茶树品种供不应求。因而, 采用生物技术改良或培育新一代茶树品种已成为国内外茶学研究的热点之一。茶树同大多数植物一样, 其生长发育是在多种代谢和生理过程基础上所发生的基因在时空上表达的综合现象, 开发和分离各种有潜在价值的基因并深入研究其机理, 将为从分子水平调控茶树的生长、发育和代谢, 并为茶树的遗传改良打下基础。

1.1 植物基因克隆技术

基因克隆就是利用体外重组技术将特定的基因和其它DNA顺序插入到载体分子中进行扩增, 它是随70年代初DNA体外重组技术发展起来的, 经过30多年的发展, 已经形成了一些比较成熟的方法, 主要有序列克隆、功能克隆、定位克隆和表型克隆等。

1.1.1 序列克隆

序列克隆即已知所克隆基因序列或同源基因的序列时采用的方法。目前很多植物基因序列已知, 当要克隆类似基因时可先从 GeneBank 库中找到有关基因的序列, 设计特异引物, 用 PCR 或 RT-PCR 的方法克隆不同植物的基因。这是 PCR 技术诞生后出现的一种快速、简便克隆植物基因的方法。有时要从其他的种、属中克隆同源基因时, 可以先比较序列已知的基因序列, 寻找比较保守的区域, 根据此区域的序列设计并合成探针, 然后从 cDNA 文库或者基因组文库中筛选到目的基因的克隆。茶树中很多基因, 包括苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)等都是以这种方法克隆的(Matsumoto et al, 1994; Takeuchi et al, 1994; 赵东等, 2001)。

1.1.2 功能克隆

功能克隆与序列克隆不同, 它是在目的基因序列未知的情况下, 先对其编码产物的生理生化及代谢途径进行研究, 然后根据得到的信息克隆基因的方法。根据克隆基因的原理又可分为两条路线, 一条是分离纯化已知的蛋白质或多肽, 制备该蛋白的特异抗体, 利用标记的特异蛋白抗体作为探针筛选由表达型载体建立的基因组文库或者 cDNA 文库, 并最终克隆目的基因; 第二条路

线是将蛋白质纯化后测定其氨基酸序列, 根据蛋白质密码子编码规律和密码子偏爱原则, 反向推算出 mRNA 序列, 然后据此人工合成一段寡核苷酸作探针, 利用同位素或其它方法标记后筛选一般的基因组文库或 cDNA 文库, 筛选阳性重组克隆, 并最终克隆目的基因。

周兆澜等(1996)构建水稻 cDNA 文库, 根据水稻巯基蛋白酶 cDNA 序列, 合成探针筛选 cDNA 文库, 克隆了水稻巯基蛋白酶抑制剂 cDNA, 巯基蛋白酶抑制剂是一类天然抗虫物质, 将它转化可能获抗虫谱广, 抗虫性强的转基因植物。Payne 等(1990)也用这种方法从烟草中克隆了两种酸性病原相关蛋白(Pathogenesis related proteins, 简称 PR 蛋白)PR-Q, PR-P 的基因。功能克隆只要知道目的基因表达的产物即可, 属于表型克隆范畴, 但目前大多数基因产物还不清楚, 即使知道了, 要纯化到可供氨基酸测序及抗体制备的蛋白质也很困难, 同时由于遗传密码的简并性, 很难推导出十分特异的探针, 所以大多数基因难以用这一方法予以克隆。

1.1.3 定位克隆

定位克隆是在利用分子标记技术对目的基因进行精确定位的基础上, 用与目的基因紧密连锁的分子标记筛选 DNA 文库, 从而构建包含目的基因区域的物理图谱, 再利用此物理图谱通过染色体步移逐步逼近目的基因或通过染色体登陆技术最终克隆目的基因的方法。它是克隆编码产物未知基因的一种有效方法。定位克隆技术依赖于高密度的分子标记图谱。随着分子生物学技术的飞速发展, 人们已经获得了许多高密度的遗传图谱, 例如水稻已有 3627 个分子标记的图谱, 覆盖基因组的 1530.4 cM。随着对目的基因的精细定位, 同时构建大尺度的物理图谱, 该技术的应用将更加广泛。

定位克隆技术对于基因组较小, 重复序列少而且已经构建了高密度限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)或随机扩增多态性(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)等标记图谱植物无疑是有效的, 如拟南芥和番茄, 但对象小麦、玉米等具有大型基因组而且重复序列高, 又难于构建高密度分子标记图谱的粮食作物来说, 却很困难。除此之外定位克隆技术需要寻找与目标基因座位连锁的遗传标记或部分功能信息。有时需连锁作图, 较费时费力, 而且在植物的基因组中, 大量存在 DNA 重复序列经常是染色体步移难以逾越的障碍。

1.1.4 表型克隆

表型克隆是与定位克隆相对的一种克隆基因的策略, 它可对因突变而导致的某一特殊表型的目的基因直接进行克隆分析并分离该基因, 而不必事先知道其生化功能及在染色体上的精确位置, 也不需知道假设基因的数目或其作用方式, 常见的表型克隆方法有转座子标签技术(Transposon Tagging)、消减杂交(Subtractive Hybridization)、mRNA 差别显示技术(mRNA Differential Display)、鸟枪克隆法等。其中应用价值较高的是转座子标签技术、鸟枪克隆法和 mRNA 差异显示技术。

1.1.5 cDNA 末端快速扩增技术

随着分子生物学的不断发展和人类基因组计划的深入研究,对基因的结构、功能及其表达的研究越来越成为后基因组计划中的研究热点,而这些研究都是以分离和克隆目的基因为基础的。目前在实验工作中,我们要得到某基因的片段、全长或近全长 cDNA,除了上面介绍的几种主要方法外,近几年发展起来的 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)凭借其快捷、方便等优点,越来越受到研究人员的青睐。RACE 是由 Frohman 等(1988)发明的一项新技术,由 PCR 技术发展而来,也被称为锚定 PCR 或单边 PCR。它是一种应用特异引物和通用引物从低丰度转录本中快速扩增已知 cDNA 片段旁侧 3'和 5'末端的简单而有效的方法,具有快捷、方便、高效等优点,可同时获得多个转录本。因此 RACE 技术已逐渐取代了经典的 cDNA 文库筛选技术,成为克隆全长 cDNA 序列的常用手段。

其基本原理是: 3'-RACE 以 Oligo(dT)和锚定引物逆转录 mRNA 得到第一条 cDNA 链,然后用含部分锚引物序列的引物与基因特异性引物进行第一轮扩增得到双链 cDNA,第二轮扩增则采用内部引物和基因特异引物以防止产生非特异性扩增产物。采用同样的原理,可以进行 5'-RACE。通过 RACE 获得全长 cDNA 克隆有两种途径:(1)在 3'-RACE 和 5'-RACE 产物重叠区寻找酶切位点,酶切连接两种产物即可获得全长 cDNA。(2)在 3'-RACE 和 5'-RACE 产物的 3'末端和 5'末端设计特异引物,在 5'-RACE cDNA 中扩增,可得到完整的 cDNA。

随着 RACE 技术的不断应用,许多研究者发现,成功地应用这些技术仍然困难很大,原因主要有两个:一是有三个连续的酶反应步骤,即反转录,脱氧核糖核苷酸末端转移酶加尾和 PCR,每一步都可能部分或完全失败;二是即使酶反应能顺利进行,也常常会产生大量除了特异产物之外的非特异或截短的产物背景。所以,许多实验小组均对其在不同方面进行了改良并得到有效使用。对传统 RACE 技术的改进主要体现在引物的设计及 RT-PCR 技术的改进。由于 RACE 采用的是基因特异引物,用同一 mRNA 样品分离不同的 5'cDNA 末端时显得特别麻烦。采用简并引物可以较好地解决这一问题。一种简并情况是,在 5'端加尾时,采用 poly(C),而不是 poly(A),然后用含 poly(G)或 G: I 混合物的引物进行扩增。另一种简并情况是在 3'采用两个简并的核苷酸,使引物定位在 poly(A)尾的起始点,从而消除了合成第一条 cDNA 链时 oligo(dT)与 poly(A)尾的任何部位的结合所带来的影响。这种方法亦称为锁定引物(lock-docking primer)法。其次是设计随机引物,由锚区域和 6 个随机核苷酸组成的引物(5'-anchor-NNNNNN-3')用于 3'-RACE 中的逆转录和 5'-RACE cDNA 第二链的合成。采用这种方法获得的是一系列不同长度的起始于基因特异性引物的 cDNA 片段,将最长的片段克隆后可以延伸已知区域的范围,重复这一步骤直到所有未知区域都被扩增。当 5'端或 3'端与已知区域相隔太远,以至于不能有效扩增整个未知区域时,这种方法特别有用。

RT-PCR 技术的改进主要是转录酶的选择、PCR 精确性和特异性的提高等方面。第一条 cDNA 链的转录质量是技术的关键步骤,对于获得全长 5'端来说尤为重要。由于 GC 含量高的 mRNA 可能形成稳定的二级结构等原因,逆转录时常会产生截短的 cDNA 片段;而截短的 cDNA 在后续的反应中会优先扩增,产生大量非特异性产物。选择嗜热 DNA 聚合酶可以解决这一问题,如 rTth(Perkin-Elmer)和 Tetz(Amersham)能在高温下(60℃-70℃)有效地逆转录 mRNA,从而消除了 mRNA 二级结构对逆转录的影响。在 PCR 反应中,选择 pfu (Stragene)等聚合酶可以使精确性提

高，它的掺错率仅为 *Taq* 酶的 1/12。同时，采用“热启动”PCR 技术(hot start PCR)，可以提高 PCR 反应的特异性。近年来，几种新型的 RACE 技术发展起来，主要有 RNA 连接酶介导的 RACE(RLM-RACE)和 oligo-capping 法等。RNA 连接酶介导的 RACE 与传统的 RACE 最主要的区别在于，在逆转录这一步骤之前，锚引物直接加在 mRNA 的 5'端，然后在基因特异性引物的作用下进行逆转录，使得只有含有锚引物的 cDNA 片段才会被扩增，得到 5'端全长 cDNA。

由于 RLM-RACE 在一开始阶段并没有严格区分开有无帽结构的 mRNA，锚引物也会加到许多非全长的 mRNA5'端。为了消除这一影响，Maruyama 和 Sugano(1994)创造了 oligo-capping 法。其基本做法是，先将所有的 mRNA 都用细菌碱性磷酸酯酶(bacterial alkaline phosphatase, BAP)或牛小肠碱性磷酸酯酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIP)处理，进行脱磷酸反应。这对 5'端有帽结构的全长 mRNA 无影响，却使的无帽结构的非全长 mRNA 的 5'端脱磷酸化成为羟基。由于缺少 5'-P，在连接反应中非全长的 mRNA 就不能成为连接酶的底物而与锚引物结合，从而消除了所有产生截短 5'端的机制。

RACE 技术除了获得全长 cDNA 外，还用于构建富含全长 cDNA 的高质量的文库，以及克隆同源片段等。

1.2 茶树功能基因克隆进展

茶树功能基因的分离克隆起步较晚，开始于 20 世纪 90 年代。近几年发展的速度也并不很快。到 2007 年 6 月为止，在 GenBank 上登录的全长基因已有 32 个(表 1-1)。这些基因主要是与茶树的次生代谢产物相关的酶类，如茶多酚合成的关键酶、与咖啡碱合成有关的酶以及一些其他影响茶叶品质的酶等(马春雷和陈亮，2006；陆建良等，2007)。

表 1-1 在 GenBank 登录已克隆的茶树全长基因

Table 1-1 Full length genes cloned from tea plant deposited to the GenBank

基因名称 Gene	登录号 GenBank accession	长度(bp) Length	作者 Author	年份 Year
ATP 硫化酶 ATP sulfurylase (APS1)	EF218618	1415	Zhu et al	2007
ATP 硫化酶 ATP sulfurylase (APS2)	EF218619	1706	Zhu et al	2007
花粉特异蛋白 pollen-specific protein	DQ887753	2079	Yu et al	2006
丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 serine/threonine protein kinase	DQ793217	1976	Paul et al	2006
细胞周期蛋白依赖性激酶-B cyclin dependent kinase B(cdkB)	AB247279	915	Fukamizu et al	2006
细胞周期蛋白依赖性激酶-A cyclin dependent kinase A(cdkA)	AB247281	885	Fukamizu et al	2006
细胞周期蛋白-B cyclin B(cycB)	AB247280	1323	Fukamizu et al	2006
细胞周期蛋白-D3 cyclin D3(cycD3)	AB247282	1116	Fukamizu et al	2006
锌指蛋白 zinc finger protein	DQ869863	1006	Paul et al	2006
4-香豆酸乙酰连接酶 4-coumaroyl CoA ligase	DQ194356	1767	Rani et al	2005
花色素还原酶 anthocyanidin reductase (ANR)	AY641729	1233	Singh et al	2005
反肉桂酸 4 羟化酶 trans-cinnamate 4-hydroxylase(C4H)	AY641731	1352	Singh et al	2005
谷氨酰胺合成酶 glutamine synthase(GS)	AB115184	1508	Tanaka and Taniguchi	2005
	AB115183	1595		
铵转运蛋白 ammonium transporter(AMT)	AB117640	1697	Taniguchi and Tanaka	2005
	AB114913	1702		
花青素合成酶 anthocyanidin synthase (ANS)	AY830416	1169	Singh et al	2004
δ -6-去饱和转化酶 delta-6-desaturase(D6DES)	AY169402	1501	Park et al	2004
类 QM 蛋白 QM-like protein	AY641733	969	Lal et al	2004

光合体系 II D1 蛋白 photosystem II protein D1	AY665295	1678	Hu et al	2004
	AY741464	1685		
咖啡因合成酶 caffeine synthase(CS)	AB031281	1405	Kato et al	2004
	AF031280	1438		
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	AF537127	1475	Li et al	2004
多酚氧化酶 polyphenol oxidase(PPO)	AY659975	1826	Raizada et al	2004
查尔酮合成酶 chalcone synthase(CHS)	AY656677	1289	Singh et al	2004
	D26595	1425		
黄烷酮 3-羟化酶 flavanone 3-hydroxylase (F3H)	AY641730	1365	Singh et al	2004
二氢黄酮醇 4-还原酶 dihydroflavonol 4-reductase(DFR)	AY648027	1413	Singh et al	2004
	AB018685	1420		
β -樱草苷酶 beta-primeverosidase	AB088027	1729	Ijima et al	2003
紫黄素脱环氧化酶 violaxanthin de-epoxidase (VDE)	AF462269	1562	Wei et al	2002
成熟激酶 Maturase(matK)	AF380077	2035	Prince and Parks	2002
n-甲基转移酶 n-methyltransferase	AX138777	1427	Mizuno et al	2001
S-腺苷蛋氨酸合成酶 S-adenosylmethionine synthase(SAM)	AB041534	1303	Feng and Liang	2000
5.8S 核糖体 5.8S ribosomal RNA	AF315492	653	Tang et al	2000
类 PR-1 蛋白 PR-1 like protein	AB015047	707	Tomimoto et al	1998
苯丙氨酸解氨酶 phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	D26596	2330	Matsumoto et al	1994

注：不包含本研究小组获得的基因。

Note: Except for the genes obtained by our research group.

1.2.1 茶多酚代谢关键酶基因的克隆

茶树中含有大量的多酚类化合物，含量一般为干重的15%—35%，是茶叶涩味的主要来源。在这些多酚类化合物中含有不少有利于人类健康的有益成份，其中儿茶素效果最为突出，它不仅对防治肿瘤、癌有特效，而且对增强微血管强韧性，降低血糖、血脂、血压，预防肝脏及冠状动脉硬化都有明显疗效(Salah et al, 1995; Vinson et al, 1995; Sawai et al, 1998; Shi et al, 1994)。

到目前为止茶多酚和儿茶素代谢过程中的许多关键酶已经被克隆，如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查尔酮合酶(CHS)、黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)、二氢黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、3'5'类黄酮羟化酶(F3'5'H)、花色素还原酶(anthocyanidin reductase, ANR)和花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)。PAL催化苯丙氨酸的脱氨反应，使NH₃释放出来形成反式肉桂酸。此酶在植物体内次生物质(如类黄酮等)代谢中起重要作用，是微管植物普遍存在的次生代谢关键酶类。Matsumoto等(1994)构建了薮北茶树品种(日本栽培面积最大)的第一个cDNA文库，他们首先用标记了的水稻苯丙氨酸解氨酶cDNA筛选文库，获得了两个带有一段短插入片段的阳性克隆，然后以这段片段为探针进一步杂交并筛选，得到其全长基因，长 2344bp，带有一个PolyA尾巴，开放阅读框长 2 142bp。氨基酸序列同源性比较说明其与双子叶植物的同源性较高，豌豆为 87.3%、白杨为 84.3%、马铃薯为 82.2%。但其同单子叶植物和裸子植物的同源性较低。并对茶树进行PAL-RFLP分析，检测茶树PAL基因的变异；用包括 3'非翻译区在内的 280 bp的PAL探针检出了 3 个不同长度的DNA片段A、B和D。通过对PAL基因的遗传规律进行研究，表明 3 个不同片段的遗传符合孟德尔单基因遗传定律，说明PAL基因是一个复等位基因。

植物次生代谢产物种类繁多，生物合成途径也千差万别，其中类黄酮的代谢过程是研究的比较清楚的途径之一，在不同植物中相似性也很高，其主要生物合成途径如图 1-1 所示(Takos et al, 2006)。查尔酮合酶是植物类黄酮生物合成中的关键酶，它催化 4-香豆酸CoA和 3 个丙二酰CoA分

子缩合产生查尔酮(chalcone),它是类黄酮合成途径中的第一个中间产物。随后在不同酶的作用下形成各种类黄酮和黄烷醇类物质。CHS是类黄酮合成途径中研究的最清楚的一个酶,已在许多植物中得到纯化;1994年,Takeuchi等首次在茶树中分离得到了该基因。他们用 p^{32} 标记了的荷兰芹(Parsley)cDNA片段筛选文库,得到三个克隆VEG13、VEG37、VEG41。深入分析表明三个插入片段都包括一个1167 bp长的开放阅读框,编码389个氨基酸残基,在氨基酸水平上同荷兰芹CHS的同源性分别为85%、85%、84%。3个CHS基因的编码序列有较高的相似性,但5'和3'不翻译区域相似性很低。Takeuchi等(1995)还报道了遮荫条件下,PAL和CHS的mRNA水平均明显降低,表明PAL和CHS基因在光照下表达增加,遮荫下表达减少。最近Singh等(2005)又克隆了ANR、C4H、ANS、F3H等类黄酮合成过程中的重要酶,并已在GenBank上登录。所有这些类黄酮相关酶基因的克隆都将为以后用生物技术手段调控类黄酮的合成打下基础。

多酚氧化酶(PPO)是另外一种在茶多酚代谢过程中起重要作用的酶类,对茶树的品质影响很大。不同类型的茶叶要求不同活性的多酚氧化酶。因而多酚氧化酶活性的高低直接影响到茶叶的品质,通过传统的方法难以对酶活性进行有效的调控,而通过基因工程来调控多酚氧化酶的活性,则会有重要的理论和实际意义。赵东等(2001)根据已经发表的多酚氧化酶基因中的保守序列设计简并引物,利用nest-PCR得到了茶树多酚氧化酶基因的部分序列,其长度为1006bp,编码335个氨基酸残基。并对克隆到的基因进行了序列分析,结果表明茶树多酚氧化酶基因与其他植物中的多酚氧化酶基因有较高的相似性,尤其在铜离子结合部位,他们还利用phylic软件对多酚氧化酶氨基酸序列进行了进化树分析,结果表明茶树的多酚氧化酶可以与大多数木本植物聚合成一个组。Raizada等(2004)在此基础上克隆茶树多酚氧化酶的全长基因,长1826bp,并已在GenBank上登录。

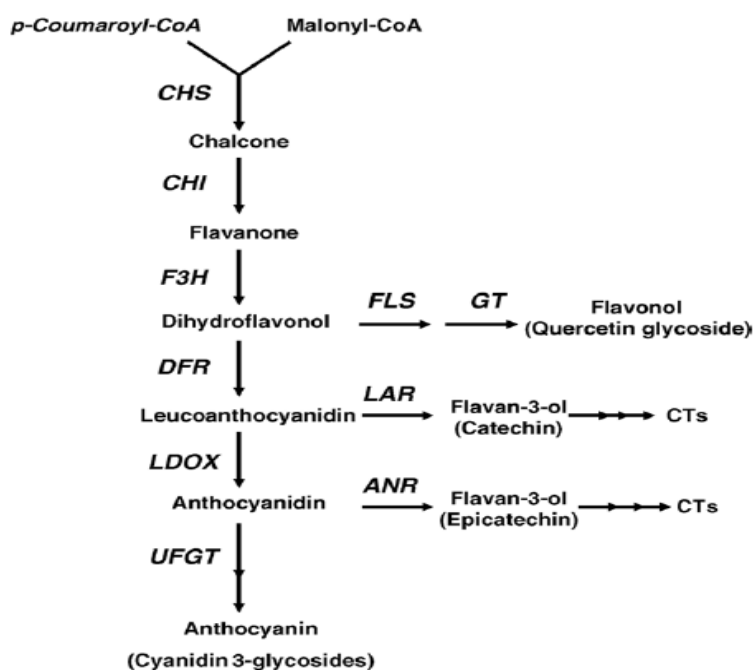


图 1-1 苹果中类黄酮生物合成途径示意图 (Takos et al., 2006)

Fig. 1-1 A schematic representation of flavonoid biosynthetic pathway in apple

Note: CHS, chalcone synthase; CHI, Chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; FLS, Flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LAR, Leucoanthocyanidin reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; ANR, anthocyanidin reductase

1.2.2 与咖啡碱合成有关酶基因的克隆

咖啡碱是茶叶最主要的嘌呤碱，对茶汤滋味有影响，相关系数为 0.859。茶树中 99% 的咖啡碱存在于叶片，含量为 2%—5%，饮茶之所以有兴奋、利尿、强心、解毒等许多药理效应，都与茶叶中咖啡碱有关(李远华等，2004)。目前已经克隆了 2 个与咖啡碱合成有关酶的基因，即 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthase, SAM)、咖啡碱合成酶(caffeine synthase, CS)。

SAM 是茶树咖啡碱生物合成过程中甲基化反应的唯一甲基供体，还是植物体内转甲基反应的甲基供体及多胺和乙烯合成的前体，它是由 S-腺苷甲硫氨酸合成酶催化甲硫氨酸和 ATP 反应生成的，因而对 SAM 合成酶的研究在植物逆境生理、衰老生理和茶树咖啡碱生物代谢及其调控研究上均具有重要意义。冯艳飞和梁月荣(2001)从茶树总 RNA 反转录合成了 cDNA，并以此为模板分别用三对 PCR 引物扩增 SAM 合成酶基因的中间主片段、3'端和 5'端片段。最后经 BLAST 比较及重叠区域拼接得到完整的 SAM 基因序列。所得序列长为 1 303 bp，编码 394 个氨基酸。并通过比较证明与其它植物的 SAM 基因有较高的同源性。Liang 等(2001)以薷北为材料提取总 RNA，根据已知其它作物 SAM 基因的保守序列区设计上游和下游引物，用 RT-PCR 进行 cDNA 扩增，得到茶树 SAM 基因 cDNA 序列，并确定此序列为 800bp，而且实验证明 SAM 基因只在茶树的叶片中存在，根部无此基因。

茶树体内有 3 种 N-甲基转移酶，分别为黄嘌呤核苷 N-甲基转移酶(7-NMT)、7-甲基黄嘌呤 N-甲基转移酶(3-NMT)和可可碱 N-甲基转移酶(1-NMT)，由于催化甲基反应的 3-NMT 和 1-NMT 很多性质都相同，因此有人把两种酶看做同一种酶，称为咖啡碱合成酶。Kato 等(1999)首次对该酶进行了纯化，并对其性质进行了全面的研究，随后他们以茶树嫩叶为材料，提取总 RNA，并获得了 cDNA，利用 RACE 技术以咖啡碱合酶的 N 端氨基酸序列设计简并特异引物，PCR 扩增获得了 CS 的 cDNA，测得序列为 1 438 bp，编码 369 个氨基酸。但获得的 CS 基因与咖啡中此基因仅有 40% 同源性。用重组的 CS 在大肠杆菌中表达，证明 CS1 是编码咖啡碱合成酶的基因，并得出 CS 在嫩叶中的含量很高，但在老叶中的含量很低。咖啡碱合成酶基因的克隆是一个重要的进步，它为应用反义 RNA 或基因沉默技术来培育转基因植株奠定了基础(Kato et al, 2000)。

1.2.3 茶叶香气相关基因的克隆

香气是茶叶品质的重要指标之一，提高茶叶香气的技术研究一直是国内外研究者的关注焦点。茶叶的香气不仅受茶区土壤气候等条件以及加工过程的影响，更与茶树的品种遗传特性密切相关。 β -羟草苷酶和 β -葡萄糖苷酶是茶叶香气形成过程中两个重要的酶。

β -葡萄糖苷酶属于水解酶类，存在于自然界许多植物体内，它的研究最早可以追溯到 1837 年，Liebig 和 Wohler 首次在苦杏仁汁中发现了 β -葡萄糖苷酶(宛晓春，1992)。之后分别从黑樱桃、水稻、大豆、木薯等作物中纯化出了该酶(Li et al, 1992; Masaru et al, 1995; Elias et al, 1997)。Takeo 等(1981)利用茶叶匀浆试验，在加入 β -葡萄糖苷酶抑制剂 Hg 离子及葡萄糖酸内酯时，发现萜烯醇类香气物质(芳樟醇和香叶醇)的生成受阻，受热处理后的茶叶匀浆添加 β -葡萄糖苷酶后，亦能产生芳樟醇和香叶醇，证实茶叶中存在以葡萄糖苷形式存在的单萜烯醇。在随后的十几年里，分别从绿茶、鲜叶、乌龙茶中分离鉴定了十几种糖苷类香气前体物质，并初步确立了 β -糖苷酶类(β -

葡萄糖苷酶、 β -樱草苷酶)参与这类糖苷的水解,释放出花果香气,基本确立了一条茶叶香气形成的新途径。李远华等(2004)克隆了此基因,该酶 cDNA 全长序列 1 475 bp,与其它植物同源性为 40%—60%,存在多个氨基酸功能结构域。利用表达载体构建重组质粒,转化到大肠杆菌中诱导产生 64kD 的融合蛋白,表达产物具有正常的生物活性,能催化葡萄糖苷键的水解反应,由此证明所得基因确为 β -葡萄糖苷酶 cDNA,这为今后通过微生物大量生产价格低廉 β -葡萄糖苷酶奠定了良好的基础。随后他们采用原位杂交方法,在显微水平上对茶树体内 β -葡萄糖苷酶基因 mRNA 表达情况进行了研究,研究发现 β -葡萄糖苷酶基因在茶树中表达的主要位置为栅栏组织,茶树中的叶主脉韧皮部没有表达信号,在过冬的老叶中也没有检测到表达信号。且不同茶树品种中 β -葡萄糖苷酶的活性存在很大的差别,季节之间差别也很大,春秋季节鲜叶明显高于夏季,而且糖苷类前体含量与 β -葡萄糖苷酶活性的消长规律相似。

另外一个与茶叶香气相关的重要酶— β -樱草苷酶的全长基因则由 Mizutani 等(2002)克隆得到的。茶叶 β -樱草苷酶是一个独特的二糖专一性糖苷酶,它水解 β -樱草糖苷来释放各种芳香类化合物,并且与乌龙茶和黑茶加工过程中香气的形成有着密切的关系。Mizutani 等首先从一种绿茶鲜叶中提取了 β -樱草苷酶蛋白,并部分测定了该蛋白的氨基酸序列。然后用筛选文库的方法获得了 β -樱草苷酶的 cDNA,得到的 β -樱草苷酶的 cDNA 编码一段 28 个氨基酸残基的 N 端信号序列和一段包括 479 个氨基酸长的成熟蛋白。与其它植物的同源性为 50%—60%。其在大肠杆菌中表达得到的产物能够水解 β -樱草糖苷,释放芳香类化合物和糖苷配基,该酶选择性地识别 β -樱草糖苷做为底物,并且专一性地水解 β -糖苷类化合物。同时他们认为 β -樱草苷酶在茶树生物防御方面的作用也是值得研究的。

1.2.4 茶氨酸合成相关基因的克隆

作为茶叶的特征氨基酸,茶氨酸几乎存在于茶树的所有器官和组织中。经大量研究表明,茶氨酸在茶树的根部形成,然后向新梢积聚,因而茶树新梢中茶氨酸含量最高。茶氨酸作为茶叶中的一种特有氨基酸,是构成绿茶风味的物质,且有许多的保健功能。Sugiyama 等(1999)研究发现茶氨酸和阿霉素(一种抗肿瘤药)联合使用,能够抑制卵巢肿瘤细胞在肝脏中的转移,这说明茶氨酸对阿霉素抗肿瘤活性的影响极大。到目前为止已经克隆的茶氨酸合成相关的全长基因只有一个,即谷氨酰胺合成酶(glutamine synthase, GS) (Tanaka and Taniguchi, 2005)。谷氨酰胺合成酶是高等植物体内关键的氨同化酶。GS 有多种同工酶,根据这些同工酶在亚细胞结构中的定位,可分为胞质型 GS(GS1)和叶绿体型 GS(GS2),它们在植物体内起着非重叠的作用(王其海, 2002)。

1.2.5 茶树中光反应相关基因的克隆

植物利用它特有的叶绿素吸收日光能,将二氧化碳和水转化为富含能量的有机物,并释放氧气的过程称为光合作用,它是地球上所有生物生命活动的基础。茶叶中已经克隆的光反应相关基因有 2 个,光合体系 II D1 蛋白和紫黄素脱环氧化酶 (violaxanthin de-epoxidase, VDE),它们分别是由 Hu(2004)和韦朝领(2003)克隆得到的。

目前研究比较清楚的是黄素脱环氧化酶。光能是植物进行光合作用的能量基础,但是过多的光能将诱导产生有害物质(单线态氧),导致光合反应中心的破坏。植物体内存在多种光保护途径,

其中依赖于叶黄素循环的热耗散是植物光合器官在自然条件下免遭光破坏的重要途径之一。当光合机构吸收的光能不能全部用于光合作用时,紫黄素在 VDE 催化下两次脱环氧生成玉米黄素,玉米黄素在玉米黄素环氧化酶(ZE)的催化下环氧化生成紫黄素。研究表明,玉米黄素能够以热辐射形式耗散光合器官中过剩的激发能,从而使光合器官免遭光破坏。因此 VDE 被认为是叶黄素循环在光保护中的关键酶。韦朝领等(2003)根据 GenBank 中已登陆的 VDE 基因的 cDNA 序列,设计简并引物,用 RT-PCR 与 3'/5'RACE 相结合的方法从茶树中克隆 VDE 基因的 cDNA 全序列,全长 1623bp,编码 474 个氨基酸残基。分子系统进化树分析表明 VDE 的氨基酸序列进化与植物进化基本保持一致。随后他们对茶树 VDE 蛋白的氨基酸序列进行了生物信息学分析,发现它含有一个 lipocalin 蛋白特征区,对其中 2 个高度保守的氨基酸位点 Gly 和 Trp 分别进行体外定点突变、表达和生物活性鉴定,发现这两个突变体的表达产物催化活性都很弱,说明 lipocalin 特征区确实是影响茶树 VDE 活性的主要功能区,这为从分子生物学角度研究和调控茶树的叶黄素循环功能,进而为提高其抗逆性奠定了基础。

1.2.6 茶树中抗逆相关基因克隆

随着世界人口的不断增长,持续提高粮食产量显得更为迫切。减少病虫害造成的损失是增加产量的重要途径。据统计,每年全球粮食总产量因害虫造成的损失达 14%。害虫不仅对作物产生直接危害,还因携带各种植物病原体造成间接危害。长期以来,农作物害虫防治依赖于合成化学杀虫剂,但它们的使用严重污染了环境、食物链和水资源。生物杀虫剂即是在这样的背景下出现的。目前,Bt 生物制剂占生物杀虫剂的 90%以上,它是世界杀虫剂的重要组成部分,巯基蛋白酶抑制剂(Cystatin)既是其中的一种。王朝霞等(2005)根据许多已知植物巯基蛋白酶抑制剂氨基酸保守序列设计一对简并引物,并从茶叶品种龙井 43 鲜叶中提取总 RNA,用 RT-PCR 法扩增一段短特异片段,通过 3'/5'RACE 的方法,分别扩增出 3'端和 5'端的序列,从而获得茶树巯基蛋白酶抑制剂基因的全长序列,所得序列全长 627bp,编码 101 个氨基酸,分子量约 11kD。该基因在推测的氨基酸序列中含有巯基蛋白酶抑制剂家族中高度保守的、与活性有关的 QXVXG 结构,且经 Blast 分析表明,该基因序列与其他植物巯基蛋白酶抑制剂基因的氨基酸序列同源性为 54%—77%。该基因的克隆将为茶树生物防治病虫害提供帮助。

1.2.7 其它基因的克隆

微管是构成真核细胞的骨架之一,微管蛋白是微管的组成蛋白质,是真核细胞内普遍存在的蛋白质,由 α 和 β 两个亚基组成。微管在细胞分裂、物质运输、细胞极性及生长的控制等许多生理活动中起着极其重要的作用,微管还可能参与控制细胞壁微纤丝的沉积方向,从而控制细胞的生长,并进一步控制整体植物的生长发育。有些高等植物的微管蛋白基因已经克隆出来,并测定了核酸序列。竹内敦子等(1994)首次从薹北 cDNA 文库中,用 β -微管蛋白特异引物进行 PCR 扩增克隆到一个 505 bp 不含反义引物序列的 β -微管蛋白 cDNA,其推导的氨基酸序列与其它高等植物有很高的同源性。5.8S、16S、26S 核糖体 RNA 等是构成核糖体的重要组分,在研究植物起源、进化中有重要作用;1,5-二磷酸核酮糖羧化酶是卡尔文循环途径中催化二氧化碳固定的酶,是植物体内的能量代谢中的重要酶类;铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT)在植物根系吸收土壤

氮素中起主要作用，它的可隆将为用生物技术手段调节 AMT 蛋白在茶叶中的表达量，以便合理利用氮肥有很大帮助。另外还有一些其它茶树基因也在近期得到了克隆(表 1)。这些茶树基因的克隆，都将为从分子水平上更好地了解、研究、调控茶树的生理代谢、生长发育和品质等提供帮助。

1.2.8 EST 策略分离功能基因

除了一些经典的基因分离和可隆方法外，近年来，由于DNA自动测序技术的快速发展，用 EST(Expressed Sequence Tags)取代对cDNA全长筛选、基因组序列鉴定等繁琐的实验操作，可大大地提高分离基因的效率。截至 2007 年 6 月 1 日，GenBank的dbEST数据库中已经有 4337 多万条EST序列 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)，且它的数量正以每月平均几十万条的速度递增。将所获EST用生物信息学方法与各公共数据库中已知序列进行比较，可迅速而准确地确定基因功能。由于在构建cDNA文库时要尽可能地选用全长cDNA，所以一旦发现有价值EST，可以找到对应的克隆，并获得其全长cDNA，直接用于转基因的研究。

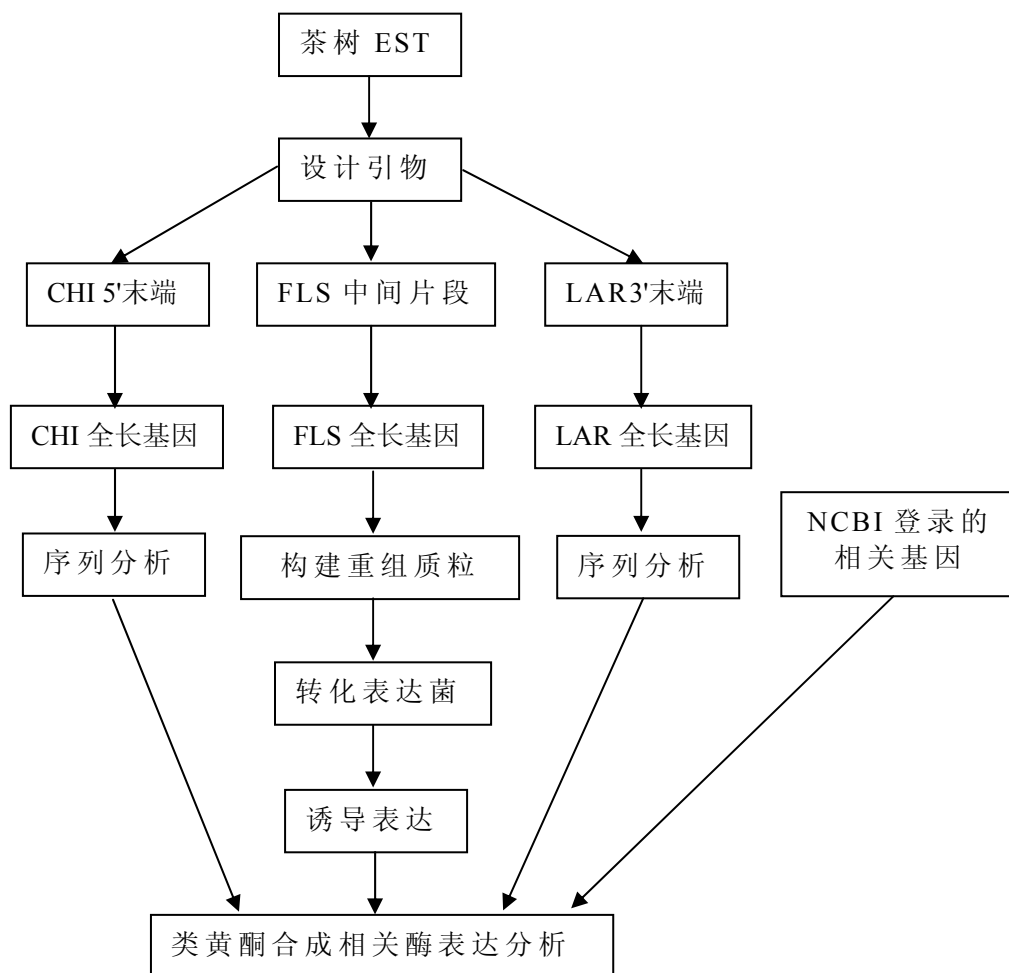
Chen 等(2005)应用 EST 策略对龙井 43 新梢 cDNA 文库的 4320 个克隆的序列进行测定，获得长度大于 200 bp 的高质量的序列 1 684 个。所有 EST 与 NCBI(National Center for Biotechnology Information)的核酸数据库比对，有 36%的 EST 序列显示了与已知序列很大的同源性，通过 DNATool 软件去除 836 个重复序列后，进行 BLAST 分析，丰度较高的基因约 30 个，占总数的 10%；中等丰度基因约 100 个，占总数的 30%；其余低丰度的基因约占 60%。他们随后结合拟南芥基因功能分类标准，把茶树新梢组织中有功能描述的基因分为 12 类。经过分析发现：与编码能量代谢相关基因的 EST 最多，占有功能描述基因的 26.39%、蛋白质合成相关基因的 EST 占有功能描述基因的 17.86%、细胞结构相关基因占 10.71%、细胞抗性及其防御相关基因占 9.23%、代谢相关基因占 8.33%、信号转导相关基因占 5.36%、细胞内运输相关基因占 4.66%、转录相关基因占 3.87%、次生代谢相关基因占 3.47%、细胞生长发育相关基因占 3.77%、蛋白质降解相关基因占 1.69%和功能不明确基因 4.66%。

1.3 本研究的目的意义和思路

ESTs 测序是目前应用很广泛的寻找新基因的手段。在植物中，功能基因序列只占基因组全序列的 2%，所以利用 ESTs 技术研究功能基因优越性是显而易见的，但其中存在的一个主要问题在于其得到的 EST 一般并不是基因的全长序列，随着分子生物学的不断发展和人类基因组计划的深入研究，对基因的结构、功能及其表达的研究越来越成为后基因组计划中的研究热点，而这些研究都是以分离和克隆全长目的基因为基础的。因此找到一个快速有效的方法克隆 cDNA 全长就显得尤为重要。

本论文以本实验室已获得的大量 EST 片段为基础，拟利用 3'-RACE、5'-RACE 以及 RT-PCR 技术克隆查尔酮异构酶、黄酮醇合成酶和无色花色素还原酶这三个茶树类黄酮代谢中的重要基因，并筛选合适基因进行原核表达研究，为从分子水平调控茶树的生长、发育和物质代谢打下基础。

本实验的主要流程如下：



第二章 茶树查尔酮异构酶基因克隆及序列分析

儿茶素合成途径中的第一个中间产物是查尔酮(chalcone), 它由4-香豆酰CoA和3个丙二酰CoA分子缩合产生, 由查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)催化。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)是黄酮类代谢途径中的早期酶, 也是增加黄酮醇产物的关键酶之一, 它催化查尔酮异构化为黄烷酮柑橘素(Muir et al, 2001)。黄烷酮柑橘素是类黄酮合成途径中第一个稳定的中间产物, 由此再经由黄烷酮3-羟化酶(F3H)、二氢黄酮4-还原酶(DFR)等的催化作用就可以生成一系列常见的次生代谢产物, 从而形成其他黄酮类物质。目前为止, 儿茶素代谢过程中的许多重要酶已经被克隆, 如PAL、CHS、F3H、DFR和ANS等, 其中CHS是研究得最清楚的一个酶, 已在许多植物中得到纯化。而关于茶树查尔酮异构酶的研究却鲜有报道, 其全长基因的分离克隆还处于空白状态。本试验采用EST测序技术和T₄RNA连接酶介导的5'RACE技术克隆了茶树查尔酮异构酶的全长基因, 为利用基因工程手段调控茶树黄酮类物质的生物合成打下基础。

2.1 材料和方法

2.1.1 材料

春季龙井43新梢上的一芽二叶, 采自中国农业科学院茶叶研究所内国家种质杭州茶树圃, 样品采集后用液氮迅速冷冻处理, 然后将其保存于-80℃冰箱中备用。

2.1.2 主要试剂和溶液

RNA提取的Trizol试剂购自GibcoBRL公司; Takara 5'-Full RACE Core Set和Taq polymerase均购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA分子量标准购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

上样buffer(1 mL): 由45%甲酰胺545 μ L、37%甲醛196 μ L、10 \times 3-(N-玛林代)丙磺酸 121 μ L、80%甘油76 μ L和10%溴酚兰62 μ L配制。

0.5 M EDTA(pH 8.0): 18.61 g EDTA-Na \cdot 2H₂O溶于80 mL 双蒸水中, 用NaOH溶液调pH至8.0, 定溶至100 mL, 高压灭菌。

DEPC水: 1000 mL双蒸水中加1 mL DEPC, 放在1000 mL容量瓶中静置4 h后备用。

70%乙醇(要在抽提时现配): 用无水乙醇和DEPC水配制(DEPC水: 无水乙醇=1:3), 然后放于-20℃备用。

5 \times TBE缓冲液: Tris碱54 g, 硼酸27.5 g, 0.5 M EDTA(pH 8.0) 20 mL, 加水至1000 mL, 室温储存, 使用时用双蒸水稀释10倍。

2.1.3 总 RNA 的提取

- 1) 取生长健壮的茶树春茶新梢 100 mg, 迅速加液氮冷冻研磨成细粉末状;
- 2) 加入 1 000 μ L Trizol 试剂继续研磨后, 又再加入 1 000 μ L Trizol 试剂, 混匀分装到两个经DEPC(焦炭酸二乙酯)处理的 1.5 mL 离心管中, 冰上放置 5 min;

- 3) 各加入 200 μL 的氯仿, 盖紧样品管盖, 用手用力摇晃试管 15 秒, 使其充分混匀, 静置 5 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min;
- 4) 小心吸取上层水相 500 μL 转入新的 1.5 mL EP 管中, 加入等体积异丙醇, 上下轻轻颠倒 10 次, 室温放置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min;
- 5) 小心倒掉上清, 留取沉淀。加 1mL 现配的 75%的乙醇(预冷)振荡洗涤 RNA 沉淀一次, 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 r/min 离心 5 min;
- 6) 倒去乙醇, 取沉淀置超净工作台开风机吹干, 注意不能让RNA沉淀完全干燥, 后加入 30 μL 经 DEPC处理过的ddH₂O溶解沉淀;
- 7) 吸取 5 μL RNA, 1.2%甲醛凝胶电泳检测 RNA 质量。电泳时, 电泳槽置于冰上, 保证低温, 电压不超过 5 v/cm。RNA 可放于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中长期保存, 备用。

2.1.4 引物设计

按照宝生物工程(大连)有限公司的5'RACE试剂盒要求, 根据已获得的查儿酮异构酶EST片段设计并合成了五条引物, 包括一条磷酸化的RT引物和四条反向的嵌套引物(引物所处位置如图1-1所示), 引物序列分别为:

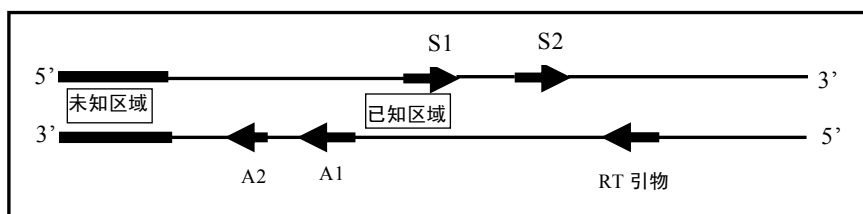


图 2-1 各引物设计位置图

Fig. 2-1 The position of designed primers

S1: 5'-CAC TGC CAA GGC TAA GAT GGT TTC C-3';

A1: 5'-CAC GGT GGT TGC CAT TCT TTG ACG A-3';

S2: 5'-AAG ATT GCC GAT GGT GAG ATG GGG A-3';

A2: 5'-GGT GGT TTT GGC TGG CTA TGC TAT GG-3';

RT Primer: 5'-CAA CCG GCA CGT CAT-3', 它的5'端磷酸化由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

2.1.5 合成 cDNA 第一链

按照5'-Full RACE Core Set试剂盒的操作方法, 在一个DEPC处理过的离心管中加入下列混合物:

10 \times RT Buffer	1.5 μL
RNase Inhibitor(40 U/ μL)	0.5 μL
Total RNA(约5 μg)	4 μL
AMV Reverse Transcriptase XL(5 U/ μL)	1 μL
RT-Primer(200 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL

RNase Free dH ₂ O	7 μ L
Total	15 μ L

将管中组分混匀置30℃水浴10 min, 后将其移置50℃水浴30 min, 80℃水浴2 min, 获得cDNA第一链。

2.1.6 单链 cDNA 的环化

- 1) 在得到的 cDNA 第一链反应液中加入下列组分配制 RNA 分解反应液:

cDNA 第一链	15 μ L
5×Hybrid RNA Degradation Buffer	15 μ L
dH ₂ O	45 μ L
Total	75 μ L

- 2) 在上述反应液中加入 1 μ L 的 RNase H, 30℃反应 1 h;
- 3) 在上述反应液(76 μ L)中加入 100 μ L 的 TE Buffer 或 dH₂O, 500 μ L 的 100%乙醇均匀混合后在 -80℃放置 15 min 或 -20℃放置 30 min, 进行乙醇沉淀;
- 4) 12 000 r/min 以上离心 10 min, 除掉上清液。向装有沉淀的离心管中加入 500 μ L 的 70%乙醇, 12 000 r/min 以上离心 5 min, 除去上清液后将沉淀干燥处理;
- 5) 在 Hybrid RNA 分解的乙醇沉淀物(单链 cDNA)中加入 5×RNA(ssDNA)Ligation Buffer 8 μ L 和蒸馏水 12 μ L, 溶解 DNA;
- 6) 再加入 20 μ L 的 40% PEG #6 000 和 T₄ RNA Ligase (60 U/ μ L) 1 μ L, 均匀混合, 16℃过夜反应 (15-18 h), 得到环化的单链cDNA, 将产物稀释 10 倍后直接用于PCR或放-20℃保存。

2.1.7 巢式 PCR 反应

- 1) 第一轮 PCR 反应, 向一经灭菌的 0.5 mL 微量离心管中依次加入下列组分:

10× PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2 μ L
dNTPs (2.5 mmol/L each)	3.2 μ L
环化的单链 cDNA	0.4 μ L
Primer A1、S1(10 pmol/ μ L)	0.2 μ L/each
Taq polymerase (5 U/ μ L)	0.2 μ L
ddH ₂ O	13.8 μ L
Total	20 μ L

- 2) 按下列条件进行 PCR 反应:

94℃	3 min	} 35 Cycles
94℃	45 s	
50℃	45 s	
72℃	45 s	

- 3) 然后将得到 PCR 产物用蒸馏水稀释 10 倍, 取 1 μ L 作为模板, 进行第二次 PCR, 反应体系如下:

10× PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μL
dNTPs (2.5 mmol/L each)	8 μL
环化的单链 cDNA	1 μL
Primer A2、S2(10 pmol/μL)	0.5 μL/each
<i>Taq</i> polymerase (5 U/μL)	0.5 μL
ddH ₂ O	34.5 μL
Total	50 μL

4) 第二次 PCR 反应条件:

94℃	3 min	} 35 Cycles
94℃	45 s	
65℃	45 s	
72℃	45 s	

扩增产物在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测。

2.2 结果和分析

2.2.1 RNA 质量

利用 Trizol 试剂提取的总 RNA 在 1.2%甲醛凝胶电泳上检测, 结果如图 2-2, 可以看到 28S、18S、5S 三条带, 其中 28S 和 18S 较亮, 而 5S 的亮度非常弱, 说明所提取的 RNA 基本上没有降

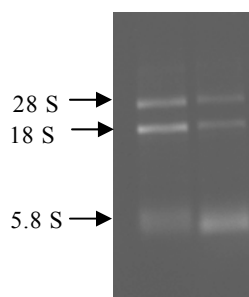


图 2-2 RNA 电泳结果

Fig.2-2 Electrophoresis results of RNA

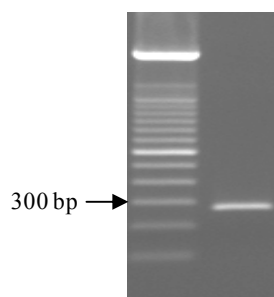


图 2-3 5'RACE 扩增产物的电泳结果

Fig.2-3 Electrophoresis results of 5'RACE

解, 完整性较好。加样孔处没有亮带, 即没有DNA污染。总RNA在 260nm和 280nm处的光吸收值之比OD_{260/280}分别为 1.87 和 1.92, 在 1.8~2.0 之间, 说明均一性较好, 蛋白质的含量很低, 可以用于进一步试验。

2.2.2 PCR 扩增结果和 cDNA 全长的获得

第二次 PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测, 在 300 bp 左右处有一条清晰的带(图 2-3)。将 PCR 产物送杭州华大基因研发中心测序后, 将得到的序列与原有的 EST 拼接, 并结合测序峰图进行校正, 得到一条长 1 163 bp 的序列(图 2-4), 已在 GenBank 登录, 登录号为 DQ904329。用 OFR 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对序列进行分析, 最后确定其开放阅读框长

```

1  TGTCTCTGCAATTGAATTCCTTCAACTGTATGCATTTGCAGCAAAAGACCTAAGAATTACA
61  AAACGCATACTAAATGTAAGGAAGTGCAATATATCAAAGAACAATACTGATGTACACCAT
121 TTAAGTTCCCCTATCTAATGCTCAAAACAAGGTAGGCTGAAGATAAAAGGGCCATAGCAT
181 AGCCAGCCAAAACCAACCATCCAAAATCTCTCATATCTCTCTCTAAACTCTCATCGTCAA
241 AGAATGGCAACCACCGTGGAGGATATCACTGCCAAGGCTAAGATGGTTTCCTTAGAGGCA
      M A T T V E D I T A K A K M V S L E A
301 CTGACACCTAAAGAGGAGAAAGTGAATGGCCCTGAATCAAATAAGATTGCCGATGGTGAG
      L T P K E E K V N G P E S N K I A D G E
361 ATGGGGAAAGCTGATGAAGAGCCACAAATGGGCAAGAAAGATGACGTGCCGGTTGAGACT
      M G K A D E E P Q M G K K D D V P V E T
421 GAACCCAAGACCGGGGTCTCCTTTCCGATTAAGTTGGATGATGGGAAGCAGTTGAATGCG
      E P K T G V S F P I K L D D G K Q L N A
481 GTTGGGTTGAGGAAAAAAGCGTGCTTGGCATCGGCATCAAAATCTATGGCTTCGGAATA
      V G L R K K S V L G I G I K I Y G F G I
541 TATGCAGATAATGAGACACTGAAAGATCTTCTGAGGACAAAAATTGGGAAAGCACCAACA
      Y A D N E T L K D L L R T K I G K A P T
601 AAACCTACCAAGGAAATGTACCAACTGGTAATTGACAGTGATGTAGGAATGCTGGTGCGA
      K P T K E M Y Q L V I D S D V G M L V R
661 TTGGTAATGGTGTGTTTCCAACCTCACAATGAGCATGGTAAGAAAGAACTTTGATGAAGTT
      L V M V F S N L T M S M V R K N F D E V
721 CTTGAGCATCTATCAAAAAGCTCACTGGTGGAAGAATGACGAGCTCACAAGAAGATT
      L G A S I K K L T G G K N D E L T K K I
781 ATGGGTGAAGCTTCAGATGACATAAAGCTGACATGTGGTTCAATAATTGAGATTCTCGG
      M G E A S D D I K L T C G S I I E I S R
841 CTTCAGGATACATTCTCCAAACAAAAGTGATGGATGAAGTTGTGAGCAAGGTTGAAAGT
      L P G Y I L Q T K V M D E V V S K V E S
901 GAACTCCTATGCAGGGCCTATACCCACATGTATCTTGGAGATGATCCTTTTGACAAGGAA
      E L L C R A Y T H M Y L G D D P F D K E
961 GCATAAAGAGAAATTTGGAATGACTCTGCTTTCTCTCTTCTAAACAGAAAACCTTTGGCA
      A *
1021 ACTTCTAGGTTTTCGAGGAATAAGGCCTACTACATCTACTTTGTAGTGGCTGAACCTTTG
1081 TTCAATAAAGGGTGATAACCAGGAGAGTGTTGGTTTAAACAACAAAAAACAACA
1141 AAAAAACAAAAAACATGTC

```

图 2-4 茶树查儿酮异构酶基因全长 cDNA 的核苷酸序列和推测氨基酸序列

Fig. 2-4 Nucleotide and putative amino acid sequences of the chalcone isomerase gene full-length cDNA of tea plant

注: 开放阅读框用下划线标出, 多聚腺苷酸加尾信号用粗体标出。

Note: The open reading frame is underlined. The putative polyadenylation signal is in bold type.

723 bp, 编码 240 个氨基酸, 且在其 3'非编码区内发现了明显的多聚腺苷酸加尾信号。

2.2.3 序列同源性和蛋白质二级结构预测

用 NCBI 上的 Blast N 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行序列同源性搜索, 由于儿茶素类物质在其它植物中的含量不高, 且其它植物关于这类物质的研究也相对较少, 因此在 NCBI

比对上的序列并不多，但对比上序列的相似性却很高，例如其与番茄 CHI 的核苷酸序列相似性就高达 82%。然后利用 DNATool (<http://www.crc.dk/dnatools/>)软件对其编码的蛋白质进行预测，分子量为 26.4 kD，*pI* 为 5.19，其中疏水残基占 40.4%，亲水残基占 28.3%。用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)软件对该蛋白的 N 端进行分析，没有发现信号肽。利用 PredictProtein (<http://www.cbi.pku.edu.cn/predictprotein/>)软件对 CHI 的二级结构进行预测，显示的结果表明该蛋白包含了 29.17%的 α 螺旋和 24.17%的 β 折叠，且预测该蛋白不是球蛋白。

2.2.4 系统树分析

应用 DNASTar 软件将茶树 CHI 编码的氨基酸序列及从 GenBank 中获取的其他植物 CHI 氨基酸序列进行系统树分析，发现茶树与番茄(*Lycopersicon esculentum*)最先聚类合并，而与其它物种，如烟草(*Nicotiana*)、拟南芥(*Arabidopsis*)等在进化上的亲缘关系则较远(图 2-5)。

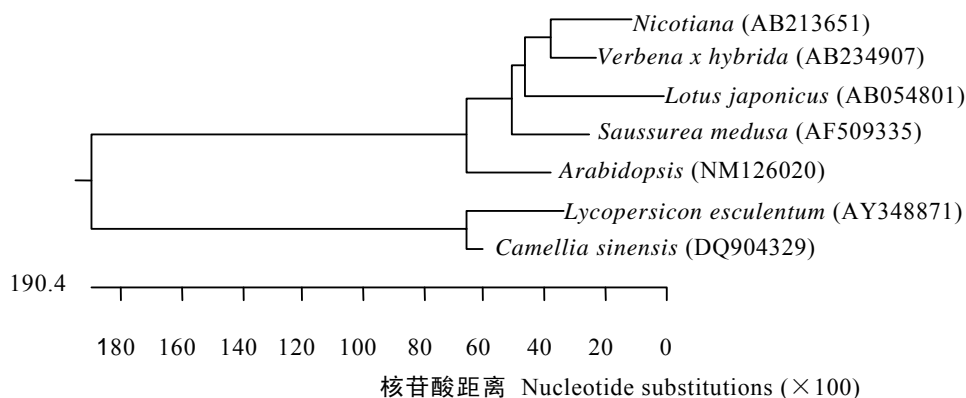


图 2-5 不同植物查儿酮异构酶氨基酸序列的系统树分析

Fig. 2-5 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of CHI in different plants

2.3 讨论

ESTs测序是目前应用很广泛的寻找新基因的手段。在植物中，功能基因序列只占基因组全序列的 2%，所以利用ESTs技术研究功能基因优越性是显而易见的，但其中存在的一个主要问题在于其得到的EST一般并不是基因的全长序列，因此找到一个快速有效的方法克隆cDNA全长就显得尤为重要。而利用以往的方法如筛选cDNA文库、传统的 5'RACE和SMART-RACE方案，通常不是操作较为繁琐、效率较低或者就是需要使用昂贵的试剂盒，同时使用非特异性引物也容易导致非特异性扩增。本实验通过使用 5' 端磷酸化修饰的RT引物进行逆转录，通过T₄RNA连接酶使单链cDNA分子自身环化，再使用两对基因特异引物进行反向巢式PCR。由于使用基因特异引物进行扩增(图 2-6)，减少了其他方案使用非特异性引物带来的非特异性扩增；且相对于昂贵的SMART-RACE试剂盒，该方案也显得较为经济。

实验中发现，用于 RACE 扩增的引物设计非常重要，不合适的引物很容易产生弥散、无扩增条带或扩增出非目的片段。而序列长、GC 含量高的引物扩增的特异性则较好。因此，进行引物设计时，选择 GC 含量高的区域，引物长度大于 26 个碱基进行 PCR 的扩增，效果较好。

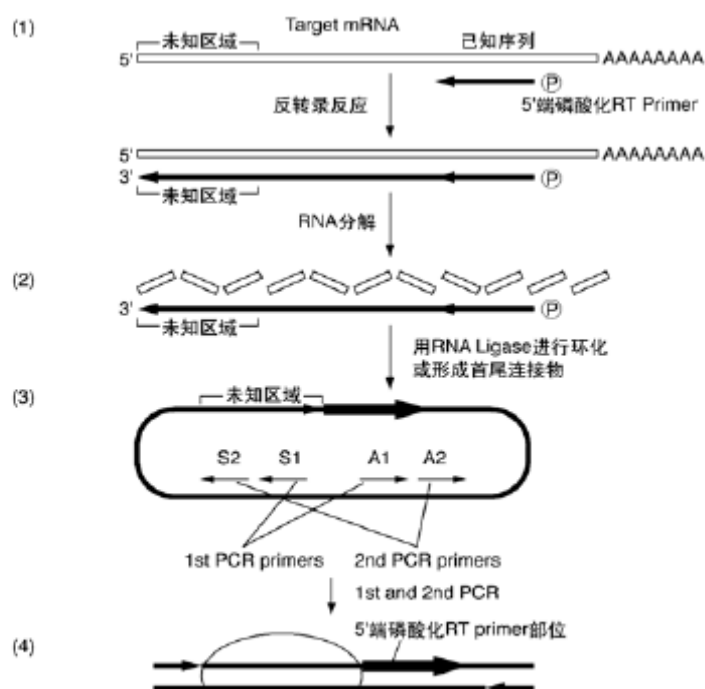


图 2-6 5'RACE 的主要程序

Fig.2-6 Summary of the 5'RACE system procedure

茶叶含有许多重要的次生代谢产物，其中儿茶素因其较强的抗氧化作用而越来越受到人们的重视。儿茶素又称茶单宁，和咖啡因同属茶叶中的两大重要机能性成分，自发现以来，一直被作为茶叶的主要品质成分广为研究。罗一帆等(2005)和何小解等(2006)应用化学发光方法检测了儿茶素对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除能力，结果表明 EGCG 对自由基清除率影响是最大和最显著的，且其清除超氧阴离子自由基和羟自由基的能力明显优于甘草提取物、迷迭香提取物、银杏叶提取物等。另外，Liang 等(1999)和 Bhatia 等(2000)对儿茶素的抗肿瘤作用进行了研究，发现 EGCG 能诱导肿瘤细胞周期发生阻滞，进而起到抗肿瘤的作用。Siddiqui 等(2004)研究也证实了 EGCG 对 PI3K 构体活化和 Erk1/2 途径有调节作用，发现儿茶素能降低 DU145 和 LNCaP 细胞的 PI3K 和 phospho-Akt 的水平，增加 Erk1/2 活性，提高抗癌作用。最近，李常应等(2006)又研究了绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)诱导人胃癌细胞裸鼠移植瘤凋亡及分子机制，结果显示，EGCG 对移植瘤生长也有明显抑制作用。因此，如何培育高儿茶素的茶树品种一直是茶叶工作者思考的问题，但由于受自身特性的限制，茶树育种一直存在效率低、速度慢等问题，因此分离克隆与茶树品质相关的重要基因，如查儿酮异构酶基因，将为以后利用转基因技术实现定向育种打下基础。

第三章 茶树黄酮醇合成酶基因克隆、序列分析及原核表达

黄酮醇类化合物广泛的分布于多种植物中。研究表明,它是几种与细胞内信号传导和细胞转化有关激酶的抑制剂,具有多种生物活性,由于它们能够有选择地阻断细胞内信号传导通路,因此黄酮类化合物被认为是治疗肿瘤的潜在的化合物(Agullo et al, 1997)。目前已在茶叶中分离出3种主要的黄酮醇,分别是山奈素、槲皮素和杨梅素。其中槲皮素被认为具有广泛的药用价值,近年来随着对槲皮素抗肿瘤作用机制研究的不断深入,发现槲皮素可通过抑制肿瘤细胞MMP-2、MMP-9及vEGF、vFGF的表达,从而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移(Ma et al, 2004)。

茶叶中的黄酮醇多与糖结合形成黄酮苷类物质,由于结合的糖的种类不同连接位置不同,因而形成各种各样的黄酮醇苷,它们是茶叶水溶性黄色素的主体,被认为是绿茶汤色的重要组分。目前为止,茶多酚代谢过程中的许多重要酶都已经被克隆,如PAL、CHS、F3H、DFR、ANR和ANS等,而茶树黄酮醇合成酶全长基因的分离克隆还处于空白状态。本试验采用EST测序技术和RT-PCR技术克隆了茶树黄酮醇合成酶的全长基因,并对其进行了原核表达研究,为利用基因工程手段调控茶树黄酮类物质的生物合成打下基础。

3.1 材料和方法

3.1.1 材料

同 2.1.1 材料

3.1.2 主要试剂和溶液

RNA提取的Trizol试剂购自GibcoBRL公司;DNA分子量标准、*Escherichia coli* TG1和*E.coli* BL21(DE3)pLysS 菌株购自北京鼎国生物技术有限责任公司;质粒pET-32a(+)购自Novagen, Inc.;限制性内切酶*Kpn* I、*EcoR* I 和*Taq* polymerase 均购自宝生物工程(大连)有限公司;Super script II RT购自Invitrogen公司;多功能DNA纯化回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

PBS Buffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄。

2×SDS-PAGE Loading Buffer: 100 mM Tris-HCl(pH 6.8), 20 %甘油, 4 % SDS, 200 mM 二硫苏糖醇(DTT), 0.2 %溴酚蓝。

5×Tris-Glycine Buffer: 称取15.1 g的Tris, 94 g的Glycine, 5 g的SDS, 加去离子水定容至1 L后室温保存。

Solution I (质粒提取): 25 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, 高温高压灭菌后4℃保存。

Solution II (质粒提取): 量取50 mL的10% SDS, 50 mL的2 N NaOH, 加灭菌水定溶至500 mL, 溶液最好现用现配, 混匀后室温保存。

Solution III(质粒提取): 称取147 g的乙酸钾, 加57.5 mL的冰乙酸, 加去离子水定溶至500 mL, 高温高压灭菌后4℃保存。

Ampicillin(100 mg/mL): 称取1 g的Ampicillin粉末, 加10 mL的无菌水溶解, 用0.22 μm过滤膜

除菌，分装后-20℃保存。

Chloramphenicol(100 mg/mL): 称取1 g的Chloramphenicol粉末，加10 mL的乙醇，用0.22 μm过滤膜除菌，分装后-20℃保存。

LB 液体培养基(含氨卞青霉素)(1L): 蛋白胨 10 g, 酵母 5 g, NaCl 5 g, 氨卞青霉素终浓度为 50 μg/mL, 高温高压灭菌。

LB 液体培养基(含氯霉素)(1L): 蛋白胨 10 g, 酵母 5 g, NaCl 5 g, 氯霉素终浓度为 50 μg/mL, 高温高压灭菌。

LB 固体培养基(1L): 蛋白胨 10 g, 酵母 5 g, NaCl 5 g, 琼脂糖 15 g, pH7.0 高温高压灭菌。

3.1.3 引物设计

对本实验室保存的 EST 库中编号 TL003D05 和编号 TL011B09 的克隆进行双向测序，得到了两条黄酮醇合成酶的 EST 片段，利用 NCBI 上的 BlastN 软件对得到的两条 EST 片段进行序列同源性搜索，发现其可能分别是黄酮醇合成酶基因的 3' 端和 5'端，因此根据这两条片段设计了一对引物，扩增其中间序列。引物序列分别为：FLS(S1): 5'- TGA TCT CCC TCT CTC AAC CAC AC -3'; FLS(A1): 5'- CAT AGA CTT TTC CAA TGC CAA CC -3'，由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

3.1.4 cDNA 合成及 PCR 扩增

- 1) 以总 RNA 为模板，反转录合成 cDNA，反应体系如下：

Total RNA(约2μg)	2 μL
Oligo(dT) ₁₈ (0.5 μg/μL)	1 μL
dNTPMix(10 mmol/L each)	0.5 μL
RNase Free dH ₂ O	2.5 μL
Total	6 μL

- 2) 将上述混合液 65℃水浴 5 min，取出放置于冰上，瞬间离心收集到管底；
 3) 加入 5×First-Strand Buffer 2 μL，0.1 M 的 DTT 1 μL，移液枪轻轻混匀，42℃水浴 2 min；
 4) 在混合液中加入 0.5 μL 的 super script II RT(200 U/μL)，移液枪混匀，42℃水浴 50 min，再移置 70℃水浴 15 min 结束后，反应结束后-20℃保存备用；
 5) 将得到的 cDNA 稀释十倍，以其为模板进行 PCR 反应，反应体系如下：

10× PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2 μL
dNTPs (10 mmol/L each)	0.4 μL
cDNA 第一链	0.4 μL
Primer FLS(S1)(10 pmol/μL)	0.2 μL
Primer FLS(A1)(10 pmol/μL)	0.2 μL
Taq polymerase (5 U/μL)	0.2 μL
ddH ₂ O	16.6 μL
Total	20 μL

6) 反应在 MJ-PTC220 型 PCR 仪(MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA)上进行, 反应条件为:

94°C	3 min	
94°C	45 s	} 35 Cycles
54°C	45 s	
72°C	45 s	

扩增产物在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测。

3.1.5 PCR 产物的回收、克隆和测序

1) PCR 扩增完毕后, 扩增产物在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测。随后利用多功能 DNA 纯化回收试剂盒按照下面步骤回收目的片段:

- 在长波紫外灯下, 用干净刀片将所需回收的条带切下, 尽量切除不含 DNA 的凝胶, 得到凝胶体积越小越好;
- 将切下含有 DNA 条带的凝胶放入 1.5 mL 离心管, 称重后加三倍体积溶胶结合液 DB;
- 56°C 水浴 10 min, 至胶完全溶解, 期间每 2-3 min 涡旋震荡一次, 以帮助加速溶解;
- 每 100 mg 最初的凝胶重量加入 150 μ L 的异丙醇, 震荡混匀后, 将所得溶液加入吸附柱 AC 中, 12 000 r/min 离心 45 s, 倒掉收集管中的废液;
- 加入 750 μ L 漂洗液 WB, 12 000 r/min 离心 1 min, 再加入 500 μ L 漂洗液 WB, 重复离心 1 min, 弃掉废液;
- 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应;
- 取出吸附柱 AC, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加 50 μ L 洗脱缓冲液, 室温放置 2 min, 12 000 r/min 离心 1 min, -20°C 保存备用;

2) 将纯化的 PCR 产物与载体进行连接

PCR 纯化产物	3 μ L
pTA2 vector(20 ng/ μ L)	1 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
2 \times Ligation buffer	5 μ L
Total	10 μ L, 16°C 过夜

3) 制备 TG1 感受态细胞

- 挑取 TG1 菌单菌落于 10 mL LB 液体培养基中培养, 37°C 培养过夜;
- 取 100 μ L 转接到 10 mL LB 液体培养基中, 37°C 培养 2-3 hr, 到对数生长期, 取出后将菌液分装到 1.5 mL 的离心管中, 冰上放置 5-10 min;
- 4°C 4 000 r/min 离心 1 min, 倒去上清液, 用 150 μ L 0.1M CaCl_2 悬浮细胞, 冰上放置 3-5 min 后, 4 000 r/min 离心 1 min, 去掉上清;
- 重复一次, 用 50 μ L 的 0.1M CaCl_2 悬浮细胞, 获得感受态细胞, 迅速放于 -70°C 保存。

4) 转化

- 5 μ L 连接产物与 50 μ L 的感受态细胞混合均匀, 冰上放置 30 min;

- b) 在 42℃ 的恒温水浴锅热激 60 s;
- c) 迅速取出放置于冰上 5 min;
- d) 加入 700 μL 的 LB 液体培养基, 37℃ 摇床 190 r/min 培养 1.5 hr;
- e) 取出, 在室温下 4 000 r/min 离心 5 min, 然后吸去 600 μL 上清液, 用剩余的培养基悬浮细胞, 获得转化产物;
- f) 将转化产物均匀涂布在已经涂好 X-gal(100mg/mL 8 μL)和 IPTG(100mg/mL 20 μL)的 LB/Amp 的平板上, 37℃ 培养箱过培养过夜。蓝白斑筛选, 随机挑取带有 DNA 插入片段的菌斑送杭州华大基因研发中心测序。

3.1.6 原核表达引物设计

根据拼接得到的黄酮醇合成酶基因全长序列设计了一对特异引物, 并根据需要在其中加入了酶切位点和保护碱基, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列如下:

PET-FLS(S1): 5'- GGG GTA CCA TGG AGG TAG AGA GAG TGC -3'

Kpn I 位点

PET-FLS(A1): 5'- CCG GAA TTC TTA TTG TGG AAT CTT ATT G -3'

*Eco*R I 位点

3.1.7 原核表达载体的构建

- 1) 以上面得到的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应体系如下:

10× PCR Buffer(Mg ²⁺ free)	5 μL
Mgcl ₂ (25mmol/L)	3 μL
dNTPs (10 mmol/L each)	1 μL
cDNA 第一链	1 μL
PET-FLS(S1)(10 pmol/ μL)	0.5 μL
PET-FLS(A1)(10 pmol/ μL)	0.5 μL
<i>Taq</i> polymerase (5 U/ μL)	0.5 μL
ddH ₂ O	38.5 μL
Total	50 μL

- 2) 反应在 MJ-PTC220 型 PCR 仪上进行, 反应条件为:

94℃	3 min	
94℃	45 s	} 35 Cycles
54℃	45 s	
72℃	45 s	

扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

- 3) 因检测结果表明扩增产物为单一条带, 故直接用多功能 DNA 纯化回收试剂盒按照下面步骤回收 PCR 产物:

- a) 取 100 μL 扩增产物, 加入 500 μL 溶胶结合液 DB, 充分混匀;

- b) 将上述所得溶液加入吸附柱 AC 中，室温放置 1 min，12 000 r/min 离心 45 s，倒掉收集管中的废液；
- c) 加入 750 μ L 漂洗液 WB，12 000 r/min 离心 1 min，再加入 500 μ L 漂洗液 WB，重复离心 1 min，弃掉废液；
- d) 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12 000 r/min 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应；
- e) 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50 μ L 洗脱缓冲液，室温放置 2 min，12 000 r/min 离心 1 min，-20℃ 保存备用。
- 4) 将回收的 PCR 产物用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切，反应体系如下：
- | | |
|-------------------------------|--------------|
| 10× M Buffer | 5 μ L |
| 回收的 PCR 产物 | 30 μ L |
| <i>Kpn</i> I(10 U/ μ L) | 1.5 μ L |
| <i>Eco</i> R I(15 U/ μ L) | 1 μ L |
| RNase Free dH ₂ O | 12.5 μ L |
| Total | 50 μ L |
- 混匀混合液后，37℃ 水浴 3h，加 5 μ L 10× Loading Buffer 停止反应，1.2%的凝胶电泳,并回收酶切条带，方法同 3.1.5 PCR 产物的回收；
- 5) 用同样的酶双酶切表达载体 pET-32a(+), 反应体系如下：
- | | |
|-------------------------------|--------------|
| 10× M Buffer | 4 μ L |
| PET32a+)(1 μ g/ μ L) | 1 μ L |
| <i>Kpn</i> I(10 U/ μ L) | 1.5 μ L |
| <i>Eco</i> R I(15 U/ μ L) | 1 μ L |
| RNase Free dH ₂ O | 32.5 μ L |
| Total | 40 μ L |
- 混匀混合液后，37℃ 水浴 3 h，加 5 μ L 10× Loading Buffer 停止反应，1.2%的凝胶电泳,并回收酶切条带，方法同上；
- 6) 将回收的 DNA 片段与经同样酶切的原核表达载体 pET-32a(+)连接，二者以 6: 1 的摩尔比混合，反应体系如下：
- | | |
|-----------------------------|------------|
| 10×Ligation buffer | 2 μ L |
| 预制的 PET32a+)(30ng/ μ L) | 4 μ L |
| 预制的目的基因插入片段(10ng/ μ L) | 12 μ L |
| 10 mmol/L ATP | 1 μ L |
| T ₄ DNA ligase | 1 μ L |
| Total | 20 μ L |
- 用小枪头混匀混合液，16℃ 过夜连接；
- 7) 将连接产物转化感受态的大肠杆菌 TG1，采用含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的培养基筛选重组体。方法同 3.1.5 PCR 产物的回收、克隆和测序；
- 8) 分别挑取八个转化菌落于 1 mL LB 液体培养基中，37℃ 培养过夜，以菌液为模板 PCR 筛选阳

性克隆，反应体系如下：

10× PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2 μL
菌液	1 μL
dNTPs (10 mmol/L each)	0.4 μL
M13 上游引物(10 pmol/μL)	0.2 μL
M13 下游引物(10 pmol/μL)	0.2 μL
Taq polymerase (5 U/μL)	0.2 μL
ddH ₂ O	16 μL
Total	20 μL

混和均匀后，放入 PCR 仪中进行扩增，参数如下：

95℃预变性 3 min，95℃变性 45 s，54℃退火 45 s，72℃延伸 1 min，35 个循环，最后 72℃延伸 10 min，跑 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测结果，将得到的阳性克隆命名为 pET-FLS。

3.1.8 重组质粒的双酶切和 PCR 鉴定

1) 提取重组质粒：

- 从培养基上挑取阳性克隆，接种至 10 mL 的 LB(含氨苄青霉素终浓度为 50 μg/mL)液体培养基中，37 度培养过夜；
- 取 1mL 的过夜培养液，12 000 r/min 离心 2 min，弃上清，尽量吸干培养液
- 将细菌沉淀重悬于 100 μL 的 solution I 中，剧烈震荡；
- 加 200 μL 新配制的 solution II 于细菌悬液中，快速颠倒离心管 5-6 次，混合内容物，使菌体充分裂解，形成透明溶液，切勿振荡，此步骤时间不宜过长，5 min 为好；
- 加 150 μL 用冰预冷的 solution III，反复颠倒数次，使溶液 3 在粘稠的细菌裂解物中分散均匀，之后将管置于冰上 3-5 min,12 000 r/min 离心 5 min；
- 将上清吸出，转移至另一离心管中，加等体积的酚：氯仿抽提，振荡混匀有机相和水相，12 000 r/min 离心 2 min，将上清转移到另一离心管中；
- 用 2 倍体积的乙醇于室温沉淀核酸，振荡混合，室温放置 2 min，然后 12 000 r/min 离心 5 min，沉淀 DNA；
- 倒掉上清，加入 300 μL 70%乙醇，4 000 r/min 离心 5 min，用 20μL 水重新溶解质粒 DNA，-20℃保存备用；

2) 用 Kpn I 和 EcoR I 双酶切重组质粒 pET-FLS，反应体系如下：

10× M Buffer	4 μL
重组质粒 pET-FLS	10 μL
Kpn I(10 U/μL)	1.5 μL
EcoR I(15 U/μL)	1 μL
RNase Free dH ₂ O	13.5 μL
Total	30 μL

混匀混合液后，37℃水浴 3 h，加 5 μL 10× Loading Buffer 停止反应，1.2%的凝胶电泳检测结

果;

- 3) 以提取的重组质粒 pET-FLS 为模板, PET-FLS(S1)和 PET-FLS(A1)为上下游引物, 进行 PCR 鉴定, 反应条件同 3.1.7 原核表达载体的构建, PCR 产物用 1.2%的凝胶电泳检测。

3.1.9 外源基因的诱导表达

将阳性克隆过夜培养, 提取质粒 DNA 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 随机挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定。挑取经鉴定的阳性克隆单菌落接种至 10 mL 含氨苄青霉素终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振荡培养过夜。后按 1 %(V/V)接种量转接到 10 mL LB 培养基中(Amp 100 $\mu\text{g/mL}$), 振荡培养至 OD600 达 0.6(约 3 h), 加 IPTG 至终浓度为 1mM 以诱导外源基因表达。分别取诱导 1 h、2 h、3 h、4 h 和过夜的菌液 1 mL, 4 000 r/min 离心 5 min 去除上清。后用 100 μL 的 PBS 重悬沉淀, 4 000 r/min 离心 2min 收集菌体, 加 100 μL SDS 凝胶加样缓冲液后剧烈振荡悬浮沉淀, 煮沸 10 min 后用 12%的 SDS-PAGE 胶电泳检测结果。

3.2 结果和分析

3.2.1 RNA 质量

提取的总RNA经紫外分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8-2.0 之间。电泳检测条带清晰(图 3-1), 说明RNA质量良好, 可以用于进一步试验。

3.2.2 PCR 扩增结果和 cDNA 全长的获得

PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测, 在900 bp左右处有一条清晰的带(图3-2)。将带有DNA插入片段的克隆菌送杭州华大基因研发中心测序后, 将得到的序列与原有的两条EST拼接, 得到一条长1 317 bp的序列(图 3-3), 已在 GenBank 登录, 登录号为 EF205150。用 OFR 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对序列进行分析, 最后确定其开放阅读框长996 bp, 编码331个氨基酸, 且在其3'非编码区内发现了明显的多聚腺苷酸加尾信号。

3.2.3 序列同源性和蛋白质二级结构预测

将根据其开放阅读框所推测的蛋白序列通过 BLASTP 搜索, 发现其与多种植物的氨基酸序列具有较高的同源性, 其中与洋葱(*Allium cepa*)和温州蜜柑(*Citrus unshiu*)的同源性分别为 71%和 70%, 与葡萄(*Vitis vinifera*)的同源性最高, 为 87%。

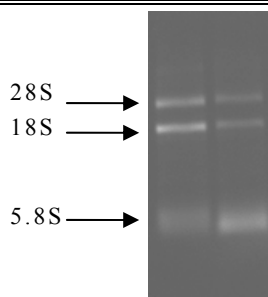


图 3-1 RNA 电泳结果
Fig.3-1 Electrophoresis results
of RNA

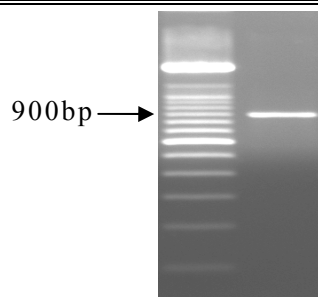


图 3-2 RT-PCR 扩增产物的电泳结果
Fig. 3-2 Electrophoresis results of
RT-PCR

```

1 GGGGAAACAAGTTCCAAGCACATTCTAAAGGAACCAACCAAAAAATAGAAACAATTAAACA
62 AACATGGAGGTAGAGAGAGTGAAGCC CTGTCC CAT GTA ACT CTC CATGAGCTC CCTGCA
    M E V E R V Q A L S H V T L H E L P A
122 AAA TTTATCCGACCG GTCCAC GAGCAACCGGAGAACAGCAAGGCTATC GAAGGTGTC ACC
    K F I R P V H E Q P E N S K A I E G V T
182 GTCCCCGTGATC TCCCTCTCT CAA CCACAC GAT GTGGTG GTC GATGCA TTA TCA AAGGCT
    V P V I S L S Q P H D V V V D A L S K A
242 TGTAGTGAA TGG GGATTT TTC CTC ATCACG GATCAC GGTGTC GAGCCCTCGTT GATC GGA
    C S E W G F F L I T D H G V E P S L I G
302 CGGCTA AAAGAGGTT GGGGAGGAGTTC TTT AACCTC CCACAGAAGGAGAAAGAGAGCTAT
    R L K E V G E E F F N L P Q K E K E S Y
362 GCA AAT GAT CCT TCAAGTGGGAGTTTTGAAGGG TAT GGA ACGAAG ATG ACT AAAAATTTT
    A N D P S S G S F E G Y G T K M T K N F
422 GAT GAGAAA GTTGAG TGGATT GAT TAT TAT TTT CAC GTC ATG CAC CCT CCT AAGAAGCTC
    D E K V E W I D Y Y F H V M H P P K K L
482 AAT CTT GAC ATG TGGCCTAAG AAC CCTTCT TCATAC AGG GGAGTGACA GAG GAA TAC AAT
    N L D M W P K N P S S Y R G V T E E Y N
542 GTGGAAATAATG AGAACAACCAACAAG TTA TTT GAA CTT CTC TCA GAG GGA CTA GGT TTG
    V E I M R T T N K L F E L L S E G L G L
602 GATGGG AAGGTT TTG AGT TCT TCT TTG GGT GGT GAT GAA ATTGAA TTTGAA ATGAAA ATC
    D G K V L S S S L G G D E I E F E M K I
662 AAC ATG TAC CCACCA TGCCCAACAACCT CAGCTCGCC CTCGGA GTT GAACCT CAC ACTGAC
    N M Y P P C P Q P Q L A L G V E P H T D
722 ATG TCT GCT CTC ACTTTA CTT GTC CCC AATGAC GTTCCCGGT CTT CAA GTT TGG AAA GAC
    M S A L T L L V P N D V P G L Q V W K D
782 GGT AAT TGG GTA GCT GTC AAT TAC TTG CCAAATGCA CTC TTC GTC CATGTTGGT GAT CAA
    G N W V A V N Y L P N A L F V H V G D Q
842 CTTGAG GTACTAAGC AATGGT AAGTAC AAG AGT GTTCTT CACAGGAGT TTG GTG AAC AAA
    L E V L S N G K Y K S V L H R S L V N K
902 GAAAGGACAAGAATG TCT TGG GCT GTG TTTGTC GTG CCTCCT CAT GAAGCAGTG ATT GGA
    E R T R M S W A V F V V P P H E A V I G
962 CCTCTTCCA GAG CTC ATT GAT GAG AAA AACCCAGCAAAA TATTCAACC AAA ACA TAT GCT
    P L P E L I D E K N P A K Y S T K T Y A
1022 GAGTACCGT CAT CGCAAA TTC AAT AAG ATTCCACAA TAA TTG CAT TTT ATT GAG CTG AGA

```

E Y R H R K F N K I P Q *

1082 GGTGG CAT TGG AAA AGT CTA TGC TGG TTC TCG ATA TTA ATA TGT CTG TTT TGT CCC AGT
 1142 TCCACTCAA GTATGATTG TGC CTC TAC AGA GGG AAC TTT CAG GAT TTG TGG GTA CAG AAT
 1202 TGT TTC TGG TTC AGT TCA TCT ATT GCT TTT GCT GAG AAA TTA TCT TCA TTA CAG TCC AAT
 1262 GTA TTG TAC CCC CTG AAT GTT TCT TAA ATA AGA TTA TTT CTA TTA TTC AGT TGA AA

图 3-3 茶树黄酮醇合成酶基因全长 cDNA 的核苷酸序列和推测氨基酸序列

Fig.3-3 Nucleotide and putative amino acid sequences of the flavonol synthase gene full-length cDNA of tea plant

注:开放阅读框用下划线标出,多聚腺苷酸加尾信号用粗体标出。

Note: The open reading frame is underlined. The putative polyadenylation signal is in bold type.

利用CLUASTAL W(Thompson et al, 1994)算法将比对上序列的氨基酸序列联配分析(图3-4),发现黄酮醇合成酶的氨基酸序列较为保守,其保守区可能对其结构和功能有着重要的意义。利用DNATool软件对其编码的蛋白质进行预测,分子量为37.5 kD, pI为5.80,其中疏水残基占43.5%,亲水残基占29.0%,碱性氨基酸占13.9%,酸性氨基酸13.6%。用SignalP软件对该蛋白的N端进行分析,没有发现信号肽。利用PredictProtein软件对FLS的二级结构进行预测,显示的结果表明该蛋白包含了27.5%的 α 螺旋和18.7%的 β 折叠。

3.2.4 系统树分析

应用 DNASTar 软件将茶树 FLS 编码的氨基酸序列及从 GenBank 中获取的其他植物 FLS 氨基酸序列进行系统树分析,发现茶树与葡萄(*Vitis vinifera*)最先聚类合并,而与其它物种,如高杯花(*Nierembergia*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)等在进化上的亲缘关系则较远(图 3-5)。

3.2.5 黄酮醇合成酶基因的 PCR 与酶切鉴定

对重组质粒进行 *Kpn* I 和 *Eco*R I 的双酶切鉴定(图 3-6),切出片段与预期片段大小一致。同时 PCR 鉴定的结果也显示扩增出的条带与预期片段大小一致,因而证明已成功地构建了 PET-FLS 原核表达载体。

3.2.6 外源基因的诱导表达

用表达载体pET-FLS转化表达宿主菌,并用IPTG诱导其表达,结果可产生分子量约为61 kD特异性融合蛋白,而对照不表达该蛋白,蛋白质凝胶电泳如图3-7所示。除去23 kD的融合标签(其中含有6个组氨酸接头和109个氨基酸组成的硫氧还蛋白TrxA),由此可推算出实际诱导表达的茶树黄酮醇合成酶成熟蛋白的分子量约为37 kD,与理论值一致。从图中还可以看出,随着诱导时间的延长,表达的融合蛋白的量逐渐增加,诱导约4 h时达到最大。

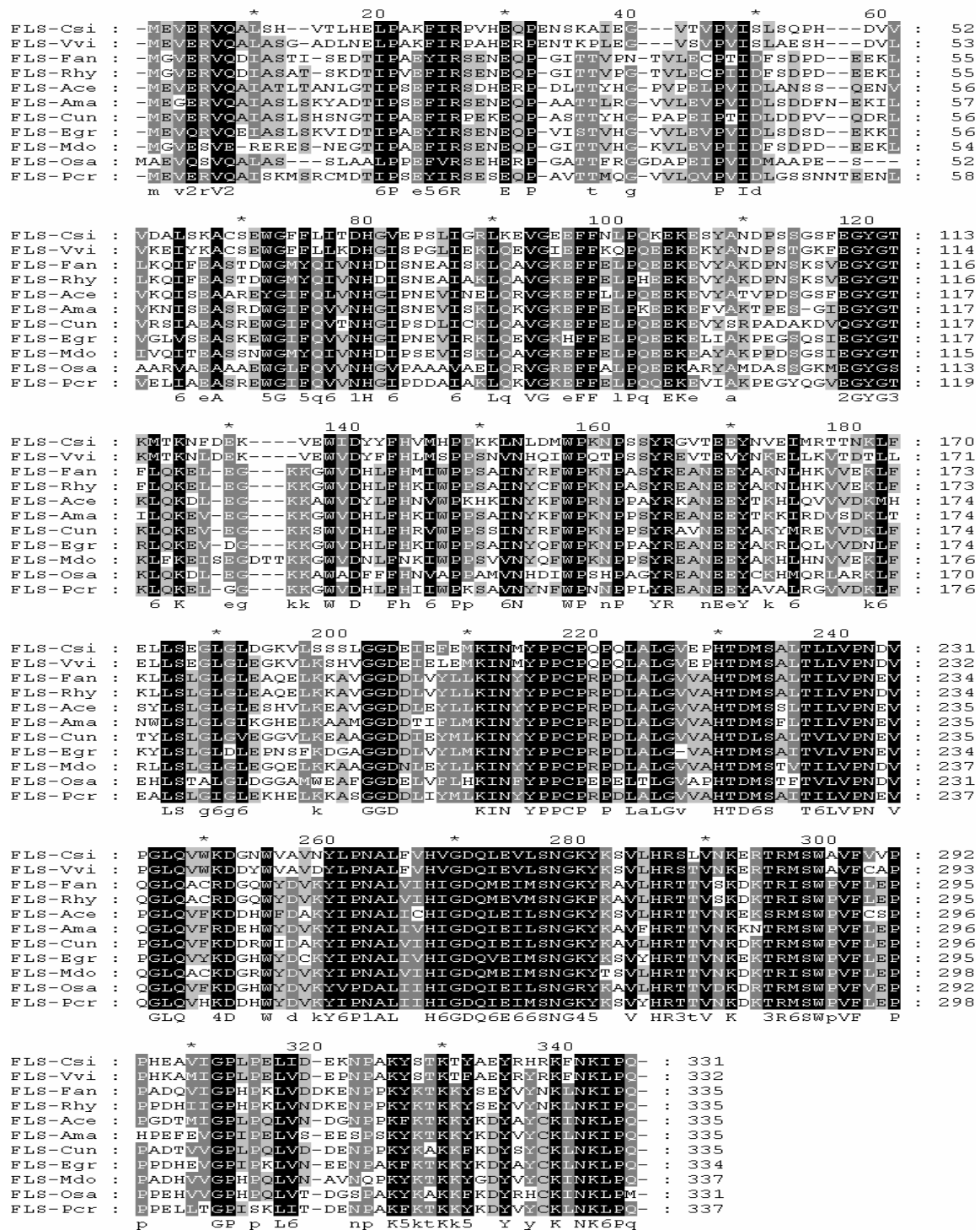


图 3-4 茶树黄酮醇合成酶蛋白序列与其它植物同源蛋白序列的多序列联配

Fig.3-4. Alignment of deduced amino acid sequences of tea plant LAR and that of other plants

注：黑色和灰色分别表示氨基酸的相似性,物种名和GenBank登录号如下所示

Note: Black and gray shading boxes show identical and similar amino acids, respectively.

GenBank accession numbers are as follows: FLS-Csi, *Camellia sinensis*(EF205150); FLS-Vvi, *Vitis vinifera*(BAE75810); FLS-Fan, *Fragaria ananassa*(ABH07784); FLS-Rhy, *Rosa*(BAC66468); FLS-Ace, *Allium cepa*(AAT68476); FLS-Ama, *Antirrhinum majus*(ABB53382); FLS-Cun, *Citrus unshiu*(BAA36554); FLS-Egr, *Eustoma grandiflorum*(AAF64168); FLS-Mdo, *Malus domestica*(AAX89401); FLS-Osa, *Oryza sativa*(XP_467968); FLS-Pcr, *Petroselinum crispum*(AAP57395)

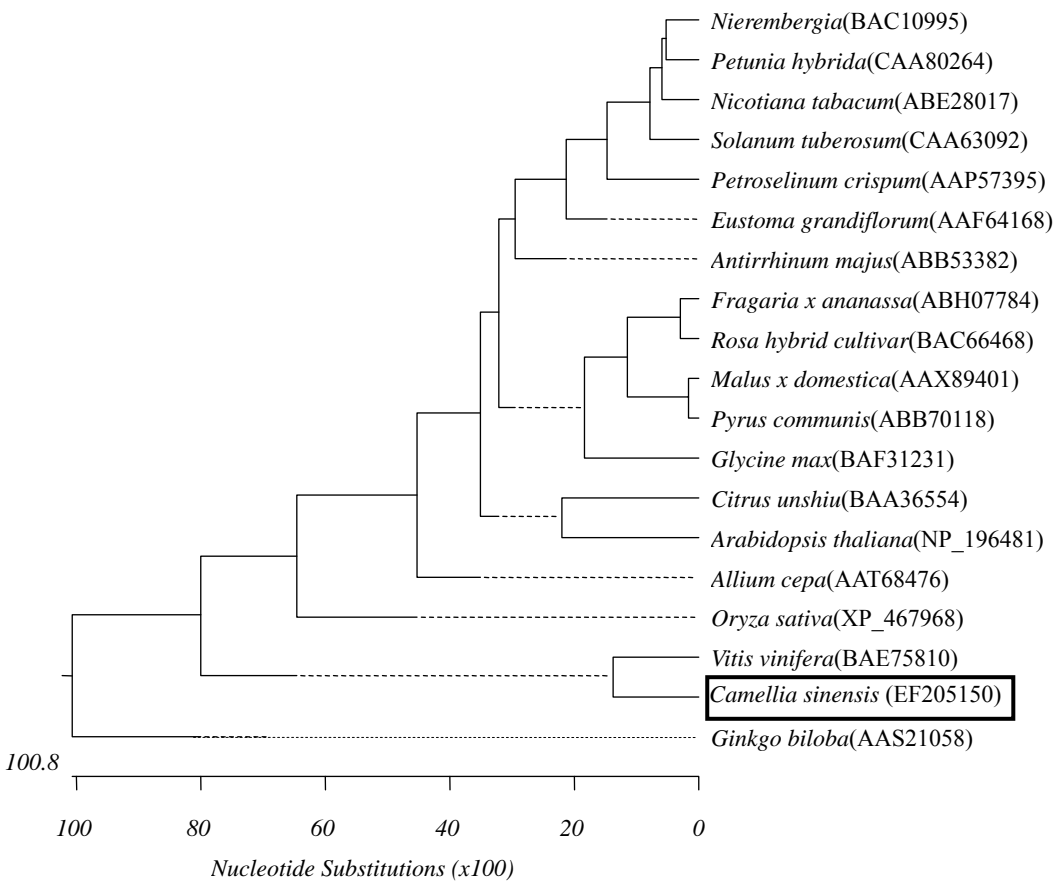


图 3-5 不同植物黄酮醇合成酶氨基酸序列的系统树分析

Fig. 3-5 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of CHI in different plants

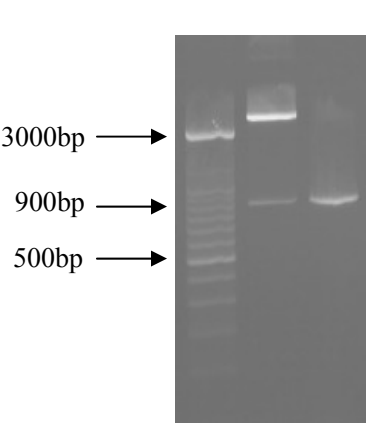


图 3-6 双酶切和 PCR 鉴定电泳结果

Fig.3- 6 Electrophoresis results of digestion with restriction enzyme and PCR

注：1. DNA标准分子量；2.重组质粒双酶切产物；3. 重组质粒PCR产物

Note: 1. DNA marker; 1. Products of recombinant plasmids digested by Kpn I and EcoR I; 2. PCR product of recombinant plasmids.

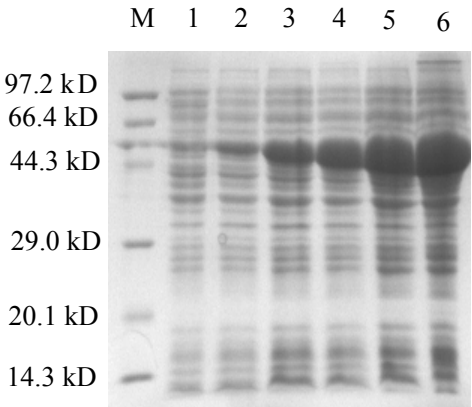


图 3-7 重组质粒 PET-FLS 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.3-7 SDS-PAGE analysis of expressed product of recombinant PET-FLS

注：M. 蛋白质标准分子量；1. 对照；2. PET-FLS诱导1h；3. PET-FLS诱导2 h；4. PET-FLS诱导3 h；5. PET-FLS诱导4 h；6. PET-FLS诱导过夜

Note: M, protein marker; 1, control; 2, PET-FLS induced for 1 h; 3, PET-FLS induced for 2 h; 4, PET-FLS induced for 3 h; 5, PET-FLS induced for 4 h; 6, PET-FLS induced for overnight

3.3 讨论

茶叶含有许多重要的次生代谢产物，其中儿茶素和黄酮醇类化合物更是由于其独特的药用价值而受到重视。黄酮醇类化合物与儿茶素的主要合成途径享有共性，因而具有相似的合成机制，黄酮醇合成酶作为黄酮醇类合成途径与儿茶素合成途径的桥梁，在植物中非常保守，能够在植物的花色和雄性不育中起作用(Forkmann and Martens, 2001)。多种植物的广泛研究表明，该生物合成途径受到决定主要产物的一系列结构和调控基因的严格限制(Mamati and Liang, 2005)。例如在植物的花冠、球茎与花药的发育过程中查尔酮异构酶与查尔酮合成酶两种酶的积累与消失受光调控和紫外辐射诱导，并存在协同性(Tunen et al, 1988)。近几年，随着反义RNA技术的成熟，利用其调控黄酮类化合物的生物合成途径的报道也越来越多(Aida et al, 2000)。Verhoeyen等(2002)将矮牵牛CHI在番茄中超表达，使得转基因番茄果皮中黄酮类含量增加了78倍、果肉中黄烷醇增加了21倍，Nielsen等(2002)利用基因沉默技术抑制FLS基因，使花卉颜色由紫色变为了红色，并能稳定遗传。这也为我们从分子角度入手来改良茶树品种提供了一种思路。因此分离和克隆重要的茶树功能基因，无论是对揭示茶树优质、高产和抗逆的分子机理，还是采用基因工程技术进行茶树遗传调控都具有其现实意义。

本实验利用生物信息学的分析方法与RT-PCR技术相结合，获得了茶树黄酮醇合成酶基因的全长序列。进一步克隆至表达载体pET-32a(+)中，然后转入大肠杆菌BL21 中进行表达，构建所得PET-FLS工程菌在IPTG诱导下，表达出一条约 61 kD融合蛋白。由此可以推测出，表达的黄酮醇合成酶的分子量约为 37kD，与根据cDNA序列所预测蛋白质分子量的理论值基本一致。利用BandScan5.0(<http://www.glyko.com>)软件对图 3-6 进行分析，随着时间的延长，表达蛋白在总蛋白中的含量呈线形增加，诱导 4 h后，表达蛋白就已经达到总蛋白的 45%，而经过过夜诱导的菌液，表达蛋白占到了总蛋白的 60%，此融合蛋白经SDS-PAGE检测为不溶性的包涵体，这为以后大量表达纯化目的蛋白，进一步制备多克隆抗体和研究其功能奠定了良好的基础。

第四章 茶树无色花色素还原酶基因克隆及序列分析与类黄酮合成相关七个基因表达的 RT-PCR 分析

氨基酸、茶多酚(儿茶素)和咖啡碱是茶叶重要的品质成分,其中儿茶素更是因为良好的抗氧化活性而越来越受到重视(Lin et al, 1996; Wang et al, 1989)。儿茶素又称茶单宁,和咖啡因同属茶叶中的两大重要机能性成分,自发现以来,一直被作为茶叶的主要品质成分广为研究。明亚玲等(2005)和宋秀祖等(2003)对儿茶素的抗辐射作用进行了研究,发现EGCG可以对UVB辐射损伤的体外培养细胞起到保护作用。另外,Yu等(2004)研究发现儿茶素与金属离子共存时抑制前列腺癌细胞生长的作用效果显著。随着茶树儿茶素类物质的生物活性功能不断被证实以及在医药领域的良好应用前景,也带动了茶树儿茶素代谢相关基因的分离研究,大多数儿茶素代谢相关酶的基因已经得到了克隆(陆建良等, 2007)。本试验在以获得的茶树无色花色素还原酶EST片段基础上,利用生物信息学的分析方法和3' RACE技术分离得到了茶树无色花色素还原酶的全长基因,为利用基因工程手段调控茶树儿茶素的生物合成打下基础。

另外选取了四个儿茶素含量相差较大的茶树品种,利用半定量 RT-PCR 技术检测了这几个茶树品种之间与类黄酮代谢相关的七个酶的表达情况,以期找到它们之中与儿茶素含量相关性较好的基因,为进一步了解茶树儿茶素合成的反应机制提供理论依据。

4.1 材料和方法

4.1.1 材料

春季龙井 43、乐清青茶、黄桠、绿芽佛手、汝城白毛茶新梢上的一芽二叶,采自中国农业科学院茶叶研究所内国家种质杭州茶树圃,样品采集后用液氮迅速冷冻处理,然后将其保存于-80℃冰箱中备用。

4.1.2 主要试剂和溶液

RNA提取的Trizol试剂购自GibcoBRL公司;DNA分子量标准、*E.coli* TG1菌株购自北京鼎国生物技术有限公司;Super script II RT购自Invitrogen公司;多功能DNA纯化回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

Ampicillin(100 mg/mL): 称取1 g的Ampicillin粉末,加10 mL的无菌水溶解,用0.22 μ m过滤膜除菌,分装后-20℃保存。

LB 液体培养基(含氨卞青霉素)(1L): 蛋白胨 10g, 酵母 5g, NaCl 5g, 氨卞青霉素终浓度为 50 μ g/mL, 高温高压灭菌。

LB 固体培养基(1L): 蛋白胨 10 g, 酵母 5g, NaCl 5 g, 琼脂糖 15 g, pH7.0 高温高压灭菌。

4.1.3 引物设计

对本实验室保存的 EST 库中编号 TL013E05 的克隆进行双向测序,得到了一条无色花色素还

原酶的 EST 片段, 利用 NCBI 上的 BlastN 软件对得到的一条 EST 片段进行序列同源性搜索, 发现其可能是无色花色素还原酶基因的 5' 端, 因此参照 Invitrogen 公司的 3' RACE 试剂盒, 合成了两条通用引物和一条基因特异引物, 扩增其 3' 端序列。引物序列分别为: Adapter Primer(AP): 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'; AbridgedUniversal Amplification Primer(AUAP):5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'; Gene-Specific Primer(GSP):5'-GCT AAA GTT ATT CCT GGT GTT GTC-3';由上海生工生物工程技术有限公司合成。

4.1.4 cDNA 合成及 PCR 扩增

- 1) 以总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA, 反应体系如下:

Total RNA(约2μg)	4 μL
反转录引物AP(50μM)	1 μL
dNTPMix(10 mM each)	1 μL
RNase Free dH ₂ O	6 μL
Total	12 μL

- 2) 将上述混合液 65℃ 水浴 5 min, 取出放置于冰上, 瞬间离心收集到管底;
 3) 加入 5×First-Strand Buffer 4 μL, 0.1 M 的 DTT 2 μL, 移液枪轻轻混匀, 42℃ 水浴 2 min;
 4) 在混合液中加入 1 μL 的 super script II RT(200 U/μL), 移液枪混匀, 42℃ 水浴 50 min, 再移置 70℃ 水浴 15 min 结束后, 反应结束后-20℃ 保存备用;
 5) 将得到的 cDNA 稀释十倍, 以其为模板进行 PCR 反应, 反应体系如下:

10× PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2 μL
dNTPs (10 mmol/L each)	0.4 μL
cDNA 第一链	0.4 μL
AUAP(10 pmol/μL)	0.2 μL
GSP(10 pmol/μL)	0.2 μL
Taq polymerase (5 U/μL)	0.2 μL
ddH ₂ O	16.6 μL
Total	20 μL

- 6) 反应在 MJ-PTC220 型 PCR 仪上进行, 反应条件为:

94℃	3 min	} 35 Cycles
94℃	45 s	
56℃	45 s	
72℃	45 s	

扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

4.1.5 PCR 产物的回收、克隆和测序

- 1) PCR 扩增完毕后, 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。随后利用多功能 DNA 纯化回收

试剂盒回收目的片段，方法同 3.1.5 PCR 产物的回收、克隆和测序；

- 2) 将纯化的 PCR 产物与载体进行连接，并将连接产物转入 TG1 感受态细胞，将转化产物均匀涂布在已经涂好 X-gal(100mg/mL 8 μ L)和 IPTG(100mg/mL 20 μ L)的 LB/Amp 的平板上，37℃培养箱培养过夜，蓝白斑筛选阳性克隆；
- 3) 分别挑取十个转化菌落于 1 mL LB 液体培养基中，37℃培养过夜，以菌液为模板 PCR 筛选阳性克隆，反应体系如下：

10× PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	2 μ L
菌液	1 μ L
dNTPs (10 mmol/L each)	0.4 μ L
M13 上游引物(10 pmol/ μ L)	0.2 μ L
M13 下游引物(10 pmol/ μ L)	0.2 μ L
Taq polymerase (5 U/ μ L)	0.2 μ L
ddH ₂ O	16 μ L
Total	20 μ L

混和均匀后，放入 PCR 仪中进行扩增，参数如下：

95℃预变性 3 min，95℃变性 45 s，54℃退火 45 s，72℃延伸 1 min，35 个循环，最后 72℃延伸 10 min，跑 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测结果；

- 4) 能扩增出目的条带大小的，即为正确插入的阳性克隆，以其为模板，AUAP 和 GSP 为引物 PCR 扩增验证，反应条件同上，并将其交由上海生工测序。

4.1.6 半定量 PCR 引物设计

根据本实验得到的三个基因和已经在 GenBank 上登录的茶树类黄酮代谢相关基因序列，设计了几组引物，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，引物序列如表 4-1：

表 4-1 RT-PCR 引物序列

Table 4-1 Sequences of RT-PCR primers

相关酶名	上/下游引物	产物大小
黄酮醇合成酶(FLS)	5'- AGC CCT GTC CCA TGT AAC TCT CC -3' 5'- ACT CAA AAC CTT CCC ATC CAA AC -3'	535 bp
无色花色素还原酶 (LAR)	5'- ACC AAC TCA CCC TAG TCC ATG CC -3' 5'- CGT CCA ATC TTC TTC TCC CAC A -3'	436 bp
二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR)	5'- GGC TGG TGT TCA CAT CCT CTG C -3' 5'- CCC ATT CCT ATC AAC TTC TTC G -3'	538 bp
查尔酮合成酶(CHS)	5'- GCC GAG AAC AAC AAA GGT G -3' 5'- TGC CCA AAG GCT GGA ATG C -3'	343 bp
黄烷酮 3-羟化酶(F3H)	5'- AGT TGC TGG AGG TGT TGT C -3' 5'- AGC TGG GTT CTG GAA TGT G -3'	377 bp
花青素合成酶(ANS)	5'- GCC CAA GAC ACC AAC CGA C -3' 5'- CTC ACA AAA AAC CGC CCA C -3'	445 bp
花色素还原酶(ANR)	5'- TTA TCA CTG TCA TCC CTA C -3' 5'- ACT TGA AAC TGA ATC CCT C -3'	381 bp

4.1.7 基因表达的 RT-PCR 分析

- 1) 根据儿茶素含量不同，挑选了四个茶树品种，分别提取总 RNA，方法如 2.1.2 总 RNA 的提取；

- 2) 利用 SHIMADZU UV-2550 型紫外-可见分光光度计检测其总 RNA 的吸光值, 并估算其浓度;
- 3) 分别取四个茶树品种总 RNA 各 2 μg 反转录成 cDNA, 方法如 3.1.4 cDNA 的合成;
- 4) 以反转录得到的 cDNA 为模板, β -actin 为内参, PCR 检测类黄酮代谢相关的几个酶在不同品种中的表达差异, 反应体系如下:

10 \times PCR Buffer(Mg^{2+} plus)	2 μL
dNTPs (10 mmol/L each)	0.4 μL
cDNA 第一链	0.4 μL
上游引物(10 pmol/ μL)	0.2 μL
下游引物(10 pmol/ μL)	0.2 μL
Taq polymerase (5 U/ μL)	0.2 μL
ddH ₂ O	16.6 μL
Total	20 μL

混和均匀后, 放入 PCR 仪中进行扩增, 参数如下:

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min, 其中 β -actin 为 25 个循环, 跑 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果;

4.2 结果和分析

4.2.1 PCR 扩增结果和 cDNA 全长的获得

第一次 PCR 电泳结果显示在 1000bp 左右有一条弱带, 但有非特异性扩增干扰, 故将切胶回收的目的片段与 pTA2 载体连接后, 转入 TG1 感受态细胞中扩繁, 然后利用菌液 PCR 的方法筛选

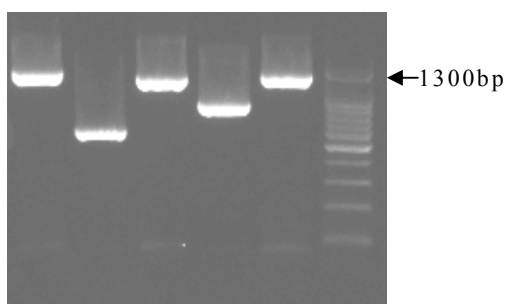


图 4-1 菌液 PCR 的电泳结果
Fig.4-1 Electrophoresis results of PCR

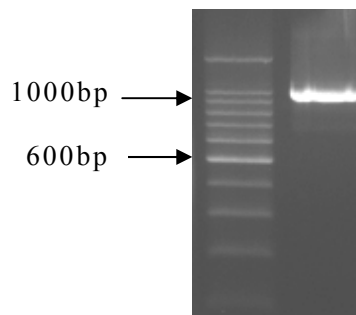


图 4-2 3'RACE 扩增产物的电泳结果
Fig.4-2 Electrophoresis results of 3'RACE

阳性克隆。从图 4-1 可以看到, 在随机挑取的 5 个克隆中的 3 个在 1300bp 左右有目的片段出现, 说明无色花色素还原酶的 3' 端已经插入了载体中。以 AUAP 和 GSP 为引物 PCR 进一步验证, 结果如图 4-2 所示, 在 1000bp 左右处有一条清晰的带。将其送杭州华大基因研发中心测序后, 将得到的序列与原有的 EST 拼接, 并结合测序峰图进行校正, 得到一条长 1301 bp 的序列(图 4-3), 已在 GenBank 登录, 登录号为 EF205148。用 OFR 软件对序列进行分析, 最后确定其开放阅读框长 1029bp, 编码 342 个氨基酸, 且在其 3' 非编码区内发现了明显的多聚腺苷酸加尾信号。

```

1   GGGGGTCTCCAAATATCAAGGACTAGAGGAAGGTACGTAACGAAAAGAATGACTGTGTTG
                                     M   T   V   L
61  GAATCTGTGTCCGCAGCCGGGGGCGGAGTCCTCATCGTTGGAGCCTCCGGTTTC ATTGGC
    E   S   V   S   A   A   G   G   G   V   L   I   V   G   A   S   G   F   I   G
121 CAGTTCATCGCCGAAGCTAGCCTCCATGCTGATCGGCCTACGTACCTTCTCGTCCGATCG
    Q   F   I   A   E   A   S   L   H   A   D   R   P   T   Y   L   L   V   R   S
181 GTTGGCTCTAAAACCAACAAAACCTCTTCAAGACAAAGGCGCTAAAGTTATTCCTGGTGTT
    V   G   S   K   T   N   K   T   L   Q   D   K   G   A   K   V   I   P   G   V
241 GTCAAGGATCAAGCATTCATGGAGAAGATACTAAAAGAGCATAAGATAGATATAGTAATA
    V   K   D   Q   A   F   M   E   K   I   L   K   E   H   K   I   D   I   V   I
301 TCAGCTATTGGTGGTGCTAATACTAGACCAACTCACCTAGTCCATGCCATTAAAGCT
    S   A   I   G   G   A   N   I   L   D   Q   L   T   L   V   H   A   I   K   A
361 GTCGGAACCATCAAGAGGTTTTTGCCATCGGAGTTTGGGCATGACGTTGATAGGGCTAAT
    V   G   T   I   K   R   F   L   P   S   E   F   G   H   D   V   D   R   A   N
421 CCGGTGGAACCAAGGGCTCACCATGTACAACGAAAAGAGGAGGGTGCGGCGATTGATAGAA
    P   V   E   P   G   L   T   M   Y   N   E   K   R   R   V   R   R   L   I   E
481 GAGTGTGGGGTGCCCTACACTTATATCTGCTGCAACTCTATTGCTTCTTGCCATACTAT
    E   C   G   V   P   Y   T   Y   I   C   C   N   S   I   A   S   W   P   Y   Y
541 GACAATACTCACCCATCGGAAGTAATCCCCCTTGGATGAGTTCCAAATTTATGGTGAT
    D   N   T   H   P   S   E   V   I   P   P   L   D   E   F   Q   I   Y   G   D
601 GGCAGTGTCAAAGCATATTTTGTGTCAGGCTCTGATATAGGAAAATTCACCATCAAAACC
    G   S   V   K   A   Y   F   V   A   G   S   D   I   G   K   F   T   I   K   T
661 GTC GAC GAC ATT CGT ACG CTGAACAAATCGGTTTCATTTCCGACCATCCTGCAATTTTCTC
    V   D   D   I   R   T   L   N   K   S   V   H   F   R   P   S   C   N   F   L
721 AACATAAATGAGCTTGCATCTTTGTGGGAGAAGAAGATTGGACGCACTCTCCCCCGAGTC
    N   I   N   E   L   A   S   L   W   E   K   K   I   G   R   T   L   P   R   V
781 ACTGTCTCAGAAAATGACCTACTAGCAGCAGCAGCAGTGAATATAATCCCACGAAGTGTC
    T   V   S   E   N   D   L   L   A   A   A   A   V   N   I   I   P   R   S   V
841 GTTGCATCGTTCACACACGACATTTTCATTAAGGGATGCCAGATTAATTTTCAATTGAA
    V   A   S   F   T   H   D   I   F   I   K   G   C   Q   I   N   F   S   I   E
901 GGTCTTAATGACGTTGAAGTATGCAGCCTCTACCCTGATGAATCGTTCAGGACCGTTGGT
    G   P   N   D   V   E   V   C   S   L   Y   P   D   E   S   F   R   T   V   G
961 GAATGTTTCGATGATTTTGTGTTGAAGATGAATGGGAAGAATTTTACAGATGAGACGGAT
    E   C   F   D   D   F   V   V   K   M   N   G   K   N   F   T   D   E   T   D
1021 GGAAACACTGCCCAGAATCATGTTGTTGAAGTACTTCCCATCACAATGTGTGCTTGA TTT
    G   N   T   A   Q   N   H   V   V   E   V   L   P   I   T   M   C   A   *
1081GAAGAAATATATGTAATTGGACACATCATTATGTGAACCATATCTAATCCATCTATTATT
1141TTTTTTATGGCAACAATTTTATTCAATAAAATTGGGAGTCAATTCGTTGCCTATTATTTA
1201TGATTTTATTTTGAACCTATCTCAATGTATTGTTTCAGTGGAAGAAAAATTGGCGTTTCG
1261AATTCTGAAAATGAATTTATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 4-3 茶树无色花色素还原酶基因全长 cDNA 的核苷酸序列和推测氨基酸序列

Fig.4-3 Nucleotide and putative amino acid sequences of the LAR gene full-length cDNA of tea plant

注:开放阅读框用下划线标出,多聚腺苷酸加尾信号用粗体标出。

Note: The open reading frame is underlined. The putative polyadenylation signal is in bold type.

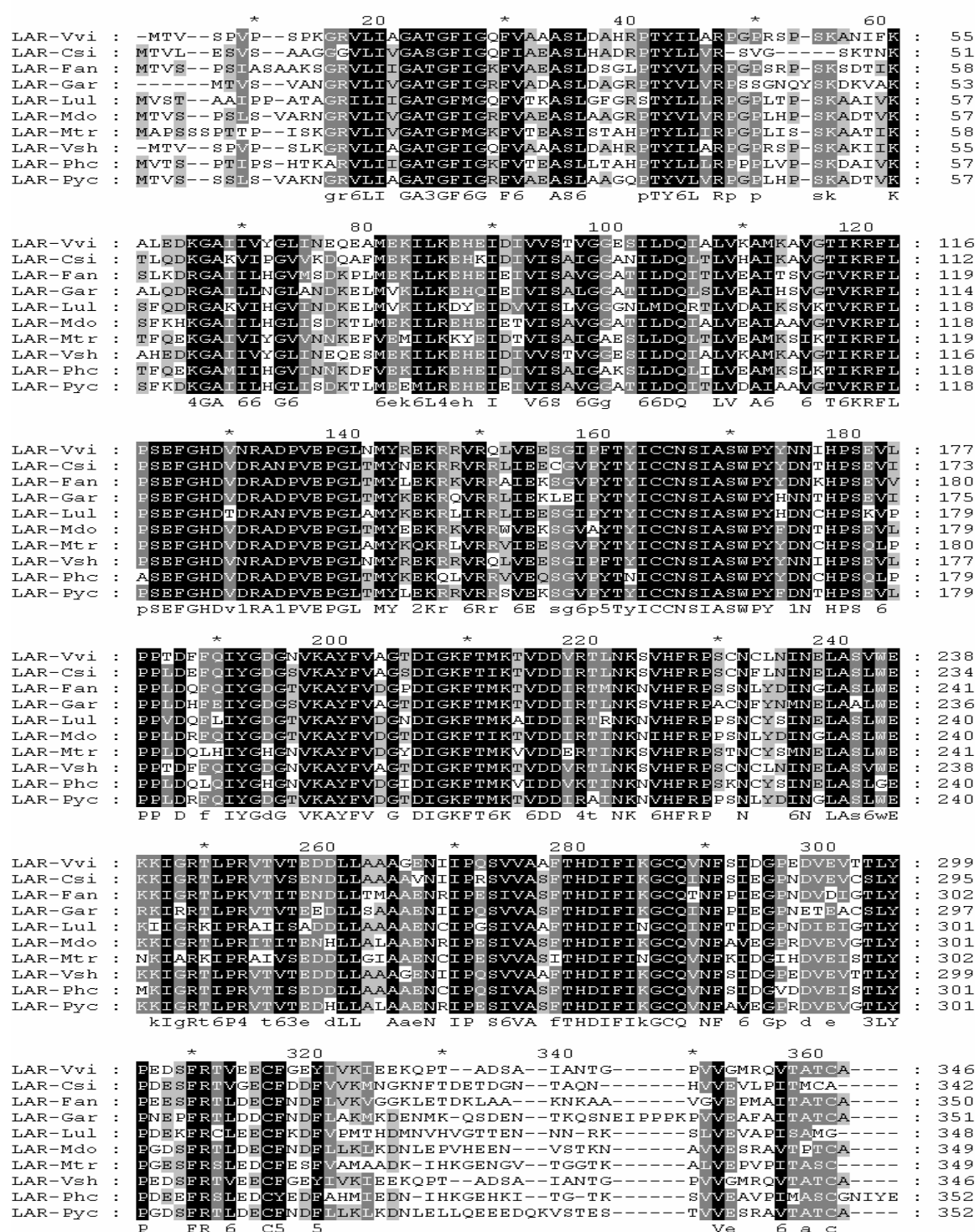


Fig.4-4. Alignment of deduced amino acid sequences of tea plant LAR and that of other plants

Note: Black and gray shading boxes show identical and similar amino acids, respectively.

GenBank accession numbers are as follows: LAR-Vvi, *Vitis vinifera*(CAI26309); LAR-Csi, *Camellia sinensis*; LAR-Fan, *Fragaria x ananassa*(ABH07785); LAR-Gar, *Gossypium arboreum*(CAI56319); LAR-Lul, *Lotus uliginosus*(AAU45392); LAR-Mdo, *Malus x domestica*(AAX12186); LAR-Mtr, *Medicago truncatula*(CAI56327); LAR-Vsh, *Vitis shuttleworthii*(BN000702); LAR-Phc, *Phaseolus coccineus*(CAI56322); LAR-Pvc, *Pyrus communis*(ABB77696)

4.2.2 序列同源性和蛋白质二级结构预测

用 NCBI 上的 Blast P 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行序列同源性搜索,发现其与多种植物的氨基酸序列具有较高的同源性,其中与亚洲棉(*Gossypium arboreum*)和草莓(*Fragaria ananassa*)的同源性分别为 70%和 68%,与葡萄(*Vitis vinifera*)的同源性最高,为 71%。利用 CLUSTAL W 软件将比对上的氨基酸序列联配分析(图 4-4),发现无色花色素还原酶的氨基酸序列较为保守,其保守区可能对其结构和功能有着重要的意义。然后利用 DNATool 软件对其编码的蛋白质进行预测,分子量为 37.5 kD, pI 为 5.90,其中疏水残基占 43.9%,亲水残基占 31.9%。用 SignalP 软件对该蛋白的 N 端进行分析,预测该蛋白的信号肽剪切位点最可能在第 21 和 22 位。利用 PredictProtein 软件对 LAR 的二级结构进行预测,显示的结果表明该蛋白包含了 30.1%的 α 螺旋和 20.8%的 β 折叠,且预测该蛋白是球蛋白。

4.2.3 系统树分析

应用 DNASTar 软件将茶树 LAR 编码的氨基酸序列及从 GenBank 中获取的其他植物 LAR 氨基酸序列进行系统树分析,发现茶树与亚洲棉(*Gossypium arboreum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等遗传距离较近,而与其它物种,如洋梨(*Pyrus communis*)、苹果(*Malus × domestica*)等的遗传距离则较远(图 4-5)。

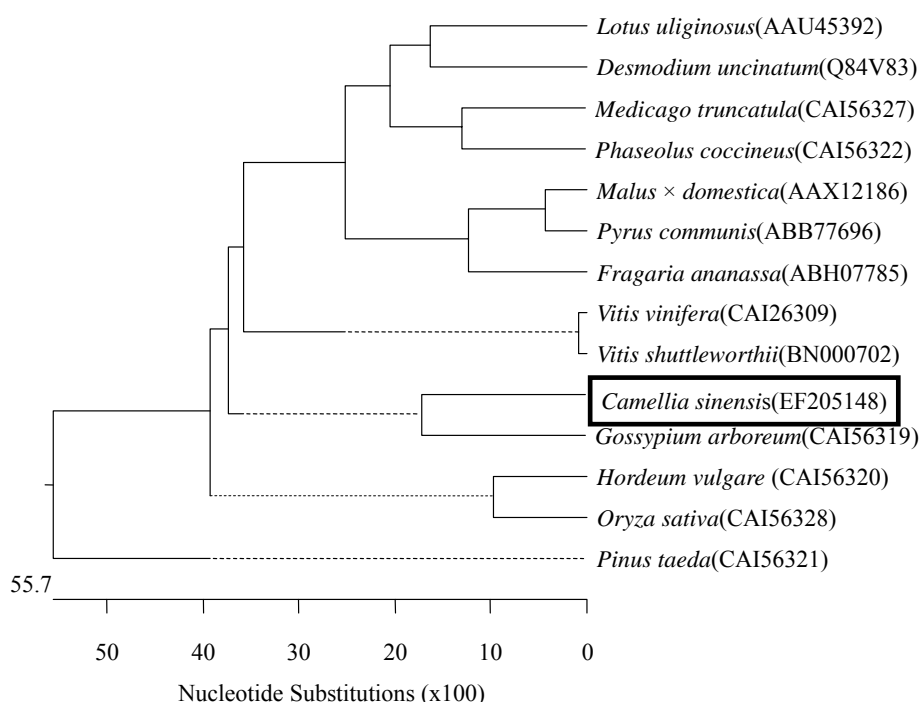


图 4-5 不同植物无色花色素还原酶氨基酸序列的系统树分析

Fig. 4-5 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of LAR in different plants

4.2.4 不同品种间的相对表达含量分析

根据儿茶素含量的不同选取了春季乐清青茶、黄桠、绿芽佛手、汝城白毛茶这四个茶树品种(表 4-1), 提取总 RNA, 检测其吸光值后, 分别取 2 μg 反转录成 cDNA, 以它们为模板, 利用 RT-PCR 的方法, 检测了与类黄酮代谢相关的七个酶在不同品种中的表达情况, 电泳结果如图 4-6 所示。

表 4-2 提取的不同茶树品种儿茶素和总 RNA 含量

Table 4-2 The catechins and total RNA contents of different cultivars

茶树品种	乐清青茶	黄桠	绿芽佛手	汝城白毛茶
Catechins(mg/g)	98.23	105.04	206.51	233.52
RNA 含量	0.68 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1.30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.72 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.66 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

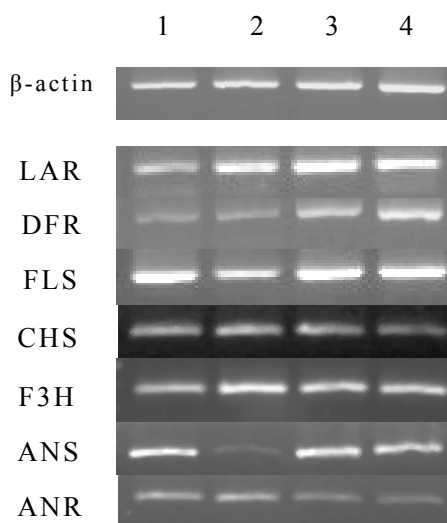


图 4-6 RT-PCR 检测不同茶树品种的基因表达情况, β -actin 为内参

Fig.4-6 RT-PCR analysis of gene expressions in different cultivars, β -actin was used as positive control.

注: 从泳道 1 到泳道 4 依次为乐清青茶、黄桠、绿芽佛手、汝城白毛茶

Note: From lane1 to lane 4 is Yueqing Qingcha, Huangdan, Luya Foshou and Rucheng Baimaocha, respectively.

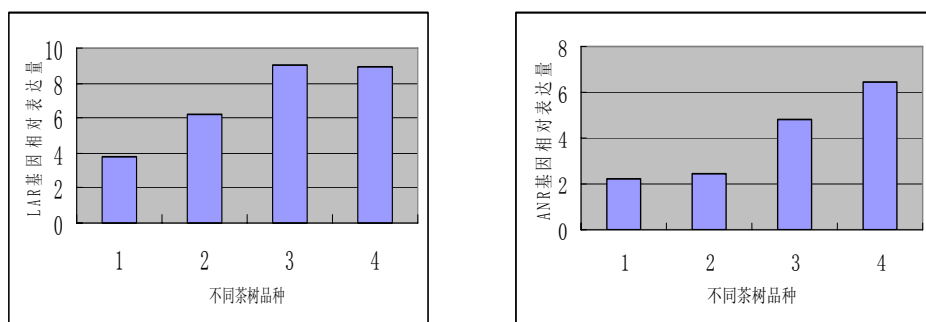


图 4-7 不同品种间 LAR 和 DFR 相对表达含量光密度分析示意图

Fig.4-7 Densitometric analysis of the expression of LAR and DFR in different cultivars

注: 从 1 到 4 依次为乐清青茶、黄桠、绿芽佛手、汝城白毛茶

Note: From lane1 to lane 4 is Yueqing Qingcha, Huangdan, Luya Foshou and Rucheng Baimaocha, respectively.

将电泳结果导入 BandScan5.0 软件, 并对得到的光密度相对表达数值进行分析, 如图 4-7 所示。结果显示, 在茶树黄酮类代谢相关的众多酶中, 只有 LAR 和 DFR 随着儿茶素含量的增加,

其表达量也相应地增加,而其它基因的表达量则与儿茶素含量相关性不大。这从一个侧面说明 LAR 和 DFR 可能是茶树黄酮类代谢过程中主导儿茶素合成的两个重要酶,如果这一假设能得到进一步证实的话,将为今后利用基因工程手段提高茶树儿茶素含量提供理论依据。

4.3 讨论

无色花色素是儿茶素生物合成过程中最后一个中间物质(Furukawa et al, 2002),它是在 CHS、F3H、DFR 等一系列酶的催化下形成的,这些酶最近几年已经陆续在茶树中得到了克隆,但催化无色花色素最终形成儿茶素的无色花色素还原酶的基因克隆却较为模糊,虽然在 NCBI 上登录的茶树无色花色素还原酶基因已有两条,它们分别是由 Park 和 Singh 分离得到的,但以他们登录的序列对 NCBI 的核酸数据库进行 Blast N 和 Blast P 搜索却发现,这两条序列比对上的结果均为花色素还原酶(ANR),因此本实验室在已有无色花色素还原酶 EST 的基础上,利用 3' RACE 技术重新分离了该基因的全长序列,并对其进行了较完善的序列分析工作,发现其与多种植物的无色花色素还原酶氨基酸序列具有较高的同源性,其中与亚洲棉(*Gossypium arboreum*)和草莓(*Fragaria ananassa*)的同源性分别为 70%和 68%,与葡萄(*Vitis vinifera*)的同源性最高为 71%。联配分析也表明本实验所得到的基因序列确实是无色花色素还原酶,其活性还有待进一步验证。

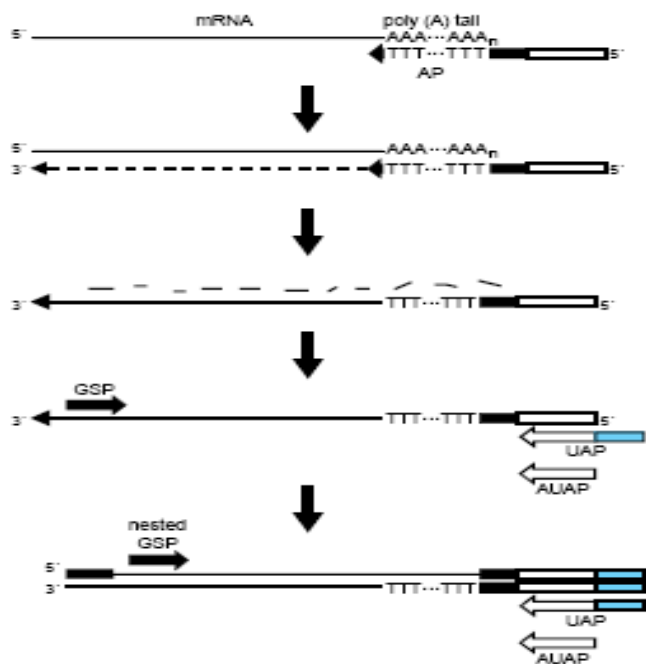


图 4-8 3'RACE 的主要程序

Fig.4-8 Summary of the 3'RACE system procedure

本实验参照 Invitrogen 公司的 3' RACE 试剂盒的方法,用一条加了一段接头的 Oligo(dT)引物反转录合成 cDNA,然后以基因特异引物和接头引物扩增目的片段(图 4-8)。在实验的过程中发现,由于使用接头引物,而非基因特异引物,往往很容易产生弥散、无扩增条带或扩增出非目的片段的情况。因此怎样能从众多的杂带中找出目的条带就成了关键,基于这一点,本实验结合生物信息学的分析方法,尽量准确的估计出目的片段的大小,并将这一区域的所有条带都转入载体中扩繁,然后用菌液 PCR 的方法最后筛选得到了插入目的片段的阳性克隆。为以后解决此类问题

提供了一个值得借鉴的思路。

黄酮类代谢的起点是苯丙氨酸解氨酶催化的脱氨反应，然后在查尔酮合成酶和查尔酮合成酶异构酶的催化下形成黄烷酮，之后在羟基化酶和还原酶的作用下形成黄烷醇类物质，其主要代谢过程如图 1-1 所所示。本实验对与类黄酮代谢相关的 7 个酶在不同茶树品种间的表达差异进行了分析，发现 LAR 和 DFR 这两个基因随着不同茶树品种儿茶素含量的增加，其表达量也增加，而其它基因的表达量则没有这一特点，因此推断 LAR 和 DFR 可能是茶树黄酮类代谢过程中主导儿茶素合成的两个重要酶。这与 Punyasiri 等(2004)对类黄酮代谢相关酶活性的研究结果较为相符，他们也得到了 LAR 与 DFR 的协同作用与总儿茶素含量和茶多酚含量紧密相关这一结论，这些成果的取得将为利用基因工程手段进行生物反应器构建以及茶树种质资源改良提供理论支持和技术保障。

第五章 主要结论和展望

茶在世界各地都是广受欢迎的饮料之一,几千年来,茶的保健和药用功能不断被发现,大量的研究证明,茶叶具有高效的抗癌、抗衰老、抗辐射、抗氧化、清除人体自由基、降血糖和血脂等一系列药理功能(林海和邱振国, 2004)。人们发现茶中的化学成分多达300多种,如黄酮醇、黄酮甙、多酚、矿物质、氨基酸及多糖类等,但其中起主要作用的是一种多酚成分,即茶多酚。自20世纪50年代Roberts等对茶多酚类开展系统研究以来,茶多酚类的许多功能被陆续发现,已渐渐形成了一个茶学研究的热门领域。至今,茶多酚类已成为茶叶中研究最多、发表文章最多、研究成果最丰富的一类化学成分(朱永兴等, 2004)。

茶多酚是茶叶中三十几种酚类物质的总称,它包括儿茶素、黄酮类、酚酸类、花色苷及其甙类,其中儿茶素含量最多,占茶多酚的60%-80%。由于它具有良好的生物活性,而被作为添加剂广泛应用于保健食品中。比如,许多饮料中加入了茶多酚类物质,成了具有抗氧化作用的功能性茶饮料。因此,对其生物合成途径中相关酶的基因进行研究具有重要的理论意义和实践价值。本研究立足于本实验室在茶树分子生物学方面已经取得成果,利用3'-RACE、5'-RACE以及RT-PCR技术克隆了查尔酮异构酶、黄酮醇合成酶和无色花色素还原酶这三个茶树儿茶素代谢中的重要基因,并对黄酮醇合成酶做了原核表达研究,主要在以下几个方面取得了重要进展:

5.1 克隆得到了茶树查尔酮异构酶基因

查尔酮异构酶是黄酮类代谢途径中的早期酶,也是增加黄酮醇产物的关键酶之一,它催化查尔酮异构化为黄烷酮柑橘素。本研究在原有茶树EST基础上,利用T₄RNA连接酶介导的5'RACE技术获得了茶树查尔酮异构酶(CHI)基因的全长序列,其在GenBank的登录号是DQ904329,其序列全长1163 bp,其中开放阅读框长723 bp,编码240个氨基酸,3'端有一个明显的多聚腺苷酸加尾信号,推测的蛋白分子量约为26.4 kD, pI为5.19。序列分析表明它与番茄CHI基因序列的亲缘关系比较近。

5.2 茶树黄酮醇合成酶基因的克隆及其原核表达

黄酮醇类化合物广泛的分布于多种植物中。研究表明,它是几种与细胞内信号传导和细胞转化有关激酶的抑制剂,具有多种生物活性,由于它们能够有选择地阻断细胞内信号传导通路,因此黄酮类化合物被认为是治疗肿瘤的潜在的化合物。黄酮醇合成酶即是催化黄酮类化合物转变成黄酮醇类化合物所必需的酶,它催化黄酮结构中的C₃位羟基化,从而形成各种黄酮醇类物质。本实验根据原有EST设计引物,利用RT-PCR技术获得了茶树黄酮醇合成酶(FLS)基因全长序列,在GenBank登录号为EF205150,其序列全长1317 bp,其中开放阅读框长996 bp,编码331个氨基酸,推测的蛋白分子量约为37.5 kD, pI为5.80。序列分析表明它与葡萄FLS基因序列的亲缘关系比较近。将该基因重组到表达载体pET-32a(+)中进行原核表达,经IPTG诱导、SDS-PAGE检测,结果表明茶树黄酮醇合成酶基因能在大肠杆菌BL21中表达,电泳检测到一条大约61kD的外源蛋白,与预测的融合蛋白分子量相符。随着时间的延长,表达蛋白在总蛋白中的含量呈线性增加,诱导

4 h后, 表达蛋白就已经达到总蛋白的 45%, 而经过过夜诱导的菌液, 表达蛋白占到了总蛋白的 60%, 此融合蛋白经SDS-PAGE检测为不溶性的包涵体, 这为以后大量表达纯化目的蛋白, 进一步制备多克隆抗体和研究其功能奠定了良好的基础。

5.3 克隆获得了茶树无色花色素还原酶基因

无色花色素是儿茶素生物合成过程中最后一个中间物质, 它在无色花色素还原酶的催化下, 最终生成儿茶素类物质, 本实验利用 3'RACE 技术获得了茶树无色花色素还原酶(LAR)的 3'端, 将其与原有 EST 片段拼接, 得到了 LAR 基因的全长序列, 其在 GenBank 的登录号为 EF205148, 其序列全长 1 301 bp, 其中开放阅读框长 1 029 bp, 编码 342 个氨基酸, 3' 端有一个明显的多聚腺苷酸加尾信号, 推测的蛋白分子量约为 37.5 kD, pI 为 5.81。同源性分析表明得到的 LAR 序列与亚洲棉(*Gossypium arboreum*)、洋莓(*Fragaria ananassa*)和葡萄(*Vitis vinifera*)的氨基酸序列相似性分别为 70%、68%、71%。十种植物的联配表明其氨基酸序列较为保守。

5.4 利用半定量 PCR 的方法检测了不同基因的表达情况

本实验对与类黄酮代谢相关的 CHS、F3H、FLS、DFR、LAR、ANR 和 ANS 等 7 个酶在不同茶树品种间的表达差异进行了分析, 发现 LAR 和 DFR 这两个基因随着不同茶树品种儿茶素含量的增加, 其表达量也增加, 而其它基因的表达量则没有这一特点, 因此推断 LAR 和 DFR 可能是茶树黄酮类代谢过程中主导儿茶素合成的两个重要酶。这与 Punyasiri 等(2004)对类黄酮代谢相关酶活性的研究结果较为相符, 他们也得到了 LAR 与 DFR 的协同作用与总儿茶素含量和茶多酚含量紧密相关这一结论, 这些成果的取得将为利用基因工程手段进行生物反应器构建以及茶树种质资源改良提供理论支持和技术保障。

5.5 展望

植物次生代谢是相对初生代谢而言。植物次生代谢产物指从有限的初生代谢产物经不同的生物代谢途径生成的一系列分类不同的中间或最终产物, 这些化合物并非生物有机体或生物细胞生长繁殖所必需, 但对于植物自身在复杂环境中的生存和发展却起着不可替代的作用。植物次生代谢具有重要的经济价值, 临床应用的药物有很多都取自植物的次生代谢产物(赵淑娟等, 2003)。茶树作为重要的木本植物之一, 其具有的许多生理功能都来自于次生代谢物质, 如何能够有效的利用这些次生代谢物质为人类服务是许多茶叶科学工作者都在思考的问题。

植物次生代谢途径中, 酶控制着物质的流向, 其作用是必不可少的, 而酶的作用又离不开基因的调控。科技的发展, 已使基因水平的操作成为现实。酶及其基因的表达调控研究是复杂而细致的工作, 而基因的分离克隆是研究其表达调控的基础。目前为止, 茶树黄酮类次生代谢产物的生物合成途径, 是研究的较为透彻的次生代谢途径之一, 许多代谢相关的基因都已经得到了克隆, 但相对于庞大的茶树次生代谢网络, 已明确功能的酶和已克隆的基因还是极其有限的, 新基因的分离和克隆将是一个持续的过程, 需要科技工作者前仆后继的为之努力。

植物次生代谢产物的生物合成大多是由多种酶参与的多步反应, 在此过程中调控因子往往具

有牵一发而动全身的功能。研究表明, 转录因子的调控在黄酮类化合物的生物合成中具有重要作用(Vom et al, 2002)。Grotewold 等(1998)和 Bruce 等(2000)在大麦培养细胞中表达异源转录因子 C1 和 R 基因, 使得正常状态下无色的细胞中出现了蓝色素的积累。这是因为在蓝色素的生物合成起作用的大部分酶类, 在 C1 和 R 基因表达的 MYB 蛋白和 bHLH 蛋白的协同调控下, 催化代谢向蓝色素生成的方向进行。目前茶树虽然在功能基因克隆方面取得了一些进展, 但有关茶树代谢过程中调控因子的研究却鲜有报道, 因此分离并合理利用调控因子, 也可做为今后茶树次生代谢基因工程研究的一个方向。

另外随着分子生物学研究的不断深入, 以及人类基因组计划的完成宣告了后基因组时代的到来, 蛋白质组学作为后基因时代的重要组成部分, 正成为科学家们竞相研究的热点。茶树分子生物学虽然起步较晚, 但随着各种蛋白表达技术的成熟, 将特定的茶树基因转入表达载体中表达, 并对得到的目的蛋白的结构和功能进行进一步研究已成为可能。

参考文献

1. 陈亮, 赵丽萍, 高其康. 茶树新梢 cDNA 文库的构建和 ESTs 测序成功率初步分析. *茶叶科学*, 2004, 24 (1): 18-22
2. 冯艳飞, 梁月荣. 茶树 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的克隆和序列分析. *茶叶科学*, 2001, 21 (1): 21-25
3. 何小解, 易著文, 田云, 卢向阳, 党西强, 莫双红, 杨华彬. 儿茶素清除(O \cdot ·2)与 \cdot OH 的能力. *中南大学学报(医学版)*, 2006, 31 (1): 138-140
4. 李远华, 江昌俊, 杨顺利, 余有本. 茶树 β -葡萄糖苷酶 cDNA 克隆和原核表达. *农业生物技术学报*, 2004, 12 (6): 625-629
5. 李远华, 江昌俊, 宛晓春. 茶树咖啡碱合成酶基因 mRNA 表达的研究. *茶叶科学*, 2004, 24 (1): 23-28
6. 李常应, 周薇, 曹娟, 刘晓萍, 邹少娜, 罗招阳. 表没食子儿茶素没食子酸酯诱导人胃癌细胞裸鼠移植瘤凋亡的研究. *中国癌症杂志*, 2006, 16 (9): 737-740
7. 陆建良, 林晨, 骆颖颖, 张广辉, 梁月荣. 茶树重要功能基因克隆研究进展. *茶叶科学*, 2007, 27 (2): 95-103
8. 林海, 邱振国. 天然抗氧化剂茶多酚的化学和应用. *海峡药学*, 1997, 9 (2): 99-101
9. 罗一帆, 郭振飞, 许旋, 陈剑经. 儿茶素及其组合物清除自由基能力的研究. *林产化学与工业*, 2005, 25 (4): 27-30
10. 明亚玲, 骆丹, 徐晶, 吉玺, 朱洁, 林向飞. 茶多酚单体和黄芩苷对紫外线辐射皮肤成纤维细胞的影响. *中国美容医学*, 2005, 14 (5): 541-544
11. 马春雷, 陈亮. 茶树功能基因分离克隆研究进展. *分子植物育种*, 2006, 4(3S): 16-22
12. 宋秀祖, 夏济平, 毕志刚. 茶多酚单体对中对波紫外线辐射培养的成纤维细胞氧化损伤的保护机制研究. *临床皮肤科杂志*, 2003, 32 (6): 315-317
13. 王广立, 唐茂芝. 水稻 10KD 醇溶蛋白基因克隆序列分析及对植物百脉根的转化. *植物学报*, 1994, 16 (5): 351-357
14. 王朝霞, 李叶云, 江昌俊, 余有本. 茶树巯基蛋白酶抑制剂基因的 cDNA 克隆与序列分析. *茶叶科学*, 2005, 25 (3): 177-182
15. 韦朝领, 江昌俊, 陶汉之, 宛晓春. 茶树紫黄素脱环氧化酶基因的 cDNA 克隆及其生物信息学分析. *南京农业大学学报*, 2003, 26 (1): 14-19
16. 韦朝领, 江昌俊, 陶汉之, 宛晓春. 茶树紫黄素脱环氧化酶基因的体外定点突变及其突变体的表达和活性鉴定. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2004, 20 (1): 73-78
17. 吴姗, 梁月荣, 陆建良, 黎昊雁. 基因枪及其与农杆菌相结合的茶树外源基因转化条件优化. *茶叶科学*, 2005, 25(4):255-264
18. 赵东, 刘祖生, 奚彪. 茶树多酚氧化酶基因的克隆及其序列比较. *茶叶科学*, 2001, 21 (2): 94-98
19. 赵淑娟, 刘涤, 胡之壁. 植物次生代谢基因工程. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(7): 52-56

20. 周兆澜, 朱祯. 水稻 cDNA 文库的构建及巯基蛋白酶抑制剂 cDNA 的分离. *中国科学 (C 辑)*, 1996, (2): 149-155
21. 朱永兴, 周巨根, 杨昌云. 中国茶多酚类文献研究. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 2002, 28 (6): 703-706
22. 张晓国, 朱英国. 水稻花药特异表达基因启动子的扩增及克隆. *武汉大学学报 (自然科学版)*, 1997, 43 (4) : 480-484
23. Agullo G, Gamet-Payraastre L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, and Payraastre B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 1997, 53(11): 1649-1657
24. Aida R, Yoshida K, Kondo T, Kishimoto S, and Shibata M. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the anti-sense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Science*, 2000, 160: 49-56
25. Bhatia N and Garwal R. Hydrogen peroxide-mediated prooxidant activity of epigallocatechin 3-gallate in human prostate carcinoma DU145 cells: effect on cell growth and viability, and MAP kinase. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 2000, 41:533-538
26. Bruce W, Folkerts O, Garnaat C, crasta O, Roth B, and Bowen B. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *The Plant Cell*, 2000, 12(1): 65-80
27. Chen L, Zhao LP, and Gao QK. Generation and analysis of expressed sequence tags from the tender shoot cDNA library of tea plant (*Camellia sinensis*). *Plant Science*, 2005, 168: 359-363
28. Chuck G, Robbins T, Nijjar C, Ralston E, Dooner HK. Tagging and cloning of a petunia flower colour gene with the maize transposable element activator. *The Plant Cell*, 1993, 5:371-378
29. Eksittikul T and Chulavatnatol M. Characterization of cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (mahihot esculent cranta). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, 266 (1): 263-269
30. Elias M, Nambisan B, and Sudhakaran PR. Characterization of linamarase of latex and its localization in petioles in cassava. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, 341 (2) : 222-228
31. Forkmann G, and Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 155-160
32. Furukawa T, Eshima A, Kouya M, Takio S, Takano H, and Ono K. Coordinate expression of genes involved in catechin biosynthesis in *Polygonum hydropiper* cells. *Plant Cell Reports*, 2002, 21: 385-389
33. Frohman MA, Dush MK, and Martin G. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85: 8998-9002
34. Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, Siame B, Butler L, Swenson J, Maddock S, Clair G S, and Bowen B. Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. *The Plant Cell*, 1998, 10: 721-740
 35. Hayakawa S, Saeki K, Sazuka M, Suzuki Y, Shoji Y, Ohta T, Kaji K, and Yuo A. Isemura M. Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 285(5): 1102-1106.
 36. Kato M, Mizuno K, Crozier A, Fujimura T, and Ashihara A. Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature*, 2000, 406: 956-957
 37. Kato M, Mizuno K, Fujimura T, Iwama M, Irie M, Corzier A, and Ashihara H. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiology*, 1999, 120: 579-586
 38. Kato M and Uenatu K. Biochemistry and molecular biology in caffeine biosynthesis: Molecular cloning and gene expression of caffeine synthase, In: *Proceedings of 2001 International Conference on O-Cha (Tea) Science* (Session II), 2001, 21-24
 39. Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, and Lin JK. Inhibition of Cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1999, 75(1):1- 12.
 40. Li H and Chan TH. Enantioselective synthesis of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the active polyphenol component from green tea. *Organic Letters*, 2001, 3 (5) : 739-741
 41. Li CP, Swain E, and Poulton JE. Prunus serotina amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase: Purification, N-terminal sequencing and antibody production. *Plant physiology*, 1992, 100 (1):282-290
 42. Lin YL, Juan IM, Chen YL, Liang YC, and Lin JK. Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44: 1387-1394
 43. Liang P and Pardee A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257: 967-971
 44. Matsumoto S, Takeuchi A, and Hayatsu M. Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using the tea PAL cDNA probe. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89: 671-675
 45. Mizutani M, Nakanishi H, Ema J, Ma SJ, Noguchi E, Inohara-Ochiai M, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, and Sakata K. Cloning of β -primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. *Plant Physiology*, 2002, 130: 2164-2176
 46. Mondal Tk, Bhattacharya A, Ahuja PS, and Chand P. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangral Jat] plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reporters*, 2001, 20(8): 712-720

47. Maruyama K and Sugano S. Oligo-capping: A simple method to replace the cap structure of eucaryotic mRNA with oligoribonucleotides. *Gene*, 1994, 138(1-2): 171-174
48. Masaru M, Sasaki J, and Murao S. Studies on β -glucosidase from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin, isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1995, 59 (9): 1623-1627
49. Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric DVC, Tunen AJV, and Verhoeven ME. Over expression of petunia flavonol synthase in tomatoes results in fruits containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 470-474
50. Mamati EG and Liang YR. Genetic control studies to exploit flavonoids synthesis pathway in tea biochemical. *Journal of Tea Science*, 2005, 25(2): 81-89
51. Ma ZS, Huynh TH, Ng CP, Do PT, Nguyen TH, and Huynh H. Reduction of CWR22 prostate tumor xenograft growth by combined tamoxifen-quercetin treatment is associated with inhibition of angiogenesis and cellular proliferation. *International Journal of Oncology*, 2004, 24(5): 1297-1304
52. Nielsen K, Derolles SC, Markham KR, Bradley MJ, Podivinsky E, and Manson D. Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus. *Molecular Breeding*. 2002, 9: 217-229
53. Park JS, Kim JB, Hahn BS, Kim KH, Ha SH, Kim JB, and Kim YH. EST analysis of genes involved in secondary metabolism in *Camellia sinensis* (tea), using suppression subtractive hybridization. *Plant Science*, 2004, 166:953-961
54. Payne G, Ahl P, Moger M, Harper A, Beck J, Meins F, and Ryals J. Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q two acidic chitinases from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87: 98-102
55. Polashock JJ, Griesbach RJ, Sullivan RF, and Vorsa N. Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and expression in transgenic tobacco. *Plant Science*, 2003, 163:241-251
56. Punyasiri PA, Abeysinghe IS, Kumar V, Treutter D, Duy D, Gosch C, Martens S, Forkmann G, and Fischer TC. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: Properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 431: 22-30
57. Roberts EAH, Cartwright RA, and Oldschool M. The phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1957, 8: 72-80
58. Sugiyama T and Sadzuka Y. Combination of theanine with doxorubicin inhibits hepatic metastasis of M5076 ovarian sarcoma. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5(2): 413-416
59. Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, and Mukhtar H. Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase pathways

- by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *Journal of Cell Biochemistry*, 2004, 91(2): 232-242
60. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, and Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 322(2): 339-346
61. Sawai Y and Sakata K. NMR analytical approach to clarify the antioxidative molecular mechanism of catechins using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998,46(1): 111-114
62. Shi ST, Wang ZY, Smith TJ, Hong JY, Chen WF, Ho CT, and Yang CS. Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Research*, 1994, 54(17):4641-4647
63. Takeuchi A, Matsumoto S, and Hayatsu M. Chalcone synthase from *Camellia sinensis* isolation of the cDNAs and the organ-specific and sugar-responsive expression of the Genes. *Plant Cell Physiology*, 1994,35(7): 1011-1018
64. Takos AM, Ubi BE, Robinson SP, and Walker AR. Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Science* , 2006, 170: 487-499
65. Takeo T. Production of linalool and geraniol by hydrolytic breakdown of bound forms in disrupted tea shoots. *Phytochemistry*, 1981, 120 (9): 2145-2147
66. Tunen AJV, Koes RE, Spelt CE, Krol ARV, Stuitje AR, and Mol JN. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *The EMBO Journal*, 1988, 7(5):1257-1263
67. Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673-4680
68. Verhoeven ME, Bovy A, Collins G, Muir S, Robinson S, and Colliver S. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 2099-2106
69. Vom ED, Kijne JW, and Memelink J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, 2002, 61: 107-114
70. Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, and Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(11):2800-2802
71. Wang ZY, Cheng SJ, Zhou ZC, Athar M, Khan WA, Bickers DR, and Mukhtar H. Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutation Research* , 1989, 223: 273-285
72. Yu HN, Yin JJ, and Shen SR. Growth inhibition of prostate cancer cells by epigallocatechin gallate in the presence of Cu^{2+} . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52 (3) : 4622-4661

致 谢

本论文最终的顺利完成，得益于很多老师和朋友的帮助。

首先要衷心地感谢我的导师陈亮研究员，三年来，陈老师在学业上给了我很大的鼓励和帮助，同时对我生活上无微不至的关心和照顾，也让我倍感温暖。可以说，从本论文实验设计到的最终完成无不凝聚着导师的心血和智慧。导师渊博的知识、严谨的态度、踏实的作风、开阔的眼光、创新的思维、谦和的性格、敏锐的洞察力，使我获益良多。在此，对陈老师谨致以最衷心的感谢和崇高的敬意！

在论文完成的过程中，我非常荣幸地得到了中国农业科学院茶叶研究所领导、老师们的热心帮助，是他们抽出宝贵的时间给我补充茶学方面的知识，在此向茶叶所领导和老师们表示衷心的感谢。特别感谢本实验室的虞富莲研究员、赵丽萍师姐、王新超师兄和姚明哲师兄对我学业上无私的指导帮助和生活上的关心照顾。在两年的重点实验室学习生活过程中，师兄、师姐为我们创造了一个良好的学习实验氛围，使我丰富了知识，拓宽了眼界，是他们的出色工作为我们的实验提供了良好的基础。在此，对他们致以最衷心的感谢！

感谢张亚丽、梅菊芬、张建勇、古小玲、刘振等对我的帮助，他们即是我的同学，也是我生活上的朋友，在一起学习的过程中给了我很多启发，使我能够很快融入到这个学术氛围中，也给了我值得终身珍藏的友谊。同时，感谢创新中心付建玉、王丽鸳、王川丕、刘守安、吕海鹏、陈小强、俸春红、张小飞等老师和同学对我的关心和帮助，真心地感谢他们。本实验的顺利完成也离不开中国农业科学院研究生院的领导和各位老师的关心和支持，在此一并表示感谢。

还要感谢家人给予我的最最最无私的奉献和支持。爸爸、妈妈和姐姐对你们的感谢言语无法表达，只能记在心里。

最后，感谢在我三年学习过程中给予指导和帮助所有老师、朋友、家人，是你们的关心让我即使一个人的时候也不会觉得孤单，让我能一直坚定的走下去，谢谢一路有你们相伴，你们都是我终身值得骄傲的财富。

马春雷

2007年6月

作者简历

姓名：马春雷

性别：男

出生日期：1982 年 3 月 15 日

出生籍贯：黑龙江省五常市

学历：硕士研究生

发表论著情况等：

1. 马春雷, 陈亮. 茶树功能基因分离克隆研究进展. *分子植物育种*, 2006, 4(3S): 16-22
2. 马春雷, 赵丽萍, 张亚丽, 陈亮. 茶树查尔酮异构酶基因克隆及序列分析. *茶叶科学*, 2007, 27(2): 127-132
3. 张亚丽, 赵丽萍, 马春雷, 陈亮. 茶树亲环素基因 cDNA 全长的分析鉴定与原核表达. *茶叶科学*, 2007, 27(2): 120-126
4. 王新超, 陈亮, 赵丽萍, 马春雷, 张亚丽, 梅菊芬, 姚明哲. 反相高效液相色谱法测定茶叶中 β -胡萝卜素含量. *中国农学通报*, 2006, 22(9): 91-93
5. Chen L, Ma CL, Zhao LP. Molecular clone and characterization of three genes involved in the catechin biosynthesis pathway of tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze. *Proceedings of the 2nd International Conference of Plant Molecular Breeding* (Poster), 2007/3/23-27, Sanya, China