

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

茶树 ACS、ACO 基因克隆与亲环素基因的
鉴定及其表达分析

**Molecular Cloning and Expression Analysis of ACS, ACO and
Cyclophilin Genes of Tea Plant (*Camellia Sinensis*)**

硕 士 研 究 生：张亚丽

指 导 教 师：陈 亮

申 请 学 位 类 别：农学硕士

专 业：茶 学

研 究 方 向：分子生物学

培 养 单 位：中国农科院茶叶研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

**Molecular Cloning and Expression Analysis of ACS, ACO and
Cyclophilin Genes of Tea Plant (*Camellia Sinensis*)**

Ms. Candidate: Zhang, Yali

Advisor: Chen, Liang

Major: Tea Science

Research Field: 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

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**

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						
论文作者			专 业		研究方向	
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	生物学	
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□ 博导□			
			硕导□ 博导□			
			硕导□ 博导□			
会议记录（秘书）						
论文答辩时间地点						

摘 要

乙烯是一种重要的植物激素，参与植物整个生理过程。ACC 合成酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS) 和 ACC 氧化酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO) 是植物乙烯合成过程中的重要酶，对乙烯的合成具有重要的调控作用，所以这两个基因的研究具有理论与实际意义。

在茶树新梢 cDNA 文库测序所获得的 EST 基础上，利用 RACE (Rapid Amplification cDNA Ends)、RT-PCR 等技术，克隆得到编码这两个酶的全长基因序列，在 NCBI 上分别登录为 EF205149、DQ904328。其中 ACS 长 1579 bp，编码 478 个氨基酸，预测分子量约为 53.7 KD，等电点 8.039；ACO 长 1237 bp，编码 320 个氨基酸残基，预测分子量为 36.2 KD，等电点 5.41。以 Neighbor-Joining 法构建进化树，发现 ACS 及 ACO 都与柿树中的同类基因同源性最高，亲缘关系最近。这两个基因的获得为以后进一步研究其在茶树抗逆中的作用打下一定的基础。

根据所得到的茶树 ACS 及 ACO 基因序列设计引物，利用 β -actin 作为阳性对照，取安吉白茶、6/8、杭州大叶、龙井长叶、藪北、龙井 43 和福鼎大白茶 7 个品种在经历高温和低温，以及龙井 43 在冬天不同时期样品逆转录的 cDNA 进行 RT-PCR 分析，结果发现 ACS 及 ACO 基因的表达量与品种的抗逆性强弱有一定程度的相关性；在不同时期龙井 43 样品中，ACS 及 ACO 基因的表达也有类似的结果。

亲环素广泛存在于多种生物体内，在植物的发育和新陈代谢等生理过程中具有重要作用。通过对茶树新梢 cDNA 文库大量随机测序，获得了一个编码亲环素的全长基因，在 GenBank 登录，登录号为 DQ904327。茶树亲环素基因 cDNA 全长 949 bp，其中开放阅读框全长 495 bp，编码蛋白质含有 164 个氨基酸，分子量约为 17.47 kD，等电点约为 8.54，它具备 5' 端非编码区的“CAAT”标志及 3' 端非编码区的“AATAAA”poly-A 加尾信号。其推测的氨基酸序列经与 26 条其他生物亲环素蛋白氨基酸序列进行 CLUSTAL W 多序列联配并以 Neighbor-Joining 法进行进化树构建后，发现与水稻和小麦的相似性较高，达到 85% 以上。根据亲环素基因开放阅读框序列设计引物，构建了原核表达载体 pET/Csin-Cyp，并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中成功诱导出了一个分子量为 23 kD 的亲环素融合蛋白。这将便于后期在基因以及蛋白质水平上进一步研究亲环素蛋白在茶树生理和调控机制中发挥的作用。

关键词： ACO ACS 茶树 基因克隆 亲环素 原核表达

Abstract

Ethylene is one of the important plant hormones, it has significant physiological role in the life of plant. ACC synthase (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS) and ACC oxidase (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO) are very important enzymes in the ethylene biosynthesis of the plant. They play important roles in the regulation of ethylene biosynthesis. So the research on the two genes has both theory and practicality significance.

Based on the ESTs from the cDNA library sequencing program of tea plant, ACO and ACS genes encoding the two enzymes were cloned using the RACE and RT-PCR methods. The GenBank Accessions are EF205149 and DQ904328, respectively. The ACS is 1579 bp in length, encoding 478 amino acids, the putative molecular weight is 53.7 KD and the pI is 8.039. The ACO is 1237 bp in length, encoding 320 amino acids, the putative molecular weight is 36.2 KD and the pI is 5.41. The phylogenetic trees constructed by the software Mega showed that both ACS and ACO genes are closely related to those of *Diospyros kaki*. Cloned of the two genes will do some spadework for the research of its effect on the resist of adversity in tea plant later.

Primers were designed based on the ACS and ACO sequences, the gene expressions of 7 cultivars, Anji Baicha, 6/8, Hangzhou Daye, Longjing Changye, Yabukita, Longjing 43 and Fuding Dabaicha after stress of high temperature in the summer and low temperture in the winter, as well as Longjing 43 during different periods in the winter were assayed using RT-PCR methods and the β -actin as a positive control. The results showed the expressions of ACS and ACO genes had some extent relationship with the resistance of the cultivars. Similarly results were also found in the different time of winter for Longjing 43.

Cyclophilin exists widely in organisms. It has very important roles in plant growth and metabolism. A cDNA clone, encoding cyclophilin gene, was obtained from the expressed sequence tag sequencing of tea plant. The full-length cDNA of the cyclophilin gene was 953bp, encoding 164 amino acids. The predicted MW and pI were 17.47 kD and 8.54, respectively. A "CAAT" signal in 5' untranslated region and a polyadenylation signal of "AATAA" poly-A in 3' untranslated regions of cyclophilin mRNAs were found. The presumed protein sequences of tea plant were aligned with those of other 26 organisms through software CLUSTAL W. The phylogenetic analysis based on the Neighbor-Joining method showed the similarity was greater than 85% between cyclophilin genes of tea plant and *Oryza sativa* (japonica cultivar-group), *Triticum aestivum* etc. Primers were designed on the open reading frame of the cyclophilin gene of tea plant to construct the expressive vector pET/Csin-Cyp. A recombinant protein about 23kD in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) was induced. This will do beneficial to research its effects on the physiology and regulation in the tea plant from the level of gene and protein.

Key word: ACO, ACS, Cyclophilin, Gene cloning, Prokaryotic expression, Tea plant (*Camellia sinensis*)

目 录

缩略表	0
第一章 文献综述及研究思路	1
1.1 植物 ACS 与 ACO 基因研究概况	1
1.1.1 ACS 和 ACO 基因克隆	2
1.1.2 ACS 和 ACO 启动子研究	3
1.1.3 ACS 和 ACO 基因表达研究	3
1.1.4 ACS 和 ACO 转基因研究	4
1.2 亲环素基因研究概况	5
1.3 茶树中这三个基因相关研究	6
1.4 植物基因克隆的常用方法	6
1.4.1 简并 PCR 技术	7
1.4.2 RACE 技术	7
1.4.3 表达序列标签法	8
1.5 基因表达的分析方法	9
1.6 本论文的研究目的及意义	9
第二章 茶树 ACS 基因的克隆及 RT-PCR 分析	11
2.1 材料	11
2.1.1 实验材料	11
2.1.2 常用溶液	11
2.2 方法	12
2.2.1 总 RNA 的提取	12
2.2.2 ACS 基因中间序列的获得	12
2.2.3 ACS 基因 3' 端序列的获得	15
2.2.4 ACS 基因 5' 端序列的获得	17
2.2.5 不同茶树品种、龙井 43 冬季不同时间 ACS 基因的 RT-PCR 分析	17
2.3 结果与分析	19
2.3.1 RNA 提取	19
2.3.2 ACS 基因中间序列的扩增	19
2.3.3 ACS 基因 3' 端序列的扩增	20
2.3.4 ACS 基因 5' 端序列的扩增	20
2.3.5 三段序列的拼接	20
2.3.6 茶树 ACO 基因所编码的氨基酸与同源序列的联配	22
2.3.7 进化树构建	24
2.3.8 ACS 基因不同品种间的相对表达含量分析	25
2.3.9 不同时期龙井 43 中 ACS 基因的表达	26
2.4 讨论	27

第三章 茶树ACO基因的克隆与RT-PCR分析	29
3.1 材料	29
3.2 方法	29
3.2.1 ACO基因克隆.....	29
3.2.2 不同茶树品种、龙井 43 冬季不同时间ACO基因的RT-PCR分析	30
3.3 结果与分析	31
3.3.1 ACO基因部分EST片段序列的获得.....	31
3.3.2 ACO基因中间序列的获得.....	31
3.3.3 ACO基因全长序列的获得.....	32
3.3.5 进化树构建.....	34
3.3.6 ACO基因不同品种间的相对表达含量分析	35
3.3.7 不同时期龙井 43 中ACO基因的表达.....	36
3.4 讨论	37
第四章 茶树亲环素基因cDNA全长的分析鉴定与原核表达	38
4.1 材料与试剂	38
4.1.1 材料	38
4.1.2 实验试剂.....	38
4.2 方法	38
4.2.1 茶树新稍EST测序及Cyclophilin基因的鉴定.....	38
4.2.2 亲环素基因的序列分析、多序列联配及进化树构建	38
4.2.3 亲环素基因的原核表达.....	39
4.3 结果与分析	41
4.3.1 亲环素基因克隆的鉴定.....	41
4.3.2 亲环素蛋白的多序列联配.....	42
4.3.3 亲环素基因进化分析.....	43
4.3.4 亲环素基因的克隆与酶切鉴定.....	44
4.3.5 亲环素基因表达载体的构建.....	44
4.3.6 亲环素基因诱导表达.....	45
4.4 讨论	45
第五章 全文结论与展望	47
5.1 全文结论	47
5.2 展望	47
参考文献	48
致 谢	54
作 者 简 历	55

缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	1-氨基环丙烷-1-羧酸
ACO	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶
ACS	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase	1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶
Amp	Ampicilin	氨卞青霉素
ATP	Adenosine-5'-triphosphate	腺苷三磷酸
bp	Base pair	碱基对
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦磷酸二乙酯
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EST	Expressed Sequence Tags	表达序列标签
IPTG	Isopropyl thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
LB	Luria-Bertani Medium	一种培养基
A	Absorbency	吸光值
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

第一章 文献综述及研究思路

茶树原产中国，是一种重要的经济作物，它在我国已经有四千多年的栽培历史。茶叶为世界的三大无酒精饮料之一。茶叶中含有如儿茶素等多种次生代谢产物，对人体有重要的保健作用，如抗菌抗病抗氧化、降血压降胆固醇等(Maeda-Yamamoto et al., 1998)。随着茶叶的需求越来越大，消费者对茶叶品质要求也越来越高，所以选育优良品种任重而道远。茶树是一种多年生木本植物，传统的茶树育种周期比较长、效率也不高。随着分子生物学技术的发展，分子辅助育种和基因工程育种也开始逐渐在茶树上得到应用，这不仅可以缩短茶树育种的周期，也可以提高育种的效率。

基因序列的克隆是进行基因工程育种研究的基础与前提。选取茶树一些与抗逆境相关重要功能基因（如乙烯生物合成相关基因）克隆其全长序列，并有目的地研究其在不同品种与逆境条件下的表达差异，为从分子水平认识其机理和利用基因工程手段培育抗逆茶树新品种提供依据。

1.1 植物 ACS 与 ACO 基因研究概况

乙烯(ethylene)是一种植物气体激素，高等植物个体器官都能产生乙烯，但不同组织、器官和发育时期乙烯的释放量都不相同。乙烯的生理作用非常广泛，其对植物种子萌发、生长发育、衰老、果实成熟等有广泛的影响，同时与逆境胁迫如机械伤害、冷害、渍水、病原菌入侵等方面有关；并参与植物细胞的程序性死亡，促进花凋谢和 DNA 降解；同时乙烯含量与脱落有密切关系。

乙烯的生物合成主要由蛋氨酸在腺苷蛋氨酸合成酶作用下转变为 S-腺苷蛋氨酸（S-adenosyl methionine, SAM），SAM 在 1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS）作用下形成 1-氨基环丙烷-1-羧酸（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC），ACC 在有氧条件下经 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO）催化形成乙烯。ACC 也可在 ACC 丙二酰基转移酶作用下形成 N-丙二酰 ACC 即 MACC，MACC 是失活的最终产物(如图 1-1 所示)。

ACC 合成酶以及 ACC 氧化酶是乙烯合成过程中非常重要的关键酶，在植物体内乙烯的生成量主要这两个酶的活性大小决定，所以这两个酶基因的研究非常广泛。

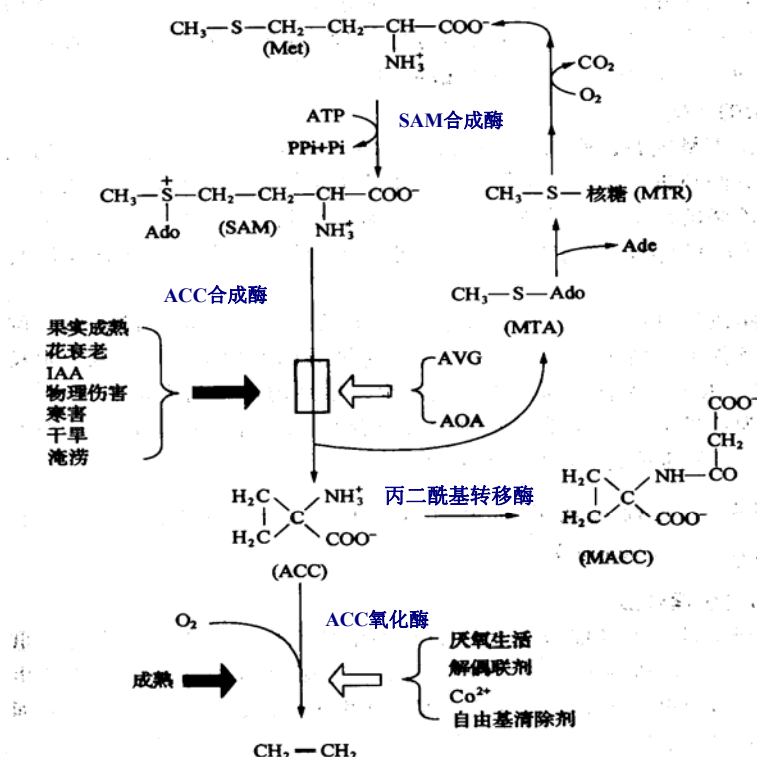


图 1-1 植物乙烯合成途径示意图

Fig1-1 Synthesize path of ethylene in Plant

1.1.1 ACS 和 ACO 基因克隆

(1) ACS 基因的克隆

研究表明 ACS 由多基因家族编码,有多种同工酶,受多种因素调控,其在植物组织中含量很低,因而分离提纯很困难(黄琼珍, 1997)。ACS 最早在番茄果皮组织中发现,但最早在夏南瓜中分离到编码 ACS 的基因(Sato and Theologis, 1989)。自从 Straeten 等(1990)从番茄果实的 cDNA 文库中分离得到 ACS 以来,目前已从笋瓜(Nakajima et al., 1990)、苹果(Yip et al., 1991)、马铃薯(Schlaghnauffer et al., 1995)、番茄(张永清和邱并生, 1992; 刘传银和田颖川, 1998; 刘中大, 1998)、香蕉(金志强和彭世清, 1998; 金志强等, 2001a, 2001b; Huang et al., 2006)、柑橘(Wong et al., 1999)、哈密瓜、桃(金勇丰和张耀洲, 2000; 邹爱兰和陈崇顺, 2005)、猕猴桃(徐昌杰等, 2001)、柿(饶景萍等, 2001; 唐霞等, 2005)、玫瑰花瓣(Wang et al., 2004)、番木瓜(Hidalgo et al., 2005)、菠萝(Trusov and Botella, 2006)、薄皮甜瓜(郭庆勋等, 2006)等作物中克隆得到 ACC 合成酶基因。

比较已发表的 ACS 基因核苷酸和氨基酸序列,发现所有已知植物的 ACS 多基因家族的编码区内 DNA 序列都有约 60%的同源性,氨基酸序列同源性一般为 48%~97%,蛋白质同源性为 50%~95%,mRNA 的分子量为 1.8~2.1kb 左右。其中,最大的同源性部分在多肽的中部,差异最大的是在 C 端。

(2) ACO 基因的克隆

ACO 存在同工酶, 其基因由多基因家族编码, ACC 氧化酶基因最早从番茄 cDNA 文库中克隆出来(Holdsworth et al., 1988), 现已从桃(Callahan et al., 1992)、苹果(Dong et al., 1992)、鄂梨(McGarvey and Christoffersen, 1992)、甜瓜(Lasserre et al., 1996)、哈密瓜(陆璐和王鸣, 2000)、柿果实(饶景萍等, 2002)、康乃馨(张树珍等, 2002a, 2002b)、樱桃(王俊英等, 2002)、香石竹(余义勋等, 2002; 刘会超等, 2005)、甘蔗(王自章等, 2003; 王爱勤等, 2006)、番木瓜(Lopez-Gomez et al., 2004)、芫菁叶(Del Carmen Rodriguez-Gacio et al., 2004)、欧洲山毛榉(Calvo et al., 2004)、河套蜜瓜(邵丽华等, 2004)、香蕉(Do et al., 2005; 黄俊生等, 2005)、白兰瓜(杨甲定和钟海文, 2005)、花椰菜(陈银华等, 2005)、粉蕉(黄永红等, 2006)、辣椒(陈银华等, 2006)、梨(胡钟东等, 2006)、酸橙(吴波等, 2006)、富有柿果(张丽等, 2007)等植物中克隆得到 ACC 氧化酶基因。

比较已报道的 ACO 氨基酸序列, 发现 ACO 基因编码 320 个左右的氨基酸, 最大的同源性部分也是在多肽的中部, 差异最大的在 C 端。在多肽的中部其编码氨基酸同源性均比 ACS 基因高, 达 80%以上。

1.1.2 ACS 和 ACO 启动子研究

启动子在基因表达调控中起重要的作用, 目前对植物 ACS 基因启动子的研究主要集中在果实相关基因启动子上。研究较深入的有番茄 E4 基因、E8 基因、多聚半乳糖酸酶 PG 基因和 2AII 基因的启动子, 苹果的果实成熟相关 ACO 基因及 PG 基因启动子。这些启动子都与果实成熟过程中的基因表达有关, 但彼此同源性很小, 仅在 29%以下。已有一些蛋白质因子结合区及顺式作用元件序列被确定, 这些序列表明果实特异性表达相关顺式元件和乙烯应答反应元件处于启动子的不同区域。通过构建 E8 基因的 5'和 3'两侧的不同缺失类型及分析 E8 基因的启动子在转基因番茄的表达, 发现有三个以上的 5'区和一个 3'区与果实成熟过程中 E8 基因的表达有关, 其中与乙烯反应有关的调节区位于-2181~-1088 区, 序列分析发现该反应区与 E4 基因启动子上的乙烯反应区(-193~-86)存在多个短的同源序列(Deikman et al., 1992)。从病原相关蛋白基因 PRB-1b 的启动子上游区鉴定出的部分序列与菜豆几丁质酶基因中应答乙烯的元件有部分的同源性(Meller et al., 1993)。香蕉果实 ACS 基因启动子区与番茄 PG 基因、E8 基因、果实特异性蛋白基因 M3763、苹果果实 ACO 基因、PG 基因; 猕猴桃 PG 基因启动子序列相比较, 其相似性为 21.9%~25.0%。该启动子中虽未发现有与番茄 E4、E8 位点及乙烯应答元件相一致的序列, 但功能表达研究表明, 该基因 5'旁侧区确有启动子的功能, 即指导基因在果实中特异性转录的活性(Wang et al., 2001)。

1.1.3 ACS 和 ACO 基因表达研究

植物 ACS 和 ACO 基因的表达受激素诱导。已报道的诱导 ACS 基因的激素主要有生长素(IAA)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)、乙烯、细胞分裂素等。诱导 ACO 基因的激素仅见乙烯、ABA 和 IAA。同时机械伤害、渍水、臭氧、病原体侵染、光温、干旱等环境胁迫以及植物在自然条件下开花、传粉、果实成熟、衰老等过程均可诱导植物 ACS 和 ACO 基因的表达。

植物 ACS 和 ACO 基因在植物的营养器官的表达上,以根部和叶片表达效果好。而在生殖器官上,花和果实均有表达,花以子房组织表达最为强烈,而果实以中柱组织表达最为强烈。

基因表达研究表明,大多数 ACS 基因主要在转录水平上受调节,而 ACO 基因不仅在转录水平上存在差异,在翻译水平上也有明显差异。ACS 基因的转录水平并不与 ACS 酶活性水平同步递增。番茄 ACS 基因家族中,各成员虽是同工酶基因,但在转录水平上,不同的条件或因素均可诱导不同的基因家族成员表达,且各成员在转录水平上也有差别,目前未发现能在伤害型、激素型、成熟型三种条件下高效表达的 ACS 基因。猕猴桃不同品种间乙烯释放量差异较大,转录水平也不同,但 ACO 基因 mRNA 在转录水平上没有大的差异,说明 ACO 基因的表达水平和翻译水平的高低,可能是导致植物乙烯生成的组织差异性的主要原因之一,ACO 基因的表达可能是在翻译水平上协同其他因子调控成熟与衰老的进程。

在乙烯生物合成过程中,尽管 ACS 酶和 ACO 酶的活性都在不断提高,与乙烯释放量的增加趋势一致,但两种酶的基因在转录水平上的变化趋势不同。ACO 基因的转录水平与酶活性及乙烯产量增加是一致的,但 ACS 基因的转录水平并不总是反映到酶的活性水平上去(Lasserre et al., 1997),且不同的 ACS 基因在转录水平上也有明显的差异(Yip et al., 1992)。有研究表明,诱导乙烯合成达到高峰以后,乙烯产量会迅速下降,这可能是 ACS 酶或 ACO 酶活性下降的结果。但 ACS 酶活性的下降可能是 ACS 蛋白质迅速降解造成的(Kim and Yang, 1992),而 ACO 酶活性的下降则可能是其他生理因素造成的,其蛋白质还可继续积累(McGarvey and Christoffersen, 1992)。

1.1.4 ACS 和 ACO 转基因研究

乙烯是控制果实成熟的主要激素,而 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶是控制乙烯合成的主要酶类,所以通过构建 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的反义基因进行转基因来抑制 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的表达,从而控制乙烯的合成已成为一个热点。

在番茄中有关 ACC 合成酶的转基因研究最多。Oeller 等(1991)将 ACC 合成酶的反义基因导入番茄中去获得转基因植株;1994 年汤福强等也获得了 ACC 合成酶反义基因转基因番茄植株并对其部分生理特性进行了研究;刘传银等(1998)将 ACC 合成酶 cDNA 通过农杆菌途径转化番茄外植体获得了表达 ACC 反义 RNA 的转基因番茄植株,进而获得了耐储藏转基因番茄纯合体系;张晓海等(2001)将 ACC 合成酶反义 RNA 2 核酶嵌合 DNA 序列重组于植物表达载体 pGA 643 中,用三亲融合法导入农杆菌 LBA 4404 中,叶盘法转化番茄子叶,获得了再生小植株。

在其他植物中,也有大量的转基因研究。利用从番茄果实中分离得到的 ACC 合成酶 cDNA,反向置于 CaMV35S 启动子的控制之下,转入烟草进行研究,发现其导致了反义基因的导入导致了转基因烟草在组织培养过程中芽再生能力的增强,表明乙烯在芽形成过程中具有重要的调控功能(马庆虎和宋艳茹, 1997);王春霞等(1997)完成 ACC 合成酶反义基因对西瓜的遗传转化;李天然等(1999)将番茄 ACC 合成酶反义基因转化河套蜜瓜;鲍国强等(2002)人工合成番茄 U 3snRNA 基因上游启动区,构建到番茄 ACC 合成酶的反义 RNA 2 核酶嵌合 DNA 序列的上游,然后将嵌合序列插入到植物双元表达载体 pGA 643 导入农杆菌 LBA 4404

中,构建了 ACC 合成酶反义 RNA 2 核酶嵌合基因的植物表达载体;宋喜贵等(2003)将番茄 ACC 合成酶反义基因利用农杆菌介导载体法转入猕猴桃中,通过抑制其内源乙烯的合成,从而延缓植株衰老及提高果实耐储藏性;郭庆勋等(2006)克隆了薄皮甜瓜果实 ACC 合成酶基因,并构建成 E8 调控下 ACS 基因反义表达载体,通过冻融法将携带反义 cDNA 的植物表达载体质粒转入根癌农杆菌 LBA4404,得到了完整的 Ti 质粒表达载体系统。

在 ACC 氧化酶方面,哈达等(2001)合成和克隆了蜜瓜 ACC 氧化酶 mRNA 的成串锤头型核酶和反义 RNA 基因;张树珍等(2002)把康乃馨 ACC 氧化酶基因的 cDNA 序列分别以反向插入 CaMV 35s 启动子和花特异表达启动子 PchsA 的后面构建了两个反义植物表达载体;徐晓峰等(2003)以青花菜的下胚轴和带 1~2mm 子叶柄的子叶为转化受体,建立了根癌农杆菌介导的转化体系,获得了含番茄果实 ACC 氧化酶反义基因的转基因植株;陈银华等(2005)用 BP 克隆的方法构建花椰菜 ACO 基因的 RNA 干扰(RNAi)载体 pHBACO,对花椰菜进行遗传转化,获得卡那霉素抗性转化植株 5 棵,发现转基因植株内源 ACO 基因转录的 mRNA 被降解,ACC 氧化酶活性分析进一步表明,外源基因的导入大大地降低了 ACC 氧化酶活性。

1.2 亲环素基因研究概况

亲环素蛋白(Cyclophilin)是发现于 1984 年的一胞浆蛋白,其广泛存在于动植物细胞内,因其能与免疫抑制剂环孢霉素 A 结合而得名(Handschumacher et al., 1984)。目前已发现和克隆的亲环素有 130 多种异构体,它们构成了亲环素家族。亲环素蛋白的生理功能大致可以分为细胞内生理功能和细胞外生理功能。其细胞内生理功能主要有,其一它是一类肽酰脯氨酸顺反异构酶(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase), (Gothel and Marahiel, 1999),是蛋白质折叠的限速酶,亦是蛋白质折叠、运输、装配以及细胞周期调节的关键点(Freskgard et al., 1992),能够催化体内蛋白质的折叠,并起着分子伴侣的作用(郭敏杰等, 2004);其二为它的免疫抑制调节功能,它可与从真菌代谢产物中分离得到的 CsA 相结合,使后者具有高效的免疫抑制性能,在用于自身免疫性疾病如红斑狼疮、皮肤炎等和器官移植治疗中发挥重要的作用(Handschumacher et al., 1984);其三为它参与介导细胞凋亡功能,亲环素蛋白与参与细胞凋亡的主要内切酶——NUC18 在氨基酸序列上比较类似,且重组的亲环素蛋白有依赖 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 核酸酶活性,并有降解单双链 DNA、超螺旋 DNA 和 RNA 的作用。目前对亲环素功能的研究大部分都集中在细胞内,从近年来的研究结果看亲环素在细胞外同样具有重要的功能,亲环素具有诱导趋化作用,并能够促使 T 细胞对细胞外矩阵的调停作用(Allain et al., 2002)。同时亲环素在内质网内与 Ca^{2+} 结合蛋白-钙网蛋白共存,表明其在 Ca^{2+} 信号传递过程中起重要作用(Sigal and Dumont, 1992)。另外,亲环素蛋白可能也具有分子伴侣(molecular chaperones) (Baker et al., 1994)、细胞趋化因子(chemotactic agent) (Xu et al., 1992)以及激蛋白(stress response protein) (Marivet et al., 1994, Lhoest et al., 1998)等生物学功能。由于亲环素分布的广泛性及其结构的高度保守性,使其不仅在细胞的生命活动起着重要的作用,而且也与一些免疫疾病密切相关。在植物中亲环素蛋白的研究起始于蕃茄、玉米以及油菜的基因克隆(Gasser et al., 1990)。而后以发现亲环素在高水平地表达于植物旺盛的分生组织(Saito et al., 1999),并在植

物抵御逆境(Kullertz et al., 1999)以及新陈代谢调控(Oh et al., 2006)中均起到重要的作用。

亲环素在植物体中的表达和功能调控都具有典型的特点。Saito 等(1999)利用 Northern 和组织化学技术研究了拟南芥两个亲环素基因的组织特异表达, 其中之一高表达于维管组织和花, 另一个高表达于幼叶中。Kullertz 等(1999)利用毛花洋地黄 *Digitalis lanata* 的原胚状体(proembryonic masses, PEMS), 在寒冷、激素或渗透等胁迫条件下, 植物体的亲环素表达水平相应提高, 这增加了植物体在低温冷藏时的冷冻耐受力, 但并不能够完全抵御冻融的胁迫。Oh 等(2006)在番茄中发现并鉴定了一个编码亲环素蛋白的 *dgt* (auxin-resistant diageotropica)基因单核苷酸突变株, 突变株典型的生理特征为对重力的响应(gravitropic responses)迟缓、缺乏侧根、顶端优势减少等, 表明亲环素蛋白在植物生长素信号转导途径中发挥了重要作用, 并且可能与植物抵御冷害等机制有关。

1.3 茶树中这三个基因相关研究

在茶树中乙烯合成过程中的相关酶类研究不是很多, 主要以 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosyl methionine synthase, SAMS)为主。S-腺苷蛋氨酸合成酶在催化形成 SAM 过程中为 S-CH₃ 基供体, 虽然不是乙烯产生的限速步骤(罗云波和申琳, 1995), 但是 S-腺苷甲硫氨酸(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(Woodson et al., 1992), 因而对 SAM 合成酶的研究无论是在植物逆境生理、衰老生理还是茶树咖啡因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)抽提茶叶中的总 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 1303bp, 编码 394 个氨基酸, 并通过比较证明与其他植物的此基因有较高的同源性。乙烯合成过程中另外两个重要的酶基因 ACS 及 ACO 还没有在茶树上进行研究。

亲环素的研究近几年主要集中在其蛋白质生物功能的研究, 基因水平上的研究主要在动物上进行, 而茶树亲环素的相关报道还基本处于空白状态。

1.4 植物基因克隆的常用方法

分离和克隆基因是研究基因结构、功能以及表达的基础。随着分子生物学技术的发展, 先后出现了许多种基因克隆的方法, 例如图位克隆技术(Map based cloning or positional cloning)、差异表达基因分离技术(Differentially expressed gene cloning method)、转座子标签技术(Transposon tagging)以及表达序列标签(Expressed sequence tagging, EST)法、简并 PCR 技术(Degenerate PCR)、DNA 末端快速扩增技术(Rapid Amplification cDNA Ends, RACE)和 RT-PCR 等。由于许多书刊均有详细的方法介绍, 在这里不再赘述, 只是简要介绍一下本论文用到的几种方法。

1.4.1 简并 PCR 技术

简并 PCR 可用于搜索一个基因家族的新成员、不同物种的同源基因或相关病毒。随着人类基因组计划即将完成, 以及一些模式生物如酵母、线虫、果蝇、小鼠、拟南芥、水稻和一些原核生物的基因组的全序列已经被测定或即将被测定完成的情况下, 在 GenBank 中积累了大量未知功能的 DNA 序列, 识别和鉴定其中的新基因, 以及对其功能开展研究是进一步深入研究的必然。PCR 技术已经成为分子生物学中的常规技术。PCR 最初是为扩增已知序列设计的, 简并 PCR 技术却能扩增未知序列。当待研究的基因序列不明, 仅知其一部分蛋白质的氨基酸序列时, 可根据氨基酸序列合成一组简并引物, 进行 PCR 扩增, 对基因家族中的未知成员(基因)进行分离。

简并 PCR 技术的应用范围主要在两个方面: 一是当分离出一种新蛋白并测定了其中的一段氨基酸序列, 要进一步寻找相应的基因时, 可以使用简并 PCR 技术; 二是用简并 PCR 易于找到具有进化上保守结构域的蛋白质家族新成员的基因。由于几乎所有蛋白质都具有与其他蛋白质的相似性, 并经常具有共同的进化起源, 通过比对许多相关蛋白质的氨基酸序列, 便能找到保守的蛋白质结构域, 这些结构域可被用来设计简并引物, 进行简并 PCR(王洪振和周晓馥, 2003)。

1.4.2 RACE 技术

RACE 技术是由 PCR 技术发展而来, 它是利用在 cDNA 末端加上接头(引物), 和基因特异性引物通过 PCR 反应快速获得目的基因的 5'端(5'End RACE)和 3'端(3'End RACE)。

3'-RACE 利用 mRNA 3'末端天然存在的 Poly (A) 尾作为 PCR 扩增的通用引发点, 首先用反转录酶和 Oligo-dT 接头引物对 mRNAs 进行反转录, 使之转换为 cDNA。然后, 用一个能与已知外显子序列区退火的基因特异引物(GSP)和定位在 Poly (A) 尾部的接头引物直接进行 PCR, 扩增特异 cDNA。这样, 就能捕获位于外显子和 Poly (A) 尾之间的未知 3' -mRNA 序列(如图 1-2 所示)。

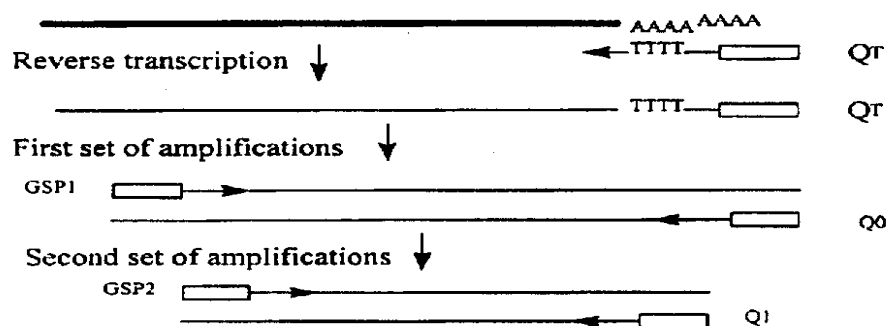


图 1-2 3'-RACE 的技术流程示意图

Fig.1-2 Summary of 3'-RACE procedure

5'-RACE 是一种从低拷贝信息中分离和鉴定 5'-末端未知序列的方法。Frohman 和 Loh 都综述过此法(Frohman et al., 1988, Loh et al., 1989)。尽管不同的使用者采用的具体的步骤略异,但策略是一致的。第一链 cDNA 的合成使用基因特异的反义寡核苷酸(GSP1)引发,使特异的 mRNA 及其相关家族转换为 cDNAs,使完全延伸到 5'-末端的潜力达到最大。第一链 cDNA 产物经纯化,去除未渗入的 dNTPs 和 GSP1,用末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)在 cDNA 的 3'-末端加同聚尾[poly (T) 或 Poly (C)]。最初,加尾后的 cDNA 用 3 个引物的混合物(在 GSP1 的 3'-末端退火的基因特异性引物 GSP2、互补的含同聚尾的锚定引物和相应的接头引物)进行 PCR 扩增,这使 mRNA 的 5'-末端和 GSP2 间的未知序列得以扩增(如图 1-3)。

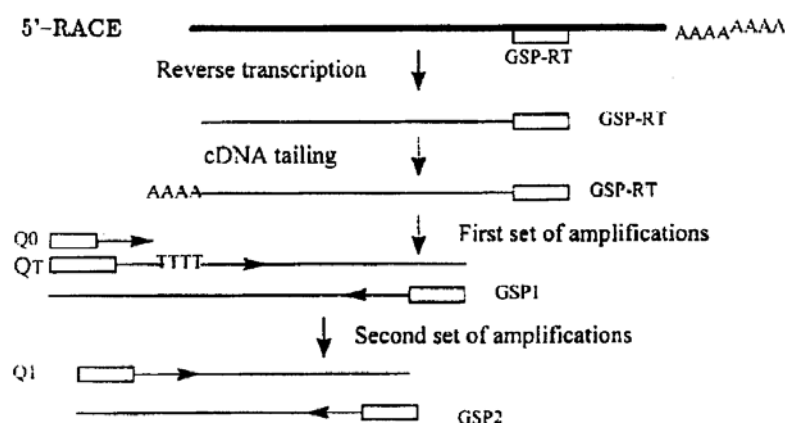


图 1-3 5'-RACE 的技术流程示意图

Fig.1-3 Summary of 5'-RACE procedure

1.4.3 表达序列标签法

EST 是完整基因上能特异性标记基因的一部分序列,大规模 EST 克隆和资料库的建立,为利用生物信息学克隆基因提供了条件。其基本原理是从组织特异性或细胞特异性的 cDNA 文库中随机挑选克隆,并进行 5'和 3'端部分测序,通过对基因库的检索,可以检测所测序以及翻译的多肽氨基酸序列与基因库中已知的是否有同源性,最后对发现的新基因进行突变检测和表达分析。这样不仅可检测到许多已知的基因,更可以发现许多未知的基因。

该技术建立在大量已有的生物信息资源基础上的,同时结合了目前的新技术,为大规模克隆基因提供了捷径。EST 具有广泛的用途:利用对独立 EST 的拼接可获得新基因的全长 cDNA 序列;利用 EST 标签克隆的斑点杂交可鉴定涉及组织或器官发育过程不同阶段各个基因表达的不同,与其它差别杂交方法相比,它能进行初步筛选和鉴定,因而节省了时间;凭借 EST 上分析获得的数据信息,对感兴趣的 EST 进行功能验证,并可依此设计引物,克隆基因全长(陈亮等, 2004);通过构建 cDNA 文库,可得到有关植物的 EST,从而可了解生长发育过程中不同的基因表达,为育种改良打下基础(王志成等, 2005)。

1.5 基因表达的分析方法

基因表达的分析即比较不同组织和不同发育阶段、正常状态与疾病状态，以及体外培养的细胞中基因表达模式的差异，因而必需涉及在不同组织、器官和不同生理状态下表达基因的分离。基因表达差异方面的研究是了解生物分化和发育机制的最有发展前景的方法之一。

研究基因表达的方法很多，但多数是通过 mRNA 的丰度来反映，原因之一是基于蛋白质的研究方法通常较复杂，敏感度和产率均较低；更重要的一点是 mRNA 的水平能够代表细胞的状态及基因的活性；并且，对大多数的基因而言，mRNA 丰度的改变与蛋白质丰度的改变相一致。目前，在研究转录水平方面的新技术的发展和改进加速了对基因表达的分析，这些新的高通量表达分析方法主要有：cDNA 微阵列（cDNA microarrays）、代表性差异分析（representational difference analysis, RDA）、基因表达系列分析（serial analysis of gene expression, SAGE）、EST 等，这些技术可以同时在 2 个或多个实验样品之间对几乎所有的差异表达的基因进行分析。然而，在分析少数几个基因的表达情况时，一些常规的基因表达分析方法，如半定量 RT-PCR 却更为实用。

半定量 RT-PCR 法是目前探讨基因转录水平的有效手段，基于在一定的 RNA 模板量及循环次数范围内，RT-PCR 的扩增产量与上述两因素呈线性正相关，通过 RT-PCR 反应，可用来检测基因表达及其变化状况，并可进行半定量分析。

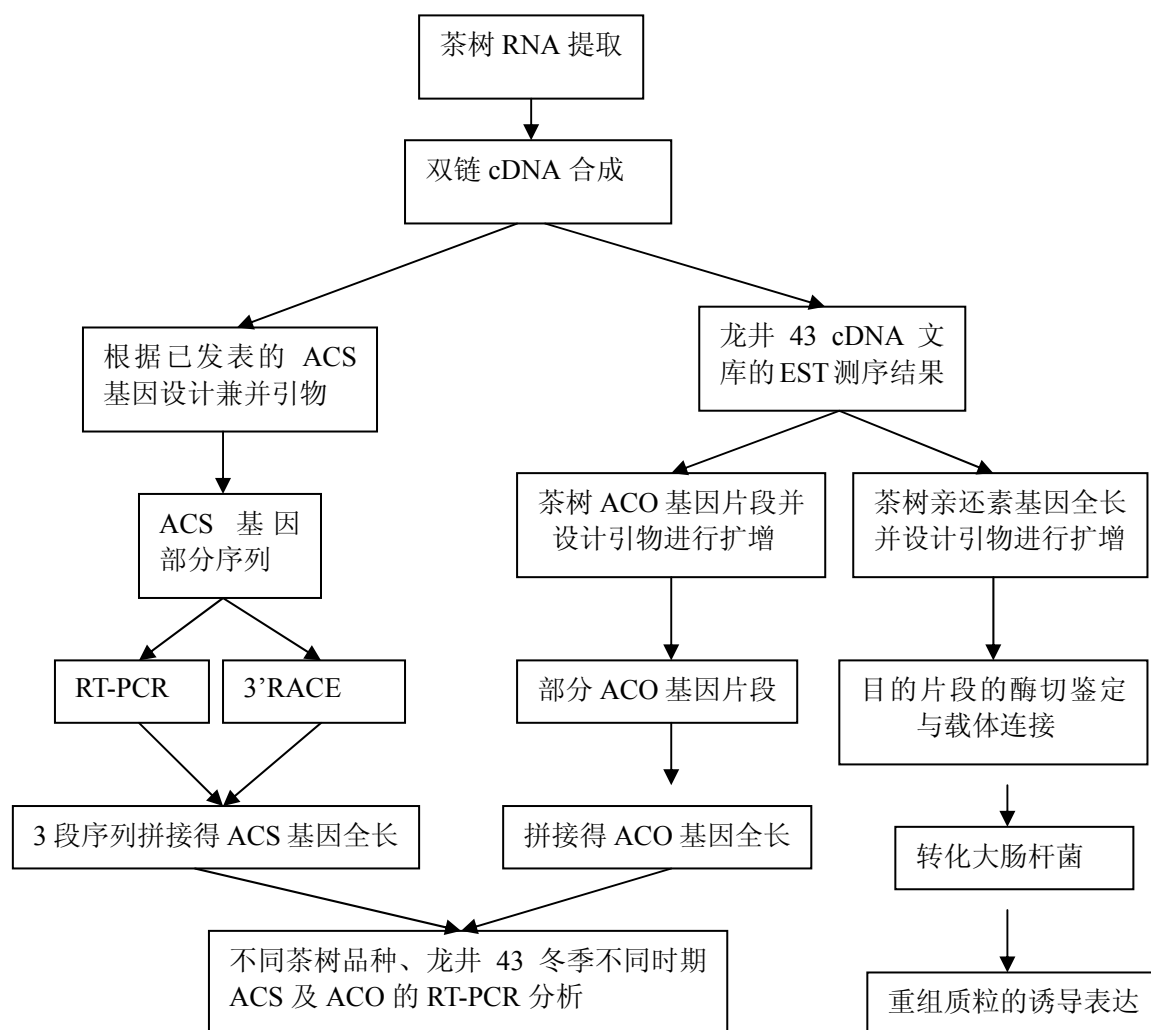
β -actin 常用来作内参照，actin 是细胞中一种重要的蛋白，是细胞骨架的成分，所有的器官组织具有细胞质来源肌动蛋白，通常用于构建细胞微丝，其表达量相对稳定，是国内外广泛使用的内参照，在相似模板量的条件下，用基因特异性引物对样品进行扩增。电泳条带经密度扫描仪扫描，得到待测基因与内参照条带各自的峰面积积分值，计算各个样品两者的比值，为了使扩增条带密度扫描的峰面积积分值尽可能的准确可靠，电泳条带一定要清晰，不能有杂带出现。

1.6 本论文的研究目的及意义

ACS 和 ACO 基因是乙烯合成中的重要酶基因，对乙烯的合成有着重要的调控作用，而乙烯又是一种重要的植物激素，参与植物的整个生理过程，尤其参与植物的逆境胁迫响应。因此，克隆获得茶树这两个酶基因的全长序列，并结合不同品种、不同时期（逆境）条件下这两个基因表达情况的分析，将对后期从分子生物学水平上调控乙烯生物合成，从而提高茶树抗逆性具有重要的理论与实践意义。

亲环素是一种具有多种生物功能的蛋白，研究表明在寒冷、激素或渗透等胁迫条件下，植物体的亲环素表达水平相应提高。分离获得茶树亲环素的全长基因，在大肠杆菌中亲环素融合蛋白的表达，对于从基因水平和蛋白水平上研究它在茶树生理和调控机制中发挥的作用奠定基础。

本实验的研究流程如下：



第二章 茶树 ACS 基因的克隆及 RT-PCR 分析

从 Met(蛋氨酸)→SAM(腺苷蛋氨酸)→ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸)→乙烯的合成过程中, 每一步都是在特定的酶催化下完成的。ACS 作为乙烯合成过程中的重要限速酶, 催化 SAM 形成 ACC, 对乙烯合成具有重要的调控作用。

根据 GenBank 上其他植物的 ACS 基因氨基酸保守序列设计兼并引物得到茶树 ACS 基因的部分序列, 然后在此序列的基础上利用 3'RACE 及 RT-PCR 法分别获得了 3'及 5'序列, 三个片段经拼接获得茶树 ACS 全长基因, 并对此序列进行了生物信息学分析, 同时取不同品种在经历夏季高温和冬季低温后, 以及龙井 43 在冬天不同时期低温驯化后 RNA 样品, 进行 RT-PCR 分析, 以期阐述 ACS 基因在不同品种经历高温与低温后、以及龙井 43 在经历低温的不同时期的相对表达含量, 从而探讨这个限速酶基因的表达丰度与茶树抗逆之间可能的关系。

2.1 材料

2.1.1 实验材料

表2-1 实验材料及其取样时期
Table2-1 Tea cultivars and sampling time

采样时期	品种							用途
2006 年春季	龙井 43							基因克隆
2006.8.20	安吉白茶	6/8	杭州大叶	龙井长叶	藪北	龙井 43	福鼎大白茶	不同品种间、
2007.1.17	安吉白茶	6/8	杭州大叶	龙井长叶	藪北	龙井 43	福鼎大白茶	龙井 43 冬季
2006.11.5	龙井 43							不同时期基
2006.12.6	龙井 43							因 表 达 的
2007.1.4	龙井 43							RT-PCR 分析
2007.2.5	龙井 43							
2007.3.6	龙井 43							

以上材料均种植于中国农业科学院茶叶研究所内的国家种质杭州茶树圃, 经液氮迅速冷却后保存于-80℃冰箱中备用。

2.1.2 常用溶液

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

LB 液体培养基 (1 L): 蛋白胨 10 g, 酵母 5 g, NaCl 5 g, 高压灭菌

含氨卞青霉素的 LB 液体培养基：在灭菌后的 LB 液体培养基加入氨卞青霉素，使其终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$

5×TBE (1L)：54 g Tris 碱，27.5 g 硼酸，20 ml 0.5 M EDTA(pH8.0)

2.2 方法

2.2.1 总 RNA 的提取

2.2.1.1. 试验用品的预处理

抽提 RNA 过程中所用的研钵、枪头、1.5ml 离心管均需做如下处理（需在通风橱中进行操作）：

- （1）在烧杯中注入去离子水，加入 DEPC 使其终浓度为 0.1%；
- （2）将待处理的物品放入 0.1% DEPC- H_2O ，并使所有部分都浸泡其中，在通风橱中处理过夜；
- （3）将处理过的用品用报纸包好进行高温高压蒸汽灭菌；
- （4）将灭菌的制品在 80℃ 下，烘烤干燥，备用；
- （5）另外将实验所用到的 dd H_2O 中加入 DEPC 使其终浓度为 0.1%，过夜，同样进行高压灭菌备用；

2.2.1.2 RNA 提取步骤

以龙井 43 春茶新梢为材料，采用 Trizol（Invitrogen）试剂盒进行总 RNA 的抽提，具体方案如下：

- （1）取约 100 mg 春茶新梢放入研钵，迅速加入液氮冷冻研磨成粉末状，并用枪头将其转移到预先盛有 100 mg PVP 的 1.5 ml 离心管中，迅速加入 1000 μl Trizol，颠倒混匀，在室温下放置 10 min 溶解；
- （2）加入 200 μl 氯仿，剧烈振荡 15 s；放置 3 min
- （3）4℃ 12000 r/min 离心 15 min，取上清；
- （4）加入 500 μl 异丙醇，室温放置 10 min，4℃ 12000 r/min 离心 15 min，去上清；
- （5）加入 1ml DEPC 水配制的 75% 乙醇，洗涤沉淀三次，于 4℃ 7500 r/min 离心 5 min，去上清；
- （6）放于通风橱吹干；
- （7）加入 20 μl DEPC 水溶解；
- （8）取 3 μl RNA 加入 2 μl 6×loading Buffer 于 100V 进行 1% 琼脂糖电泳检测。

2.2.2 ACS 基因中间序列的获得

2.2.2.1 cDNA 一链合成

利用 mRNA 的 PolyA 尾可以与反转录引物 Olig(dT)₁₈ 的多聚 T 结合的特点，提取的 RNA 利

用宝生物工程（大连）有限公司AMV Reverse Transcriptase进行反转录，具体方案如下：

（1）在 200 μ l RNase-free 的离心管中混合下列成分：

Total RNA	2 μ l
Oligo (dT) ₁₈	1 μ l

加 DEPC 处理水至 15.5 μ l；70°C，5 min 变性，立即放到冰上；

（2）然后依次加入下列试剂：

First Strand 10 \times Buffer	2 μ l
RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)	0.5 μ l
AMV Reverse Transcriptase	2 μ l

将上述混合液 30°C 水浴 10 min, 42°C 水浴 1 h, 80°C 2 min 变性后稀释 10 倍-20°C 保存备用。

2.2.2.2 引物设计

根据已发表的 ACS 基因保守序列，ClustW 分析，设计兼并引物：

JB3: 5'-GTT ATY CAR ATG GGW CTY GC'-3'

JB4: 5'-ACW ARA CCR AAA CTY GAC AT-3'

Y: C/T, R: A/G, W: A/T。预期的 PCR 产物约 800bp

2.2.2.3 PCR 片段的获得

PCR 反应体系如下：

上述反转录 cDNA	1 μ l
10 \times PCR Buffer (含Mg ²⁺)	5 μ l
dNTP (2.5 μ M)	4 μ l
JB3 (10 μ M)	6 μ l
JB4 (10 μ M)	6 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l
补灭菌ddH ₂ O至	50 μ l

PCR 反应条件：

94°C 变性 3 min

94°C 变性 30 s	} 35 cycles
50°C 退火 30 s	
72°C 延伸 45 s	

72°C 延伸 10 min

将PCR产物用灭菌ddH₂O 10 倍稀释，取 1 μ l做模板同条件进行二次PCR。

2.2.2.4 PCR 产物的回收纯化

产物的纯化采用北京百泰克生物技术的凝胶回收试剂盒，操作如下：

- (1) 将 PCR 产物点 1.0 %琼脂糖凝胶电泳将目的 DNA 片段分开, 在紫外灯下用干净的手术刀割下要回收的 DNA 的琼脂块, 所割的琼脂块要尽量小;
- (2) 将切下的含有 DNA 条带的凝胶放入 1.5 ml 离心管, 称重;
- (3) 按每 100 mg Agarose 胶加入 300 ml Binding Buffer, 置于 56°C 水浴 10 min, 中途混匀几次, 至胶完全融化;
- (4) 按 100 mg Agarose 胶加入 150 μ l 异丙醇, 震荡混匀;
- (5) 将上一步所得溶液加入吸附柱 AC 中, 室温 12000 r/min 离心 30-60 s, 倒掉收集管中的废液;
- (6) 加入 700 μ l 漂洗液 WB, 室温 12000 r/min 离心 1 min, 倒掉废液;
- (7) 加入 500 μ l 漂洗液 WB, 室温 12000 r/min 离心 1 min, 倒掉废液;
- (8) 将吸附柱 AC 放入一个新的 1.5ml 离心管中, 在柱子的中央加 30 μ l 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min, 12000r/min 离心 1 min。

2.2.2.5 感受态细胞的制备、连接和转化

1) 感受态细胞的制备 (CaCl₂法)

- (1) 挑取 TG1 单菌落, 转到 10 ml LB 液体培养基中 37°C 过夜培养;
- (2) 取 100 μ l 转接到 10 ml LB 液体培养基中 37°C 培养 2-3 h, 将菌液分装到 1.5 ml 离心管中, 在冰中放置 10 min;
- (3) 4000 r/min 4°C离心 1 min, 倒去上清, 用 150 μ l 预冷的 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 悬浮细胞, 冰上放置 3 min, 4000 r/min 4°C离心 1 min, 倒去上清;
- (4) 重复一次, 用 50 μ l 的 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 悬浮细胞, 加入 20% 甘油, 迅速放于 -80°C 冻存;

2) PCR 纯化产物与载体的连接

用一些高温 DNA 聚合酶, 如 *Taq* DNA 聚合酶、T₄ DNA 聚合酶等进行 PCR 扩增时, 当产物最终在 70°C 放置 10 min 时, *Taq* 酶在扩增产物 3'-端加上一个突出碱基 A, 这样的 PCR 产物就能和末端带有碱基 T 的 T-的载体 Toyabo pTA2 内 (购于北京鼎国生物技术有限责任公司), 这样 PCR 产物就能很方便地克隆到载体中。

在 200 μ l 的 PCR 管中加入:

Toyabo pTA2 Vector	0.5 μ l
PCR 纯化产物	6.5 μ l
2 \times ligation buffer	2 μ l
T4 连接酶	1 μ l

4°C 连接过夜。

全量 (10 μ l) 转化感受态细胞 100 μ l。

3) 转化

- (1) 融化的 100 μ l 感受态细胞中加 10 μ l PCR 连接产物, 混匀, 冰上放置 30 min;
- (2) 混合物置于 42°C 水浴准确热激 90 s, 迅速移至冰上 5 min;
- (3) 加入 800 μ l 无氨苄的 LB 液体培养基, 于 37°C, 150 r/min, 摇振 1h;

(4) 5000 r/min, 4°C 离心 2min, 吸取上清, 剩约 200-300 μ l;

(4) 反复吸打将剩余菌液悬浮, 与 4 μ l IPTG, 40 μ l X-gal 混匀, 涂于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的平板上, 待菌液被平板吸收后, 将平板放在 37°C 温箱中倒置培养过夜。

2.2.2.6 单菌落 PCR 检测并测序

用灭菌的牙签从白色菌落中挑取少量细菌, 进行 PCR 检测。

反应体系:

10 \times PCR Buffer (不含Mg ²⁺)	2 μ l
Mg ²⁺	1.2 μ l
dNTP (10 μ M)	0.4 μ l
M13 正向 (10 μ M)	0.4 μ l
M13 反向 (10 μ M)	0.4 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
补灭菌ddH ₂ O至	20 μ l

依次挑取白色菌斑取少量放入 PCR 反应液

PCR 程序:

94°C 变性 3 min

94°C 变性 30 s	} 35 cycles
50°C 退火 30 s	
72°C 延伸 1 min	

反应结束后取 6 μ l PCR 产物与 2 μ l 6 \times loading Buffer 混匀, 100V 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 检测是否有相应大小的条带。

挑取经 PCR 验证的菌落接种于 LB 液体培养基中, 过夜培养至对数生长期, 送至华大基因研究中心杭州华大生物技术有限公司测序。

2.2.3 ACS 基因 3' 端序列的获得

2.2.3.1 cDNA 第一链合成

以上述所提总 RNA 为模板, 依据 Invitrogen 3'RACE 原理, 合成反转录引物:

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACTTTT TTT TTT TTT TTT T-3'

利用 SuperScript II RT 进行反转录合成一链 cDNA。

反转录体系:

模板总 RNA	4 μ l
反转录引物 (50 μ M)	1 μ l
dNTP(10 μ M)	1 μ l
补ddH ₂ O至	12 μ l

将上述混合物 65°C 水浴 5min 后放置冰上, 瞬间离心后加入:

5×First-strand Buffer	4 μ l
0.1 M DTT	2 μ l
RNase Out	1 μ l

混匀 42℃水浴 2 min，后加入 1 μ l SuperScript II RT,42℃水浴 50 min，70℃水浴 15 min 以终止反应。稀释 10 倍-20℃保存备用。

2.2.3.2 引物设计及 PCR 扩增

根据上述测序所得的 ACS 基因中间序列设计引物

上游引物 GSP1: 5'-AAT AAT CCC AAA GCC TCC AT-3'

GSP4: 5'-TGC TGC CAC AGT TTT CAA TC-3',

下游锚定引物 AUAP: 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT-3'

以反转录 cDNA 为模板 GSP1 与下游锚定引物进行 PCR 扩增，反应体系：

上述反转录 cDNA	0.4 μ l
10×PCR Buffer (Mg^{2+} (-))	2 μ l
Mg^{2+}	1.2 μ l
dNTP (10 μ M)	0.4 μ l
GSP1 (10 μ M)	0.4 μ l
锚定引物 (10 μ M)	0.4 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
补灭菌ddH ₂ O至	20 μ l

PCR 反应条件：

94℃ 变性 3 min

94℃ 变性 30 s	} 35 cycles
50℃ 退火 30 s	
72℃ 延伸 45 s	

72℃ 延伸 10 min

将 PCR 产物用灭菌 ddH₂O 10 倍稀释，取 1 μ l 做模板 GSP4 与下游锚定引物同体系同条件进行二次 PCR。

2.2.3.3 扩增产物的纯化及克隆测序

将 PCR 产物点 1.0%琼脂糖凝胶电泳，回收纯化约 1000bp 的片段后克隆于 Toyabo pTA2 载体内，挑取阳性克隆送至华大基因研究中心杭州华大生物技术测序。

注：PCR 产物回收同 2.2.2.4，感受态细胞制备以及连接、转化同 2.2.2.5，单菌落检测同 2.2.2.6。

2.2.4 ACS 基因 5' 端序列的获得

2.2.4.1 cDNA 第一链合成

以上述所提总 RNA 为模板，根据上述测序所得的 ACS 基因中间序列

设计反转录引物：CTT TCT GAA CTC TGG CAA

利用 SuperScript II RT 进行反转录合成一链 cDNA。体系方法同 2.2.3.1

2.2.4.2 引物设计及 PCR 扩增

根据 ACS 基因中间序列以及其它 ACS 基因保守区设计 PCR 引物:

AR3: AGA ATG GGA TTT GAR AWT

AR4: AAA TGG AGG CTT TGG GAT

R: A/G, W: A/T。

以反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

PCR 扩增体系如下:

上述反转录 cDNA	0.4 μ l
10 \times PCR Buffer (Mg ²⁺ (-))	2 μ l
Mg ²⁺	1.2 μ l
dNTP (10 μ M)	0.4 μ l
AR3 (10 μ M)	1.6 μ l
AR4 (10 μ M)	0.4 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
补灭菌ddH ₂ O至	20 μ l

PCR 反应条件:

94°C 变性 3 min

94°C 变性 30 s	} 35 cycles
42°C 退火 30 s	
72°C 延伸 45 s	

72°C 延伸 10 min

2.2.4.3 扩增产物的纯化及克隆测序

将 PCR 产物点 1.0%琼脂糖凝胶电泳，回收纯化后克隆于 Toyabo pTA2 载体内，挑取阳性克隆送至华大基因研究中心杭州华大生物技术公司测序。

PCR 产物回收纯化同 2.2.2.4，感受态细胞制备以及连接、转化同 2.2.2.5，单菌落 PCR 检测同 2.2.2.6。

2.2.5 不同茶树品种、龙井 43 冬季不同时间 ACS 基因的 RT-PCR 分析

2.2.5.1 RNA 提取

将表 2-1 中所列的品种样本（2006 年春季采的龙井 43 除外），采用 Trisol 试剂盒进行总 RNA 提取。提取方法同 2.2.2.1

2.2.5.2 反转录 cDNA 一链的获得

提取的 RNA，以 OligdT₍₁₈₎ 为反转录引物，利用 ReverTra Ace (Toyobo) 进行反转录。

反转录体系：

模板总 RNA	2 μ l
OligdT (10 μ g)	1 μ l
dNTP(10 μ M)	1 μ l
5 \times First-strand Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40 U)	0.5 μ l
补 ddH ₂ O 至	19 μ l

将上述混合物 70℃ 水浴 5 min 后放置冰上，瞬间离心，加入

ReverTra Ace(100 U) 1 μ l

混匀 42℃ 水浴 1.5 h，稀释 10 倍 -20℃ 保存备用。

2.2.5.3 RT-PCR 检测 ACS 基因的表达

利用 β -actin 作为内参，以校正 RT-PCR 的结果，使其结果更准确。

β -actin 的引物序列设计如下：

β -actin Upper: 5'-GCA ACT GGG ATG ATA TGG AAA AGA-3'

β -actin Lower: 5'-AAA CGA GGG CTG GAA CAA GAC T-3'

预期的 β -actin 产物分子量为 500 bp 左右。

根据已获得的茶树 ACS 基因全长 cDNA 序列设计引物：

sd1: 5'-AAC CGC AAT CTC ATC CAC AT-3'

sd2: 5'-ATC TAA GTC CTA GCC CGA AC-3'

预期扩增片段大小在 600 bp 左右。

反应体系：

上述反转录 cDNA	2 μ l
10 \times PCR Buffer (Mg ²⁺ (-))	2 μ l
Mg ²⁺	1.2 μ l
dNTP (10 μ M)	0.4 μ l
正向引物 (10 μ M)	0.4 μ l
反向引物 (10 μ M)	0.4 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
补灭菌 ddH ₂ O 至	20 μ l

β -actin PCR 反应条件：

94℃ 变性 3 min
94℃ 变性 30 s
50℃ 退火 30 s
72℃ 延伸 45 s

} 30cycles

ACS PCR 反应条件:

94℃ 变性 3 min
94℃ 变性 30 s
48℃ 退火 30 s
72℃ 延伸 45 s

} 30 cycles

2. 2. 5. 4 Bandscan 分析

PCR 结束后，取 6 μl 反应产物加入 2 μl 6×loading Buffer，100 V 跑 1.0%琼脂糖电泳，电泳结束后在紫外灯下呈相拍照，将相片用 Bandscan 软件进行灰度扫描分析。

2. 3 结果与分析

2. 3. 1 RNA 提取

提取的龙井 43 春茶新梢总 RNA 用 1.0 %琼脂糖电泳对其进行检测，结果如图 2-1 所示，电泳结果可见清晰的 28S 和 18S 和 5.8S 等三条清晰的电泳条带，用紫外分光光度计测其纯度，涌道 2 A260/A280 为 1.9-2.0 左右，总 RNA 纯度较高，完全可以直接作为反转录的模板。

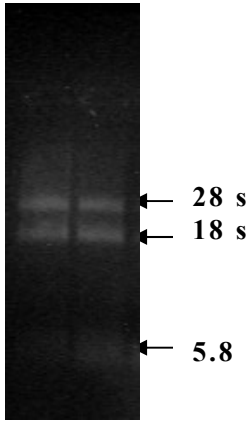


图2-1. 龙井43总RNA的琼脂糖电泳
Fig.2-1 Total RNA of Longjing43 on agarose gel electrophoresis.

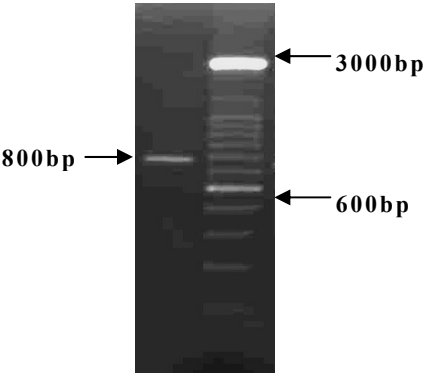


图2-2.ACS cDNA中间片段扩增结果
泳道1: PCR产物 泳道2: Mark分子量标准 DL3000;
Fig.2-2 Amplification of the partial cDNA sequence coding ACS by PCR
Lane 1: PCR Product; Lane 2: DL3000 DNA Marker

2. 3. 2 ACS 基因中间序列的扩增

以反转录的 cDNA 第一链为模板，根据其它物种的 ACS cDNA 的同源序列设计的兼并引

物 JB3 和 JB4, 从茶树 cDNA 中扩增得到 800bp 的 cDNA 片段(图 2), 经 BLAST 分析为 ACS 基因(如图 2-2 所示)。

2.3.3 ACS 基因 3' 端序列的扩增

以反转录的 cDNA 第一链为模板, 根据 ACS 基因测序结果, 利用 invitrogen 3'RACE 原理设计引物, 利用基因特异引物 GSP4 和下游锚定引物 AUAP 进行二次 PCR 扩增所得产物点琼脂糖电泳, 条带约 1000bp, 如图 2-3 所示。

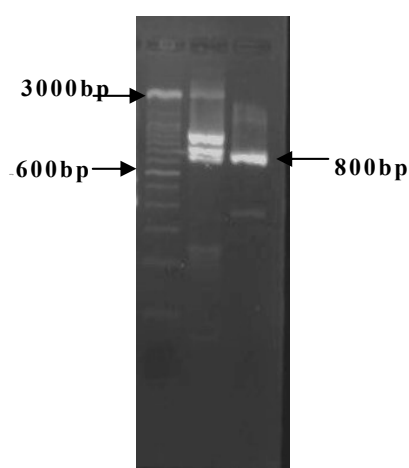


图2-3.ACS cDNA 3'末端扩增结果

泳道1: Marker分子量标准 DL3000

泳道2: GSP4和AUAP做为引物的PCR产物;

泳道3: 只用AUAP单引物进行扩增的PCR产物;

Fig.2-3 Amplification of the 3'partial cDNA sequence coding ACS by PCR

Lane 1: DL3000 DNA Marker

Lane2: PCR product used GSP4 and AUAP as primer

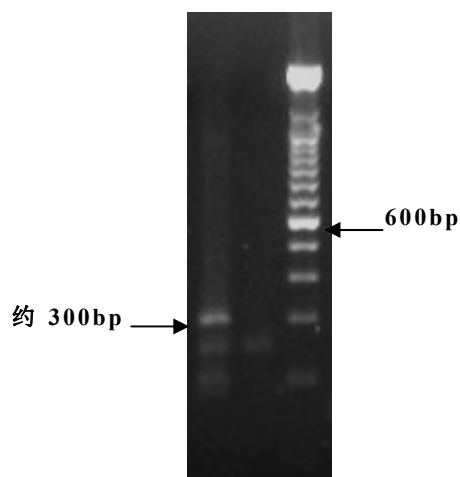


图2-4.ACS cDNA 5'末端扩增结果

泳道1: PCR产物

泳道2: Marker分子量标准 DL3000;

Fig.2-4 Amplification of the 5'partial cDNA sequence coding ACS by PCR

Lane 1: PCR product

Lane2: DL3000 DNA Marker

2.3.4 ACS 基因 5' 端序列的扩增

以反转录的 cDNA 第一链为模板, 根据 ACS 测序结果及保守区设计引物 AR3 与 AR4 进行 PCR 扩增所得产物, 点琼脂糖电泳, 条带约 260bp。(如图 2-4 所示)。

2.3.5 三段序列的拼接

测序所得的三条序列片段经拼接所得 ACS 基因序列长 1579bp, ORF 长 1434bp, 编码 478 个氨基酸, 经预测分子量约为 53.7 KD, 其中编码酸性氨基酸 53 个, 碱性氨基酸 56 个, 等电点为 8.039。基因完整序列如下图 2-5 所示。

AGAATGGGATTGAGAATGCGAAGACCAACTCAATCTTATCTAAGTTCGCTACTAATGAAGAACATGGCGAAAACTCGCCATATTTTC
 M G F E N A K T N S I L S K F A T N E E H G E N S P Y F
 GATGGATGGAAAGCATACGATAACGATCCTTTCCACCCTCTAAAGAACCCTAATGGGTATCCAGATGGGTCTTGCAGAAAAAC
 D G W K A Y D N D P F H P L K N P N G L S R W V L Q K N
 GAGCTTTGCTTTGATTGATTAAAGAATGGGTGTGAATAATCCCAAAGCCTCCATTGCACTGCTGAAGGAGCAAATGAACTC
 E L C F D L I K E W V V N N P K A S I C T A E G A N E L
 AAAAAATTGCTATTTATCAGGATTATCATGGCTTGCCAGAGTTCAGAAAGGGTGTGGCTAAGTTTATGGGAAAAGTGAGAGGC
 K N I A I Y Q D Y H G L P E F R K G V A K F M G K V R G
 GATAGAGTGACATTTGACCCAGATCGCATTGTTATGAGTGGTGGAGCTACTGGAGCTCATGAAATGTTGGCCTTCTGTTTAGCT
 D R V T F D P D R I V M S G G A T G A H E M L A F C L A
 AATCTGGTGAAGCATTCTTGGTGCCTACACCATATTATGCAGGATTTGATCGAGACTTGAAATGGCGAACAGGAGTAGAGCTT
 N P G E A F L V P T P Y Y A G F D R D L K W R T G V E L
 GTTCCAGTAGTTTGTGAGAGCTTAACAATTTAAGGTCACCAAATCAGCCTTGAAGCAGCATTCAAGGAGCAAAAGAGGCT
 V P V V C E S S N N F K V T K S A L E A A F K G A K E A
 AACATCAAAATTAAGGGCTTGCTCATAACCAATCCATCAATCCATTGGGAAGTGTCTTAGACAGGAGACATTAAGAATTATA
 N I K I K G L L I T N P S N P L G T V L D R E T L R I I
 GTGAGCTTCATCAATGAAAAAACATCCATCTAGTCGCTGATGAGATATATGCTGCCACAGTTTCAATCAGCCCAGTTTCATT
 V S F I N E K N I H L V A D E I Y A A T V F N Q P S F I
 AGCATTGCTGAGATAATAGAGGAAATAGATTGCAACCGCAATCTCATCCACATTGTTTATAGTCTCCCGAAGGACATGGGCTTC
 S I A E I I E E I D C N R N L I H I V Y S L P K D M G F
 CCTGGCTTCAGGGTTGGCATAGTTTATTCATACAATGATGCAGTGACAAGTTGTGCTCGTAGGATGTCGAGTTTGGTCTAGTT
 P G F R V G I V Y S Y N D A V T S C A R R M S S F G L V
 TCTACCCAAACTCAACATATGATTGCATCAATGTTGTTGGATGATATCTTTGTTGAGAAATTTATTGCTAAAAGTGCAGAGAGG
 S T Q T Q H M I A S M L L D D I F V E K F I A K S A E R
 CTAGCGAAAAGGCATGAGTTATTCACAAAGGGACTTGCTCAAGTAGGAATTGGTAGCTTGAAGAGCAATGCAGGGCTCTTTTTC
 L A K R H E L F T K G L A Q V G I G S L K S N A G L F F
 TGGATGGACTTGCGTAGGCTCCTCGAGGACTCAACTTTTGAATCCGAGATGGCACTTTGGCGTGTGATCGTCCACGATGTCAAG
 W M D L R R L L E D S T F E S E M A L W R V I V H D V K
 CTTAATGTTTCTCTGGCTCGTCTTTCCACTGCTCAGAGCCAGGTTGGTTCAGAGTTTGCTTTGCAAACATGGATGATGAAACC
 L N V S P G S S F H C S E P G W F R V C F A N M D D E T
 ATGAGAGTTGCTCTACGAAGGATACGAAGCTTTGTGACTGCCAAGAGGCAATGTTGGCAAAGCAATCTTAAGCTCAGTTTATCA
 M R V A L R R I R S F V T A K R Q C W Q S N L K L S L S
 TTTAGAAGTTGGATGATATTGGGATGGCACCACACATGATGTCCCCTCACTCCCCTATTCTTCAACCCTTGTTCGGGCTAGG
 F R R L D D I G M A P H M M S P H S P I S S P L V R A R
 ACTTAGATCAGATGAAAAAGATCAATTTTTTGTATGGTTAATACATCTCTAAATTCTTGGATTCTTCTAGGGATTTTTTC
 T *
 AAATGTATATGCAATTCAAAGGCATATAGAATTAACACATTCAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图2-5 茶树ACS基因全长序列

注:推测的氨基酸序列位于核苷酸序列下方

Fig.2-5. The full cDNA sequences of the ACS gene of tea plant

Note: The putative amino acids are under the nuclear acids

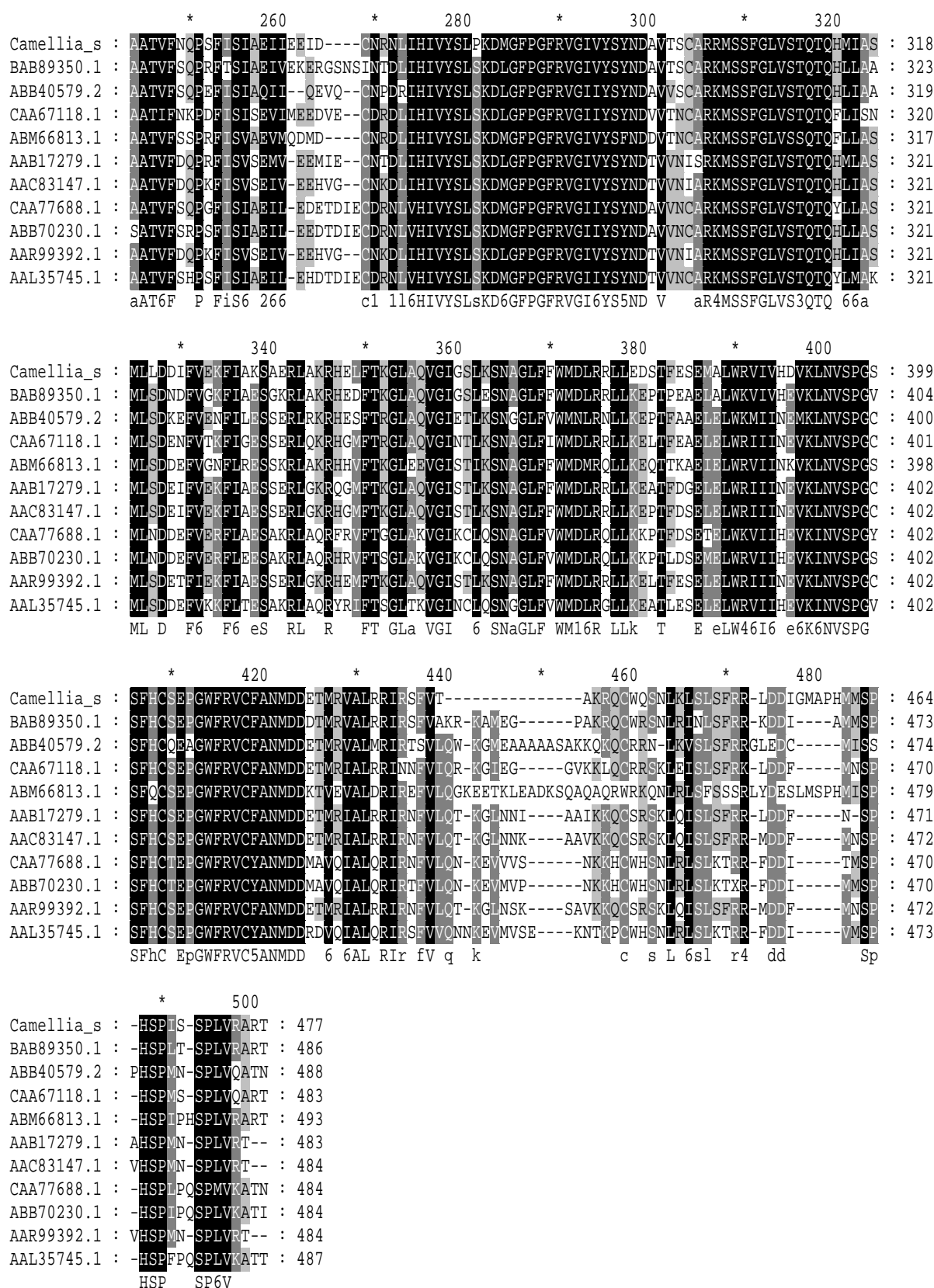


图2-6 茶树ACS蛋白序列与同源蛋白序列的多序列联配

Fig. 2-6 The protein sequences of ACS gene of tea plant aligned with other 10 organisms

2.3.7 进化树构建

采用 Mega 软件 (Kumar et al.,1994) (3.1 版) 的邻位连接法 (Neighbor-Joining, NJ) (Saitou and Nei,1987) 进行进化树构建, 将茶树 ACS 基因与梨 *Pyrus communis* 等 25 种生物的同源蛋白序列构建基因进化树 (如图 2-7 所示)。茶树 ACS 基因与柿 *Diospyros kaki*、莴苣 *Lactuca sativa*、牵牛 *Ipomoea nil* 等的同源性较高, 其中与柿的亲缘关系最近。而与梨、苹果 *Malus domestica*、番木瓜 *Carica papaya* 等的亲缘关系较远。

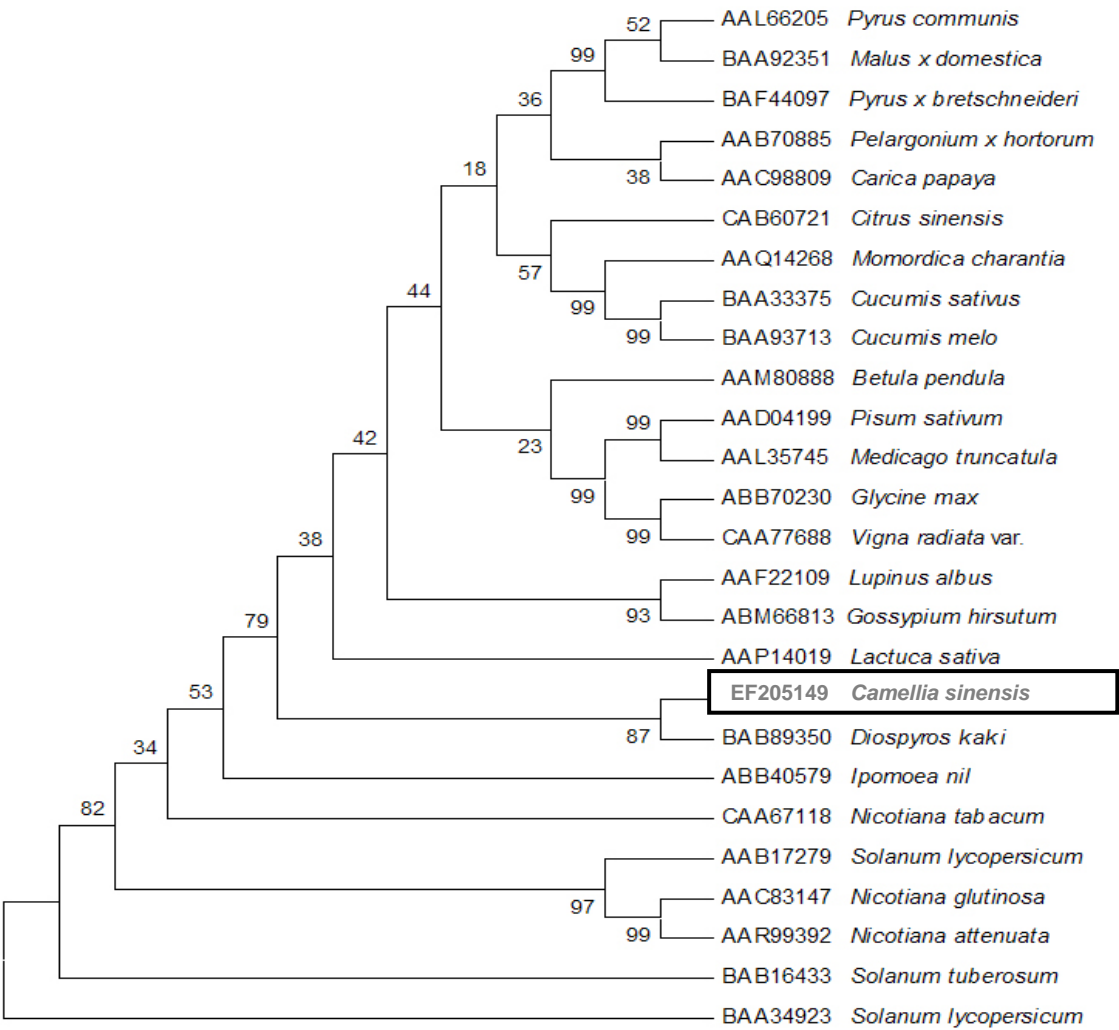


图2-7 基于NJ法的茶树ACS基因进化树

注:其中茶树ACS基因以黑色方框表示, 其它序列均为25条ACS同源蛋白序列。系统树各分枝上数字为“Bootstrap”为500时循环检验的置信度

Fig. 2-7 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on ACS sequences of tea plant and other 25 organisms

Note: ACS of tea plant is showed in the black box, the others are ACS homologous protein sequences of other organisms. The numbers on the tree branches represent bootstrap confidence values as “Bootstrap” is 500.

2.3.8 ACS 基因不同品种间的相对表达含量分析

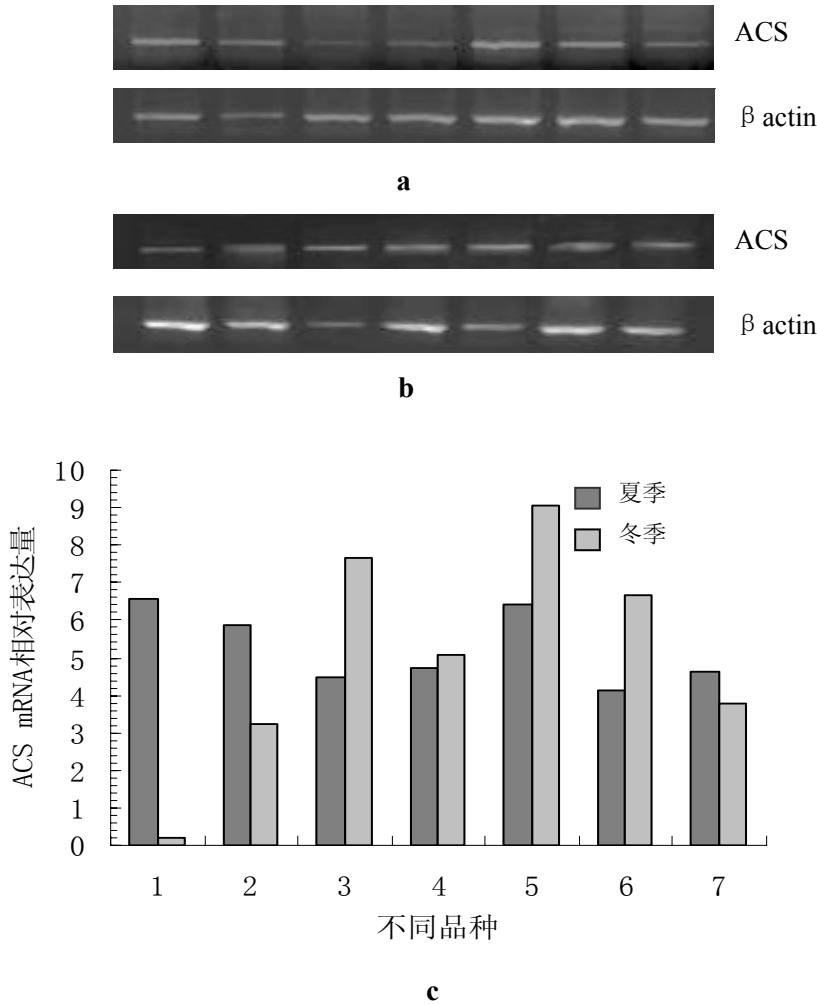


图2-8. RT-PCR检测茶树不同品种的ACS基因表达， β -actin为内参。

a. 夏季不同茶树品种的ACS基因表达电泳

b. 冬季不同茶树品种的ACS基因表达电泳

c. 不同品种ACS相对表达含量光密度分析示意图

从泳道1到泳道7依次为6/8、杭州大叶、安吉白茶、薏北、龙井长叶、福鼎大白茶、龙井43。

Fig. 2-8 RT-PCR analysis of ACS gene expression in different breeds, β -actin was used as positive control.

a. Electrophoretic analysis of the mRNA expression of ACS in different cultivars in summer.

b. Electrophoretic analysis of the mRNA expression of ACS in different cultivars in winter.

c. Densitometric analyses of the mRNA expression of ACS in different cultivars

From lane 1 to lane 7 is 6/8, Hangzhou Daye, Anji Baicha, Yabukita, Longjing Changye, Fuding Dabaicha and Longjing 43, respectively.

采用 RT-PCR 方法，分别以夏季 2006 年 8 月 20 日和冬季 2007 年 1 月 20 日 6/8、杭州大叶、安吉白茶、薏北、龙井长叶、福鼎大白茶、龙井 43 反转录的 cDNA 为模板，根据茶树 ACS 基因序列设计特异引物，经 PCR 扩增，检测 ACS 基因在不同品种中的表达情况，电泳结果如图 2-8a、

b 所示。

将电泳结果导入 Bandscan 分析软件进行光密度扫描分析,并将光密度相对表达数值进行分析如图 2-8c 所示,结果显示在夏季所取的不同品种中,ACS 基因在 6/8 中表达最高,其次是龙井长叶,在福鼎大白茶最低。在冬季所取的不同品种中,龙井长叶表达最高,6/8 中最低。

2.3.9 不同时期龙井 43 中 ACS 基因的表达

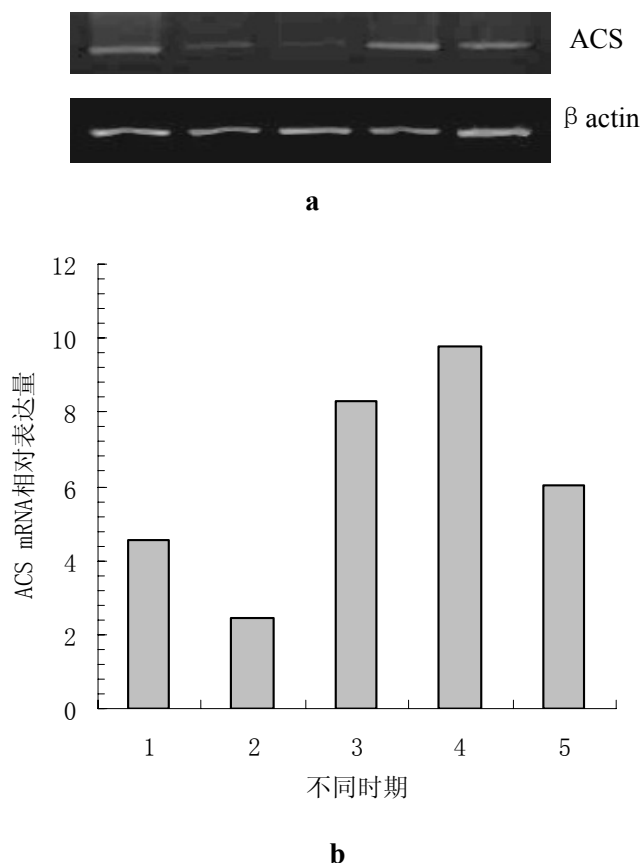


图2-9. RT-PCR检测龙井43不同时期的ACS基因表达, β -actin为内参

a.不同时期龙井43中ACS基因表达电泳

b.不同时期龙井43中ACS基因表达光密度分析示意图

从泳道1到泳道5依次为2006年11月5日、2006年12月6日、2007年1月4日、2007年2月5日、2007年3月6日所采的龙井43样本RT-PCR

Fig. 2-9 Reverse transcription-PCR analysis of ACS gene expression in Longjing43 in different periods, β -actin was used as control.

a. Electrophoretic analysis of the mRNA expression of ACS in different periods in Longjing 43

b. Densitometric analyses of the mRNA expression of ACS in different periods in Longjing 43

取 2006 年 11 月 5 日、2006 年 12 月 6 日、2007 年 1 月 4 日、2007 年 2 月 5 日、2007 年 3 月 6 日所采的不同时期的龙井 43 样本的反转录 cDNA, 进行 PCR 扩增, 以检测 ACS 基因在不同时期的气温条件下的表达情况, 电泳结果如图 2-9 a 所示。将电泳结果经光密度分析, 结果表明 ACS 基因在 2007 年 2 月 5 日的龙井 43 中表达量最高, 在 2006 年 12 月 6 日的龙井 43 中表达量最低,

如图 2-9 b 所示。

2.4 讨论

本研究根据其它在 NCBI 上已登陆的 ACS 基因, 设计兼并引物, 克隆得到茶树 ACS 基因部分序列, 在此基础上设计引物分别得到 ACS 基因的 5' 及 3' 端序列。经拼接得到 ACS 全长序列, 其长 1579bp, 具有完整的 ORF(开放阅读框), 编码 478 个氨基酸, 具有 ACS 基因的保守序列, 将其所编码的蛋白质与 NCBI 上其它物种中已登陆的 ACS 蛋白质序列进行 BlastX 分析, 并选取来自梨等其它 25 种植物的 ACS 蛋白质序列进行 Clustal W 分析, 利用 MEGA 软件构建进化树, 结果发现茶树 ACS 蛋白质序列与柿中 ACS 蛋白质序列的同源性最高, 亲缘关系最近。

本研究的兼并引物是根据其它作物中的 ACS 基因所编码的氨基酸进行设计的, 为了提高扩增的特异性, 不仅要考虑在氨基酸保守区进行设计, 也要考虑在此位点的密码子的偏好性, 以降低兼并引物的兼并度, 一般认为兼并引物的兼并度最好低于 64。考虑到兼并引物其实是多种核苷酸引物的混合物, 而其中可能只有一条是目的引物, 所以相对特异引物的 PCR 来说, 应根据引物的兼并度适当增加其在 PCR 体系中的浓度。比如对于本文所设计的兼并引物, 其兼并度为 16, 在进行 PCR 的时候, 在 50 μ l 的体系里, 将上下游的引物都成倍增加到 6 μ l(10mM)。同时如果上下游的引物的兼并度不相同, 也应该根据兼并值调整其在 PCR 体系中的浓度。同时对于兼并引物来说应尽量使其 3' 端是特异的。

在进行 3'RACE, 利用一条基因特异引物和一条锚定引物进行扩增, 而往往发生锚定引物单引物扩增的现象, 为了进一步确认目的条带, 在 PCR 扩增时同时增加一个只有锚定引物的体系进行对照, 电泳后将基因特异引物和锚定引物扩增产物泳道里区别于单锚定引物扩增的产物进行回收, 同时利用在已知的基因序列里所设计的一对基因特异引物进行进一步验证。

ACS 基因序列的获得将对后期研究 ACC 合成酶在茶树生长生理中的作用及有目的的运用分子手段进行辅助育种打下一定的基础。

乙烯参与植物整个生长过程, 尤其参与冷冻伤害、干旱等逆境胁迫, 为了进一步研究乙烯在茶树逆境生理中的作用, 根据茶树中克隆所得的 ACS 全长基因设计引物, 分别在 2006 年 8 月 20 日经过夏季高温及 2007 年 1 月 20 日经过冬季低温后取 6/8、杭州大叶、安吉白茶、薮北、龙井长叶、福鼎大白茶、龙井 43 不同品种样本, 进行 RT-PCR 扩增, 这些样本中 6/8 和杭州大叶的耐寒性较弱、安吉白茶的耐寒早性都相对较弱, 而龙井长叶、福鼎大白茶、龙井 43 的抗性相对较强, 同时以基因内本底表达的 β -actin 扩增作为参照, 以校正半定量的准确性。结果发现在夏季, ACS 基因在 6/8 中表达量相对最高, 在福鼎大白茶中最低; 但是在冬季, 相对来说抗性弱的品种除了安吉白茶中的 ACS 基因相对表达含量偏高, 6/8 和杭州大叶中 ACS 基因表达含量都较低, 而且薮北、龙井长叶、福鼎大白茶、龙井 43 这些抗性强的品种中 ACS 基因表达含量都较高。初步认为, 一个品种的抗逆性强弱是由多种基因相互协调表达的结果, 而不是仅仅完全由一、二个基因决定的, ACS 基因的表达丰度协调的是乙烯的合成, 乙烯不仅参与逆境胁迫, 同时参与叶子成熟、开花等多种过程, 所以总的来说 ACS 基因的表达含量与品种的抗逆性强弱有一定关系但又不完全相同。

为了进一步研究 ACS 基因的表达对植物耐寒性的影响, 取冬季不同时期的龙井 43 样品, 结合气温的变化分析 ACS 基因表达的相对高低与耐寒性的关系。根据气象资料所绘制的在采样期间的天气变化图, 以及测试其电导率所得的伤害率(伤害率越低表明其对冷冻的抗性越强)如下图 2-10 所示。

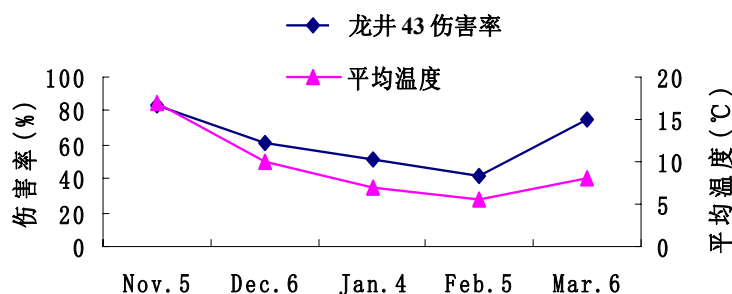


图2-10 2006.11.5-2007.3.6气温变化及龙井43不同时期的伤害率

Fig. 2-10 The temperature from 2006.11.5 to 2007.3.6 and the injure rate during the period

发现从 2006 年 12 月 6 日到 2007 年 1 月 4 日, 再到 2007 年 2 月 5 日, 随着气温的降低以及耐寒性的增加, ACS 基因的相对表达含量也逐渐增加, 从 2007 年 2 月 5 日到 2007 年 3 月 6 日随着天气的转暖气温的升高, ACS 基因的相对表达含量逐渐降低, 所以从 2006 年 12 月 6 日到 2007 年 3 月 6 日这段时间, ACS 基因的表达相对含量就与气温变化及龙井 43 伤害率一致。但是从 2006 年 11 月 5 日到 2006 年 12 月 6 日这段时间随着气温的下降 ACS 基因的表达量反而下降, 初步认为从 2006 年 11 月 5 日到 2006 年 12 月 6 日这段时间, 虽然气温在降低, 但是降低的幅度并不大, 而且此时的气温也不算太低, 可能茶树还未对此气温变化产生应答, 诱导 ACS 基因的表达; 另一方面, 在乙烯生物合成过程中, ACS 基因的转录水平并不总是反映到酶的活性水平上去(Lasserre et al., 1997), 且不同的 ACS 基因在转录水平上也有明显的差异(Yip et al., 1992)。虽然本文做了 ACS 基因的表达分析, 但是其在茶树抗逆中的作用还有待进一步研究。

第三章 茶树 ACO 基因的克隆与 RT-PCR 分析

虽然 ACC 氧化酶不是其合成的限速酶,但是其催化乙烯合成的最后一步反应,直接催化乙烯形成,对乙烯的合成也有重要的调控作用。所以在植物中利用 ACO 反义基因抑制 ACO 基因的表达进而抑制乙烯的合成研究非常广泛,而这些研究都基于 ACO 基因序列的克隆。

EST 是完整基因上能特异性标记基因的一部分序列,通常包含了基因足够的结构信息区,其基本原理是从组织特异性或细胞特异性的 cDNA 文库中随机挑选克隆,并进行 5'和 3'端部分测序,我们通过对基因库的检索,发现有两个 EST 片段序列与 ACC 氧化酶序列具有很高的同源性。在这两个 EST 片段的基础上设计引物进行 RT-PCR 扩增,所得的序列经拼接得到茶树中 ACO 全长基因,并对其进行生物信息学分析。

同时取安吉白茶、6/8、杭州大叶、龙井长叶、藪北、龙井 43、福鼎大白茶等 7 个品种在经历高温和低温后,以及龙井 43 在冬天不同时期低温驯化后 RNA 样品进行 RT-PCR 分析,以研究 ACO 基因在这 7 个品种在经历高温与低温后、以及龙井 43 在经历低温的不同时期的相对表达含量,从而探讨 ACO 基因的表达丰度与茶树抗逆之间可能的关系。

3.1 材料

用龙井 43 春季新梢构建的 cDNA 文库(陈亮等, 2004)和编号为 TL021G01 等 EST 克隆。RT-PCR 分析材料同第二章。

3.2 方法

3.2.1 ACO 基因克隆

3.2.1.1 茶树新梢 EST 测序

茶树新梢 cDNA 文库(陈亮等, 2004)及 EST 库均为本实验室保存,对 TL021G01 等克隆按照陈亮等(2005)的方法进行双向测序。

3.2.1.2 总 RNA 的提取

以龙井 43 春茶一芽二叶新梢为材料,按照 Trizol 法进行总 RNA 提取,方法同 2.2.2.1。

3.2.1.3 cDNA 一链合成

以上述所提总 RNA 为模板,利用宝生物工程(大连)有限公司 AMV Reverse Transcriptase, oligdT₍₁₈₎ 作为反转录引物 30℃ 10 min, 42℃ 1 h, 80℃ 2 min 进行反转录合成 cDNA 第一链。方法体系同 2.2.2.1

3.2.1.4 引物设计及 PCR 扩增

根据 TL021G01 克隆双向测序所得的两段序列片段设计引物如下：

ACO1 : 5'-TAC CTA AAG AAG GCC TTC TAT GG-3'

ACO2 : 5'-GGA CCT AGA TTG ACA TTA GCT TC-3'

以反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，

反应体系如下：

上述反转录 cDNA	1 μ l
10 \times PCR Buffer (含Mg ²⁺)	5 μ l
dNTP (2.5 μ M)	4 μ l
ACO1 (10 μ M)	1 μ l
ACO2 (10 μ M)	1 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l
补灭菌ddH ₂ O至	50 μ l

PCR 反应条件：

94°C 变性 3 min

94°C 变性 30 s	} 35 cycles
50°C 退火 30 s	
72°C 延伸 45 s	

3.2.1.5 测序

将扩增所得 PCR 产物，点 1.0%琼脂糖电泳，将含有目的片段的琼脂糖回收纯化，回收方法同 2.2.2.4，将回收纯化产物送至杭州华大基因公司测序。

3.2.2 不同茶树品种、龙井 43 冬季不同时间 ACO 基因的 RT-PCR 分析

3.2.2.1 RNA 提取

表 2-1 中的材料，采用 Trisol 试剂盒进行总 RNA 提取。提取方法同 2.2.2.1

3.2.2.2 反转录 cDNA 一链的获得

以上述所提的各样本RNA分别做模板，以OligdT₍₁₈₎为反转录引物，利用ReverTra Ace (Toyobo)进行反转录。反应体系及方法同 2.2.5.2，将反转录产物灭菌ddH₂O稀释 10 倍-20°C 保存备用。

3.2.2.3 RT-PCR 检测 ACS 基因的表达

同样利用 β -actin 作为内参，以校正 RT-PCR 的结果。

根据已获得的茶树 ACO 基因全长 cDNA 序列设计引物：

ACO1: 5'-TAC CTA AAG AAG GCC TTC TAT GG-3'

ACO2: 5'-GGA CCT AGA TTG ACA TTA GCT TC-3'

预期扩增片段大小在 500 bp 左右

反应体系：

上述反转录 cDNA	2 μ l
10 \times PCR Buffer (Mg ²⁺ (-))	2 μ l

Mg ²⁺	1.2 μl
dNTP (10 μM)	0.4 μl
正向引物 (10 μM)	0.4 μl
反向引物 (10 μM)	0.4 μl
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0.2 μl
补灭菌ddH ₂ O至	20 μl

ACO 与β-actin PCR 反应条件:

94°C 变性 3 min	
94°C 变性 30 s	} 30cycles
50°C 退火 30 s	
72°C 延伸 45 s	

3. 2. 2. 4 Bandscan 分析

PCR 结束后,取 6 μl 反应产物加入 2 μl 6×loading buffer, 1.0%琼脂糖 100 V 电泳 20 min, 电泳结束后在紫外灯下呈相拍照, 将相片用 Bandscan 软件进行灰度扫描分析。

3. 3 结果与分析

3. 3. 1 ACO 基因部分 EST 片段序列的获得

我们对编号为 TL021G01 的克隆进行 T7 双向测序,并将测序所得的两个序列片段采用 BlastN 程序对 GenBank 进行搜索比对, 发现两个片段均与植物中的 ACO 基因具有高度的相似性。

3. 3. 2 ACO 基因中间序列的获得

以反转录的 cDNA 第一链为模板, 以 ACO1 与 ACO2 为引物进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物点 1.0%琼脂糖电泳, 所得的片段约 500bp。电泳结果如下图 3-1 所示。

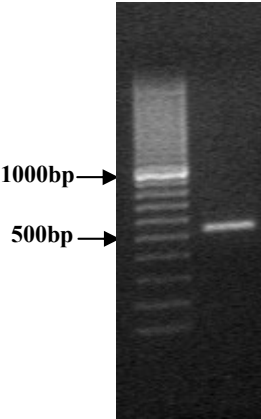


图 3-1.ACO cDNA 中间片段扩增结果
泳道 1: Mark 分子量标准 DL2000 泳道 2: PCR 产物;
Fig.3-1 PCR amplification of the partial cDNA sequence coding ACO
Lane 1: DL2000 DNA Marker Lane, 2: PCR product

3.3.3 ACO 基因全长序列的获得

将 TL021G01 克隆的 EST 序列双向测的序列片段以及以此设计引物所扩增所得片段测序片段经拼接所得 ACO 全长序列如下图 3-2 所示。其长 1237bp，其中编码框长 963bp，编码 320 个氨基酸残基，其中碱性氨基酸 37 个，酸性氨基酸 47 个，疏水性氨基酸 104 个，73 个极性氨基酸。DNASTar 预测其分子量为 36.2KD，等电点为 5.41。

GGGGATAGTACAAACACAACCTTCATGAGAGAGAGAGAGAGATAAAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGCA
ATGGAGACATCCCAGGTGATTAACATGGAGAAGCTAAATGGTGAAGAAAGAGGAGCCACCATGGAGCTCATCAAA
M E T S Q V I N M E K L N G E E R G A T M E L I K
GATGCTTGCGAAGTGGGGCTTTTTGAGTTGATGAACCATGGAATTTCTCATGAGATGATGGACACAGTGGAG
D A C E N W G F F E L M N H G I S H E M M D T V E
AGAATGACAAAGGAGCACTACAAGAAATGTATGGAACAGAGGTTCAAGGAGGTGGTAGCAAGCAAGGCTCTTGAG
R M T K E H Y K K C M E Q R F K E V V A S K A L E
GGTGTCCAAGCAGAGGTCACCAACATGGACTGGGAGAGCACCTTCCACCTGCGCCATCTTCCTCAATCCAACATT
G V Q A E V T N M D W E S T F H L R H L P Q S N I
TCAGAAGTACCCGATCTCAATGACGAATATAGGAAGGTTATGAAGGAATTTGCTGCAAAATTAGAGAACTAGCA
S E V P D L N D E Y R K V M K E F A A K L E K L A
GAGGAGCTACTGGACCTGCTATGTGAGAATCTTGGGCTAGAGAAAGGGTACCTAAAGAAGGCCTTCTATGGAACA
E E L L D L L C E N L G L E K G Y L K K A F Y G T
AAGGGTCCAACCTTTTGGGACCAAGGTTAGCAACTACCCACCATGTCCCAAGCCAGACTTGATCAAGGGCCTCCGA
K G P T F G T K V S N Y P P C P K P D L I K G L R
GCCCACACCGATGCCGGCGGCATCATCTTGCTCTTCCAAGATGACAAGGTCAGCGGCCTCCAACCTCTCAAGGAT
A H T D A G G I I L L F Q D D K V S G L Q L L K D
GGACAGTGGATTGATGTTCTCCATGCGCCATTCCATTGTCATCAACCTTGGTGACCAACTTGAGGTAATCACC
G Q W I D V P P M R H S I V I N L G D Q L E V I T
AATGGCAAATACAAGAGTGTGCTTCACAGAGTCATAGCACAAACAGATGGAAACAGGATGTCCATAGCTTCTCTTC
N G K Y K S V L H R V I A Q T D G N R M S I A S F
TACAATCCAGGCAATGATGCAGTGATCTATCCAGCACCGGCACTGGTGAATGAAGGATCAGACGATCAAACAAAT
Y N P G N D A V I Y P A P A L V N E G S D D Q T N
CTAGTGTACCCAAATTCATGTTTCGATGACTACATGAAGCTCTATGCTACCGTGAAGTTCCAGGCCAAAGAGCCC
L V Y P K F M F D D Y M K L Y A T V K F Q A K E P
AGATTTGAAGCCATGAAAGCCACAGAAGCTAATGTCAATCTAGGTCCAATTGCAACAGCTTAAGAGTGGGTCAAA
R F E A M K A T E A N V N L G P I A T A *
ATGCATGTAAGAGAAGTGAACCTTTATGTCTTGTTTTGTTTGGCTTGTTGGTGTGGCAAATCTAAGAGG
ATATAGGACAAATTATTGGGATTTTGAAGTCTTTGTGTTACTTAGTATTATGGACTTTGCTTACCATTG
TAGTAAGCGGATCAAAAGTTAATTATTATGTATGATAAAAAAAAAA

图3-2 茶树ACO基因全长序列

注:推测的氨基酸序列位于核苷酸序列下方

Fig. 3-2 The full cDNA sequences of the ACO gene of tea plant

Note: The putative amino acids are under the nuclear acids

3.3.4 茶树 ACO 基因所编码的氨基酸与同源序列的联配

我们将克隆所得的茶树 ACO 基因所编码的氨基酸序列与 NCBI 上的已登陆的其他作物中的 ACO 基因编码的氨基酸利用 Clustal W 程序进行多序列联配 (见图 3-3)。可以发现茶树 ACO 与其

它作物中的 ACO 非常类似，极为保守。

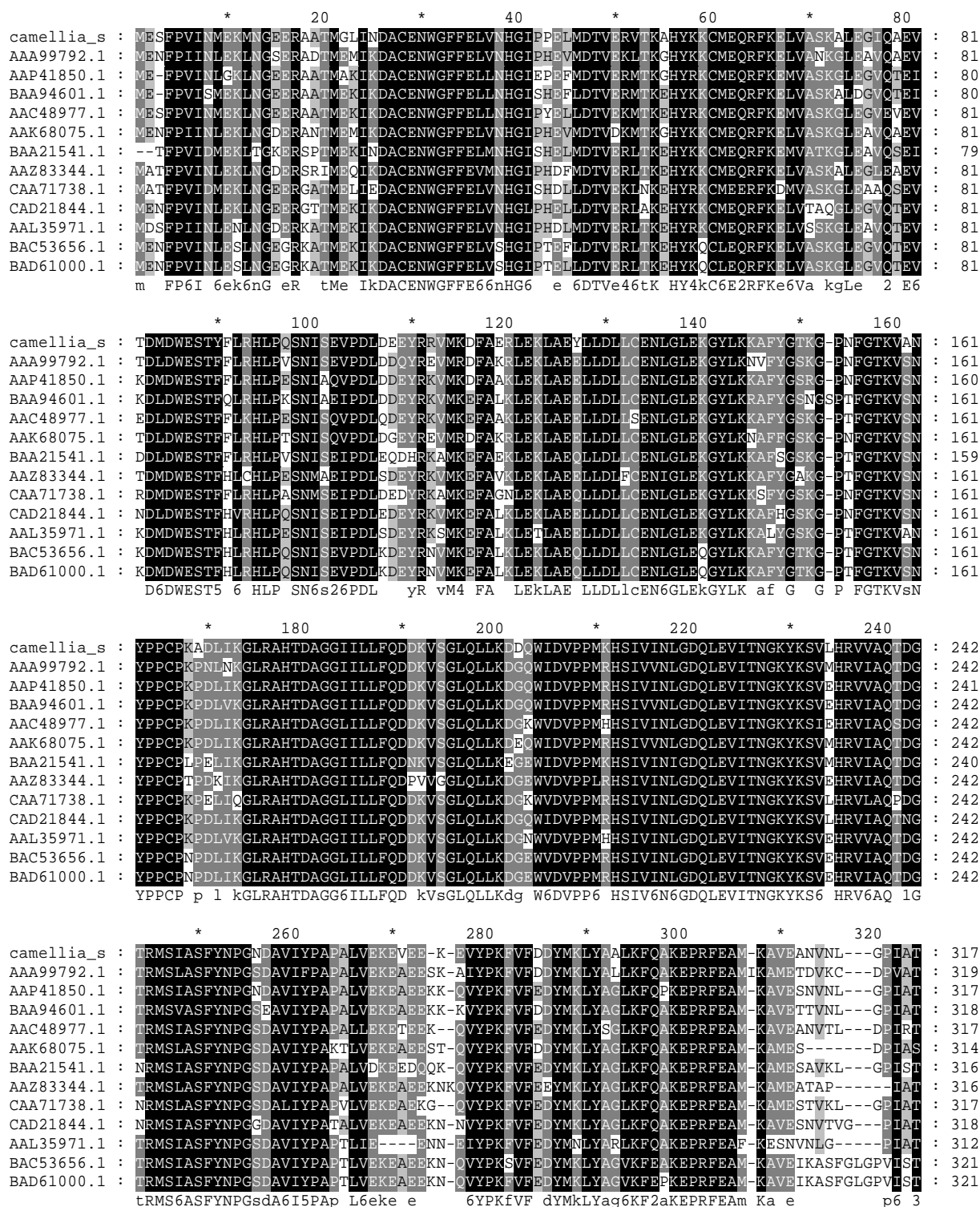


图3-3 茶树ACO蛋白序列与同源蛋白序列的多序列联配

Fig. 3-3 The protein sequences of ACO gene of tea plant aligned with other 12 organisms

3.3.5 进化树构建

将茶树 ACO 基因与梨 *Pyrus communis* 等 25 种生物的同源蛋白序列采用 Mega 软件(Kumar et al.,1994) (3.1 版) 的邻位连接法 (Neighbor-Joining, NJ) (Saitou and Nei,1987)进行进化树构建 (如图 3-4 所示)。茶树 ACO 基因与柿 *Diospyros kaki*、烟草 *Nicotiana glutinosa*、番茄 *Solanum lycopersicum* 等的同源性较高, 其中与柿的亲缘关系最近。而与榉木 *Fagus sylvatica*、苹果 *Malus x domestica* 等的亲缘关系较远。

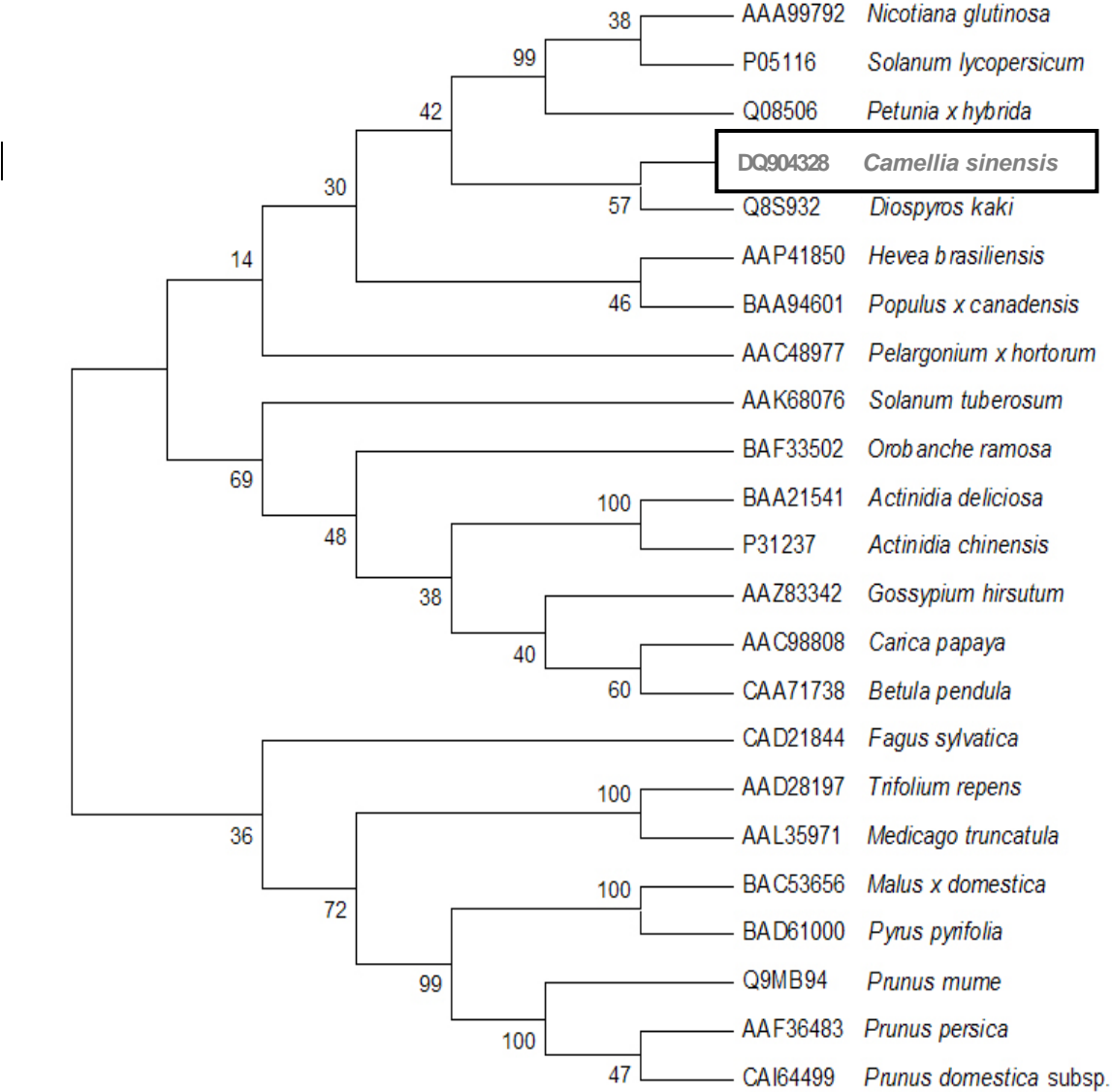


图3-4.基于NJ法的茶树ACO基因进化树

注:其中茶树ACO基因以黑色方框表示, 其它序列均为25条ACS同源蛋白序列。系统树各分枝上数字为“Bootstrap”为500时循环检验的置信度

Fig. 3-4 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on ACO sequences of tea plant and other 25 organisms

Note:ACO gene of tea plant is showed in the black box, the others areACO homologous protein sequences of other organisms. The numbers on the tree branches represent bootstrap confidence values as “Bootstrap” is 500.

3.3.6 ACO 基因不同品种间的相对表达含量分析

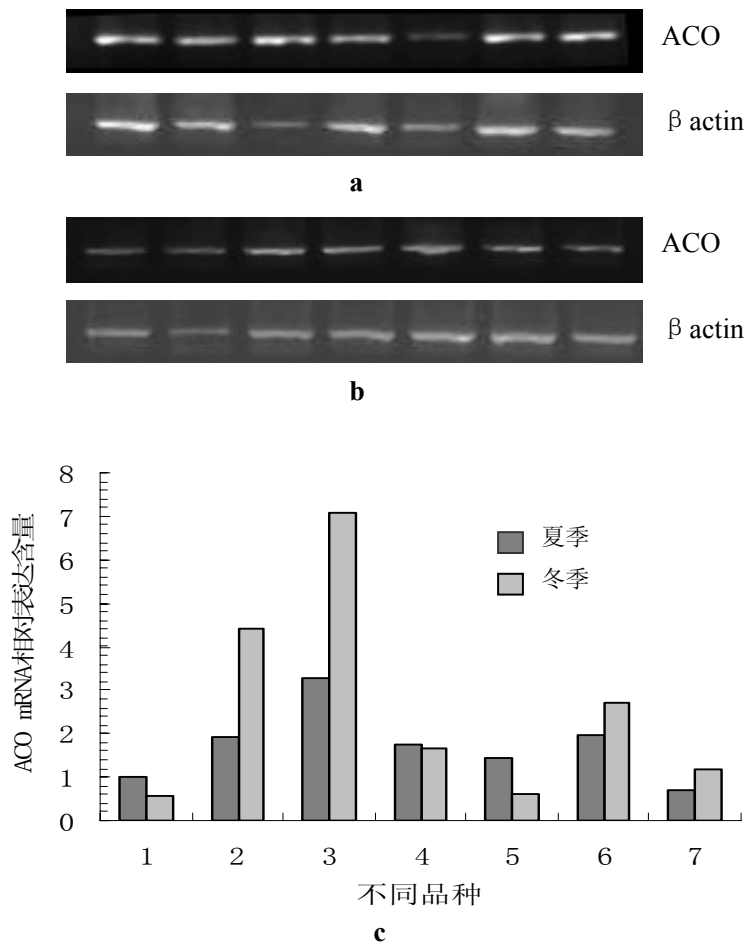


图3-4. RT-PCR检测茶树不同品种的ACO基因表达，β-actin为内参。

a. 夏季不同茶树品种的ACO基因表达电泳

b. 冬季不同茶树品种的ACO基因表达电泳

c. 不同品种ACO相对表达含量光密度分析示意图

从泳道1到泳道7依次为6/8、杭州大叶、安吉白茶、薏北、龙井长叶、福鼎大白茶、龙井43。

Fig. 3-4 RT-PCR analysis of ACO gene expression in different breeds, β-actin was used as control.

a. Electrophoretic analysis of the mRNA expression of ACO in different cultivars in summer.

b. Electrophoretic analysis of the mRNA expression of ACO in different cultivars in winter.

c. Densitometric analyses of the mRNA expression of ACO in different cultivars

From Lane 1 to Lane 7 is 6/8, Hangzhou Daye, Anji Baicha, Yabukita, Longjing Changye, Fuding Dabaicha and Longjing 43, respectively.

用 RT-PCR 方法，分别以夏季和冬季 6/8、杭州大叶、安吉白茶、薏北、龙井长叶、福鼎大白茶、龙井 43 反转录 cDNA 为模板，根据茶树 ACO 基因序列设计特异引物，检测 ACO 基因在不同品种中的表达情况，电泳结果如图 3-4a、b 所示。

将电泳结果导入 Bandsan 分析软件进行光密度扫描分析，并将光密度相对表达数值进行分析

如 3-4 示, 结果显示无论夏季还是冬季 ACO 基因的表达均在安吉白茶中表达最高, 但是夏季 ACO 在龙井 43 中表达含量最低, 冬季在 6/8 中表达量最低。

3.3.7 不同时期龙井 43 中 ACO 基因的表达

取 2006 年 11 月 5 日、2006 年 12 月 6 日、2007 年 1 月 4 日、2007 年 2 月 5 日、2007 年 3 月 6 日所采的不同时期的龙井 43 样本, 进行 PCR 扩增, 以检测 ACO 基因在不同时期的冷冻条件下的表达情况, 电泳结果如图 3-5。将电泳结果经光密度分析, 结果表明 ACO 基因在 2007 年 1 月 4 日的龙井 43 中表达量最高, 在 2006 年 11 月 5 日的龙井 43 中表达量最低, 如图 3-5。

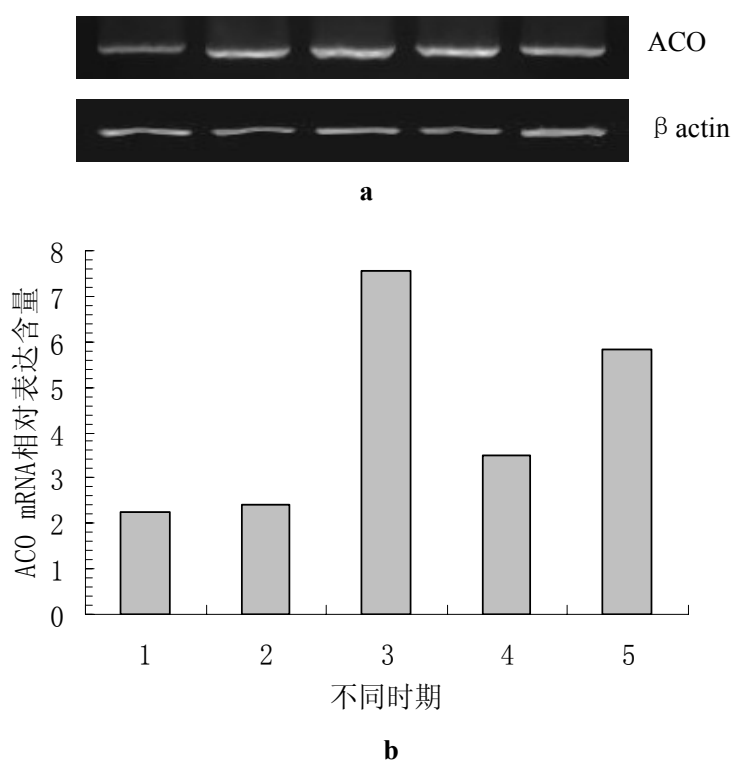


图3-5T-PCR检测龙井43不同时期的ACO基因表达, β -actin为内参。

a.不同时期龙井43中ACO基因表达电泳

b.不同时期龙井43中ACO基因表达光密度分析示意图

从泳道1到泳道5依次为2006年11月5日、2006年12月6日、2007年1月4日、2007年2月5日、2007年3月6日所采的龙井43样本RT-PCR

Fig.3-5verse transcription-PCR analysis of ACO gene expression in longjing43 in different periods, β -actin was used as control.

a. Electrophoretic analysis of the mRNA expression of ACO in different periods in longjing43

b. Densitometric analyses of the mRNA expression of ACO in different periods in longjing43

3.4 讨论

茶树 cDNA 文库 EST 测序, 将所测得的 EST 序列与 NCBI 上的基因进行 BlastN 比对, 发现有两个克隆分别与 ACO 基因的 5' 及 3' 端高度相似, 在此基础上设计引物进行 RT-PCR 扩增, 得到一约 500bp 的片段, 此片段经克隆测序, 与两条 EST 片段拼接获得了茶树中 ACO 基因, 其长 1237bp, 具有完整的编码框, 编码 320 个氨基酸, 将其与 NCBI 上已登陆的 12 种其它作物 ACO 编码序列进行 ClustW 联配分析, 发现克隆所得的 ACO 序列具有 ACC 氧化酶的保守区。同时采用 Mega 软件将其与来自梨等 25 种生物的同源蛋白序列进行进化树构建, 发现茶树中 ACO 基因同 ACS 基因一样均与柿中的基因序列同源性最高。茶树 ACO 全长序列的获得为后期研究 ACO 基因的表达对茶树生长中的作用打下一定基础。

本研究根据茶树中克隆所得的 ACO 全长基因设计引物, 利用表 2-1 中的材料同时以基因内本底表达的 β actin 扩增作为参照进行 RT-PCR 扩增, 同 2.4 中的讨论一样, 在品种间, 本研究发现无论夏季还是冬季 ACO 基因的表达均在安吉白茶中表达最高, 而安吉白茶的抗性是相对较弱的, 而在夏季 ACO 在龙井 43 中表达含量最低, 冬季在 6/8 中表达量最低, 可见 ACO 基因同 ACS 基因一样其基因表达丰度与品种的抗性强弱并不正相关。

同时也与 ACS 基因的表达研究一样进一步取不同时期冻害下的龙井 43 样品, 结合气温的变化和 ACS 基因表达的相对高低来分析其在低温下的作用。结果发现与 ACS 基因不同的是 ACO 基因在 2006 年 11 月 5 日到 2006 年 12 月 6 日这段时间随着气温的下降其表达量也相对升高, 而从 2007 年 2 月 5 日到 2007 年 3 月 6 日随着天气的转暖气温的升高, ACO 基因的相对表达含量也在增加, 而且在整个采样期间, ACO 基因的相对表达含量在 2007 年 1 月 4 日的时候最高。初步认为一方面不仅逆境胁迫会诱导 ACO 基因的表达, 渍水、病原体侵染、以及植物在自然条件下开花、传粉、果实成熟、衰老等过程均可诱导 ACO 基因的表达, 而在不同的采样时期伴随的不仅是冷冻伤害, 还有茶树在不同时期的生长发育, 尤其从 2007 年 2 月 5 日到 2007 年 3 月 6 日这段时间, 茶树可能要进行新芽萌发等, 所以这段时间虽然气温升高, 伤害率降低, 而 ACO 基因的表达依然升高; 另一方面由于 ACO 基因是一个多基因家族, 可能在不同时期主要表达的基因不同; 其三, 虽然 ACO 基因与 ACS 基因都是调控依稀合成过程的重要酶, 但是可能在不同时期主要调控的基因不同。ACO 基因在茶树逆境中的作用还有待进一步研究。

第四章 茶树亲环素基因 cDNA 全长的分析鉴定与原核表达

cDNA 文库构建及 EST 测序技术是发现并鉴定新基因的一种有效手段。根据陈亮等(2005)构建的龙井 43 春茶一芽二叶的 cDNA 文库及对 EST 测序结果进行统计分析,发现并鉴定了多种与茶树生理生化相关的关键基因

亲环素蛋白(Cyclophilin)家族,广泛存在于动植物细胞内,具有多种生物学活性,可能参与植物抗御冻害机制。编号为 TL008C02 的茶树 EST 克隆,其被鉴定为亲环素基因,我们对其进行了生物信息学分析,同时并构建了表达载体进行了诱导表达,为以后进行亲环素分子结构研究,阐明其在茶树生长、发育调控机制中所发挥的作用提供了分子生物学基础。

4.1 材料与试剂

4.1.1 材料

种植在中国农业科学院茶叶研究所内的国家种质杭州茶树圃的龙井 43 春季新稍,以此构建的 cDNA 文库(陈亮等, 2004), 以及编号为 TL008C02 等的 EST 克隆。

4.1.2 实验试剂

质粒提取缓冲液: Solution I: 50 mM 葡萄糖、25 mM Tris•Cl、10 mM EDTA 调 PH 至 8.0

Solution II: 0.2 M NaOH (10 M NaOH 母液稀释) 1%SDS (10%SDS 母液稀释)

Solution III: 5 M 醋酸钾 60 ml、冰醋酸 11.5 ml、ddH₂O 28.5 ml

TE 溶液 (pH8.0): 10 mM Tris•HCl (pH8.0)、1 mM EDTA (pH8.0)

4.2 方法

4.2.1 茶树新稍 EST 测序及 Cyclophilin 基因的鉴定

茶树新稍 cDNA 文库及 EST 库均为本实验室保存,对 TL008C02 等克隆按照陈亮等(2005)方法进行双向测序、拼接和比对,鉴定其功能。

4.2.2 亲环素基因的序列分析、多序列联配及进化树构建

采取 BLAST (Altschul et al.,1997)程序对亲环素基因序列进行 GenBank 数据库同源序列搜索比对和

相似性分析, 氨基酸序列推测和理化性质预测采用 ExPASy Proteomics tools (Gasteiger et al., 2003) 进行。

多序列联配采用 CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) 程序进行分析, 进化树构建采用 Mega 软件 (Kumar et al., 1994) (3.1 版) 的邻位连接法 (Neighbor-Joining, NJ) (Saitou and Nei, 1987) 进行, 系统树各分支的置信度由“Bootstrap”500 循环检验。

4.2.3 亲环素基因的原核表达

4.2.3.1 总 RNA 提取

以龙井 43 春茶一芽一叶新梢为材料, 按照 Trizol 法进行总 RNA 提取, 提取方法同 2.2.1。

4.2.3.2 cDNA 一链合成

以上述所提总 RNA 为模板, 利用宝生物工程(大连)有限公司 AMV Reverse Transcriptase 30℃ 10min, 42℃ 1h, 80℃ 2min 进行反转录合成 cDNA 第一链, 方法同 2.2.2.1

4.2.3.3 亲环素 cDNA 的扩增

根据所鉴定的茶树亲环素基因以及表达载体的酶切位点设计引物:

上游引物 Cyp-F : 5'-ATG GAT CCA TGT TGA GAT TGC CGG-3' (下划线为 *Bam*H I 位点)

下游引物 Cyp-R : 5'-GCG AAG CTT TTA CAA AGG AAG TTC-3' (下划线为 *Hind* III 位点)

以反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增

PCR 扩增体系:

上述反转录 cDNA	0.4 μ l
10 \times PCR Buffer (Mg ²⁺ (-))	2 μ l
Mg ²⁺	1.2 μ l
dNTP (10 μ M)	0.4 μ l
Cyp-F (10 μ M)	1.6 μ l
Cyp-R (10 μ M)	0.4 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
补灭菌 ddH ₂ O 至	20 μ l

PCR 反应条件:

94℃ 变性 3min

94℃ 变性 30s	} 35 cycles
42℃ 退火 30s	
72℃ 延伸 45s	

72℃ 延伸 10min

4.2.3.4 原核表达载体的构建与鉴定

将 PCR 产物点 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化 (方法同 2.2.2.4) 后克隆于 Toyabo pTA2 载体内 (方法同 2.2.2.5), 挑取阳性克隆送至杭州华大基因公司测序 (方法同 2.2.2.6)。

挑取阳性克隆进行培养并提取质粒，质粒提取方法如下：

- 1) 3000 r/min 离心 5 min，弃去上清，加 200 μ l 溶液 I，胶带封口，振荡混匀；
- 2) 加入 200 μ l 溶液 II，新胶带封口，缓慢翻转混合 10 次。此时裂解液应该透明、粘稠；
- 3) 加入 200 μ l 溶液 III，新胶带封口，缓慢翻转混合 10 次；
- 4) 冰浴 30 min，4000 r/min 离心 20 min，取 400 μ l 上清液转入干净的浅孔板中；
- 5) 取下浅孔板，加入 300 μ l 异丙醇，新胶带封口，立即翻转混合 3 次。4000r/min 离心 25 min；
- 6) 去上清，加入 300 μ l 70%乙醇，4000 r/min 离心 5min；
- 7) 分别用 20 μ l ddH₂O 重新溶解质粒 DNA，取 2 μ l 1%琼脂糖电泳检测，其余 -20℃ 保存备用。

提取的质粒经 *Hind* III 和 *Bam*HI 37℃ 过夜双酶切鉴定，酶切体系：

pTA2/Csin-Cyp	5 μ l
10×K Buffer	1 μ l
ddH ₂ O	3 μ l
<i>Hind</i> III (10 U/ μ l)	0.5 μ l
<i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	0.5 μ l
Total	10 μ l

将酶切产物点 1.0%琼脂糖凝胶电泳，回收纯化相应大小的片段（方法同 2.2.2.4）；将回收的 DNA 片段与经同样酶切的原核表达载体 pET-30a(+)（购于美国 Novagen 公司）在 T4 DNA 连接酶的作用下 4℃ 过夜连接

连接体系：

2×Rapid Ligase Buffer	5 μ l
pET-30a(+)(50ng/ μ l)	1 μ l
割胶回收产物	3 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
Total	10 μ l

将连接产物转化大肠杆菌 TG1（方法同 2.2.2.5），提取质粒经 PCR 检测和 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切鉴定后（方法体系同 4.2.3.4），将得到的阳性克隆命名为 pET/Csin-Cyp。

将阳性克隆过夜培养，提取质粒 DNA（方法同 4.2.3.4）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。

4.2.3.5 重组质粒的诱导表达：

挑取经鉴定的阳性克隆单菌落于 3 ml LB 培养基(含 Kan 30 μ g/ml) 中，37℃ 220 r/min 振荡培养过夜。后按 1%(V/V)接种量转接 10 ml LB 培养基(Kan 30 μ g/ml)，振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.4 左右，加 IPTG 至终浓度为 1.5 mM，30℃ 200 r/min 继续诱导 5 h。收集菌液，5000 r/min 离心 10 min，去除上清。用 MilliQ 水将沉淀重新悬浮，5000 r/min 离心 10 min，收集菌体，剩余 150 μ l MilliQ 水加入 150 μ l SDS 凝胶加样缓冲液(40 mM Tris.HCl, pH 6.8, 10%甘油, 2% SDS, 5%巯基乙醇, 0.1%溴酚蓝) 后剧烈振荡悬浮，煮沸 10 min 后离心，即获得表达菌的上清和沉淀。将表达菌的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。

4.3 结果与分析

4.3.1 亲环素基因克隆的鉴定

对编号为 TL008C02 的 EST 克隆进行双向重复测序、拼接后（如图 5-1），采用 BLAST 程序对 GenBank 进行搜索比对，发现 TL002C02 克隆与植物中的亲环素基因具有高度的相似性（与拟南芥等植物，最高 SCORE 值为 279，E-value 为 $3.7e-74$ ，同源性达到 89.4%），该克隆被鉴定为茶树亲环素基因，并在 GenBank 登录，登录号为 DQ904327。

茶树亲环素基因 cDNA 全长 949bp，其中开放阅读框全长 495 bp，其编码蛋白质含有 164 个氨基酸，分子量约为 17.47 kD，等电点约为 8.54。其中含 50 个疏水性氨基酸（占 30.5%），39 个极性偏中性氨基酸（占 23.8%），18 个碱性氨基酸（占 10.98%）和 16 个酸性氨基酸（9.8%）。在 5' 端非编码区有明显的“CAAT”标志，在 3' 端非编码区亦有明显的“AATAAA”poly-A 加尾信号（见图 4-1）。

```
acgaagtctcttttcttcatectctgtggtactaccactttgatctcttcaattcctcttcttcgtatcaaaggctgcgaggc
gaaacaaaaaggggtgtgtcgaaaaccagagacaaggccagaagaactcgatcggttcactcgcactgggtgtggacgct
agtcctcttcgcaaccctagctctcactcaggcggaagaatcgaaggaggattaaaggaagtgactcacaagtttacttg
ATGTTGAGATTGCCGAAAACCTGCTGGTCGTATGTCATGGGTCTCTTGGGAAGGCAGTTCCTAAAACAGCAGAGAATTTCCGAGCACTG
M L R L P E N L L V V C H G S L G K A V P K T A E N F R A L
TGCACAGGGGAGAAAGGTGTGGAAAGAGTGGGAAACCTCTTCACTACAAGGGGAGCAAATTCATAGAATTATCCAGCTCTATGCTC
C T G E K G V G K S G K P L H Y K G S K F H R I I P S S M L
CAGGGCGGTGATTTTACACTTGGTGATGGACGAGGTGGAGAATCAATTTATGGAGAGAAGTTGCTGATGAGAATTTCAAGCTGAAGCAC
Q G G D F T L G D G R G G E S I Y G E K F A D E N F K L K H
ACTGGCCAGGGTTTCTTTCAATGGCAAATGCTGGCCAGACACAAATGGCTCACAGTTCTTCATTACAAGTGTCACTAGCTGGTTG
T G P G F L S M A N A G P D T N G S Q F F I T T V T T S W L
GATGGCCGACATGTGGTGTGGTGGAAAGGTGCTATCGGCCATGGATGTGGTTTACAAGATTGAAGCTGAAGGCAATCAGAGTGGCACTCCC
F G K V L S G M D V V Y K I E A E G D G R H V V N Q S G T P
AAGAGCAATGTTCAAATGTGACAGCGGCGAACTTCCTTTGTAAtgttcttgtttgattttattctcgaccaatggcagctgttttgctt
K S N V Q I A D S G E L P L *
tccttcgtccaacaacgatctcattaagctagcgtgtgtgtgtatcaataaaccatagattaaggtggtattttctgcatcaaccttgatcattagatattc
ctctatttcagactttttcaagtgaacacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

图4-1 茶树亲环素基因全长序列

Fig. 4-1 The full cDNA sequences of the Cyclophilin gene of tea plant

注：编码区的开放阅读框序列以大写字母表示，且其起始密码子和终止密码子均以双下划线及黑体字表示；非编码区以小写字母表示，且其5'端非编码区的“CAAT”标志及3'端非编码区的“AATAAA”poly-A加尾信号均以单下划线及黑体字表示；推测的氨基酸序列位于核苷酸序列下方，方框标注为亲环素基因的结构域）

Note: The ORF is showed in upper cases; the original codon and the terminable cordon are all showed by the double underlines and boldface. The other region is showed in lower cases; the “CAAT”of the 5' region and the “AATAA”box of the 3' region are all showed by the single underlines and boldface. The prognosticate amino acids are under the nuclear acids, the pane is the cyclophilin's domain.

4.3.2 亲环素蛋白的多序列联配

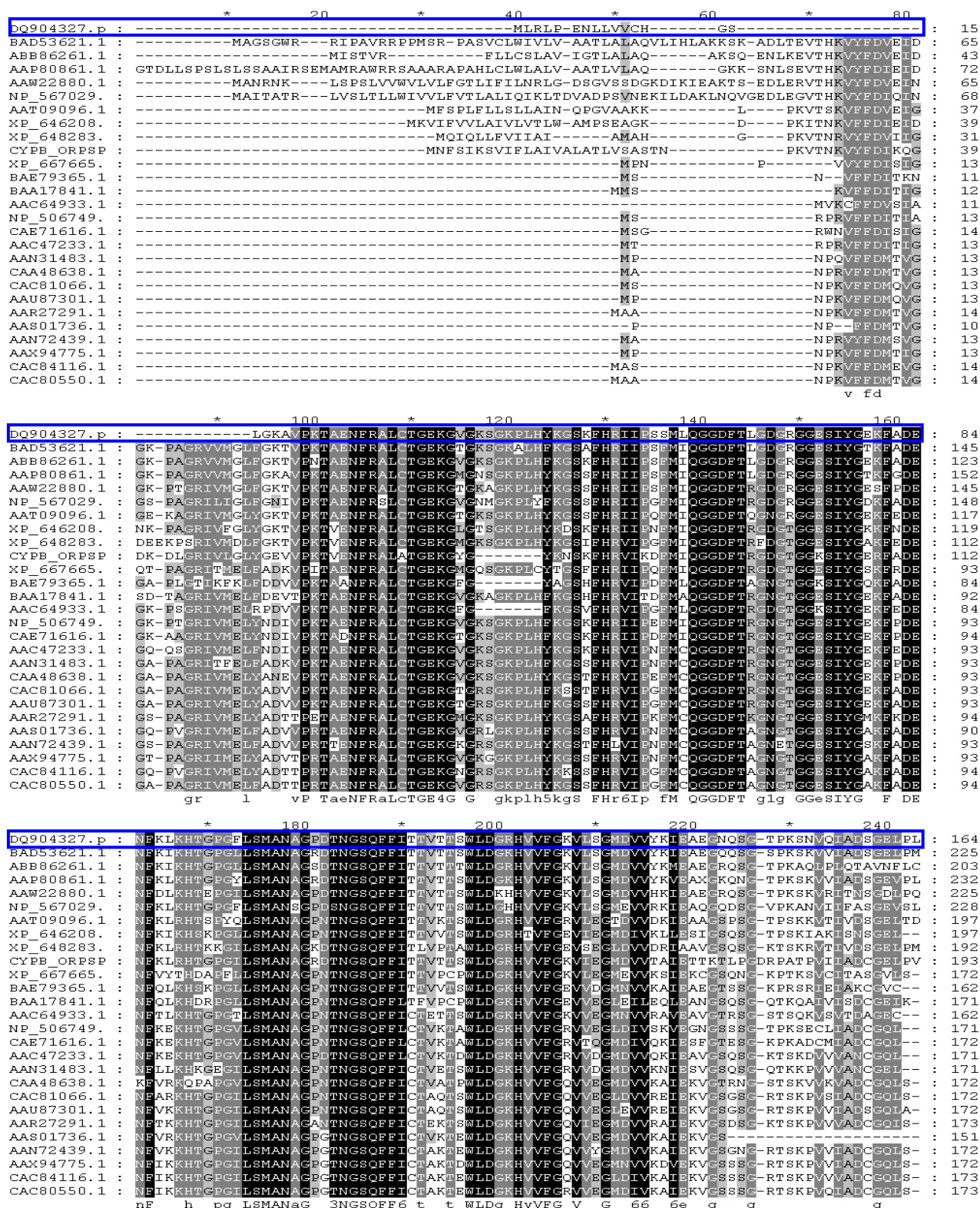


图4-2 茶树亲环素蛋白序列与水稻等26条亲环素同源蛋白序列的多序列联配

Fig.4-2 The protein sequences of cyclophilin gene of tea plant aligned with the protein sequences of other 26 organisms

注:其中茶树亲环素基因以蓝色方框表示,其它序列为26条来自其它生物的亲环素同源蛋白序列

Note:Cyclophilin of tea plant is showed in the blue box, the others are cyclophilin sequences of other 26 organisms.

利用 Clastal W 程序对亲环素基因克隆推测蛋白与经 BlastP 搜索的来自于水稻等生物的 26 条同源序列进行多序列联配（见图 4-2）。可以发现茶树亲环素与其它亲环素蛋白类似，具有高度的保守区（黑色方块表示），而保守区则可能是蛋白保持结构稳定并发挥生物活性的关键性的区域。

4.3.3 亲环素基因进化分析

依据 Neighbor-Joining 法，将茶树亲环素基因与水稻等 26 种生物的同源蛋白序列构建基因进化树（如图 4-3 所示）。茶树亲环素基因与水稻 *Oryza sativa*、马铃薯 *Solanum tuberosum*、小麦 *Triticum aestivum*、番茄 *Lycopersicon esculentum*、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等亲环素基因相似程度达到 80% 以上，而与挪威云杉 *Picea abies*，隐孢子虫 *Cryptosporidium hominis*，球形马拉色菌 *Malassezia globosa* 等的亲环素基因相似性仅有 60% 左右。

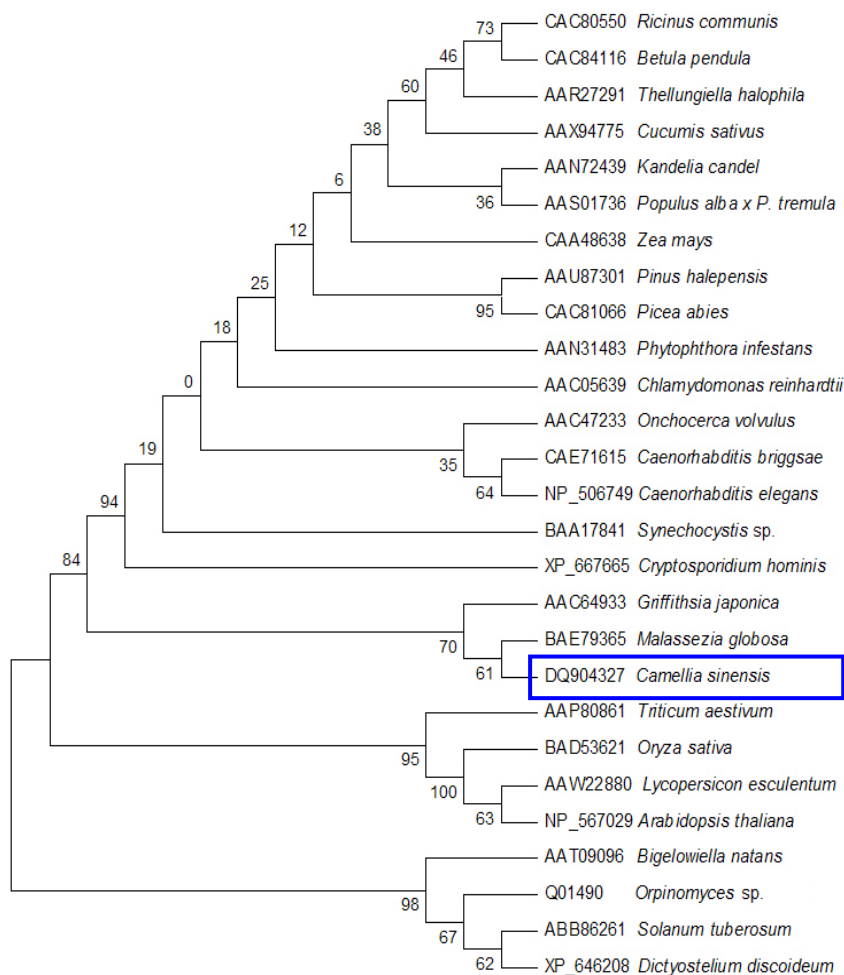


图4-3 基于NJ法的茶树亲环素基因进化树

Fig.4-3 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on cyclophilin sequences of tea plant and other 26 organisms

注:其中茶树亲环素基因以蓝色方框表示，其它序列均为26条亲环素同源蛋白序列。系统树各分枝上数字为“Bootstrap”为500时循环检验的置信度

Note: Cyclophilin of tea plant is showed in the blue box, the others are cyclophilin homologous protein sequences of other organisms. The numbers on the tree branches represent bootstrap confidence values as “Bootstrap” is 500.

4.3.4 亲环素基因的克隆与酶切鉴定

以反转录的 cDNA 第一链为模板，以 Cyp-F、Cyp-R 为引物对其进行扩增，长度约 500bp (图 4-4A)，与预期大小一致。将扩增产物克隆至 pTA2-T 载体后，对重组质粒进行 *Bam*H I 与 *Hind* III 的双酶切鉴定(图 4-4B)，切出片段与预期片段大小一致。

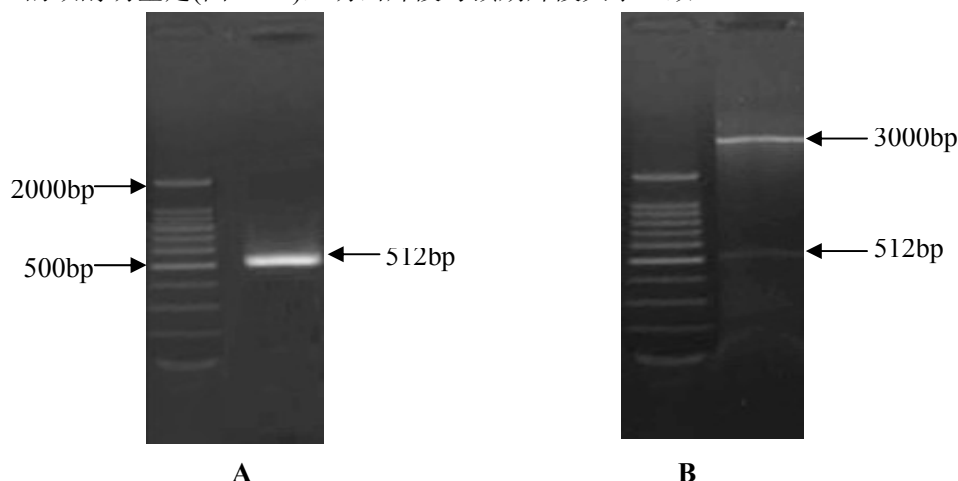


图4-4 茶树亲环素基因的PCR产物（A）及重组质粒的酶切鉴定（B）

Fig.4-4 PCR products of Cyclophilin gene from *Camellia sinensis* and restriction analysis of recombinant plasmids.

M: DNA标准分子量 DNA maker

1: 亲环素基因扩增产物 PCR product of Cyclophilin gene

2: pTA2/Csin-Cyp重组质粒双酶切产物 Products of pTA2/Csin-Cyp recombinant plasmids digested by *Bam*H I and *Hind* III

4.3.5 亲环素基因表达载体的构建

克隆载体 pTA2/Csin-Cyp 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后，回收约 500 bp 大小的片段，与经同样双酶切的原核表达载体 pET-30a(+)连接，转化大肠杆菌 BL21(DE3)，挑取阳性克隆进行过夜培养，碱法提取质粒，再分别以 PCR 扩增和 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切进行鉴定，均得到 500bp 左右大小的目的片段，因而成功地构建了 pET/ Csin-Cyp 原核表达载体（过程如图 4-5 所示）。

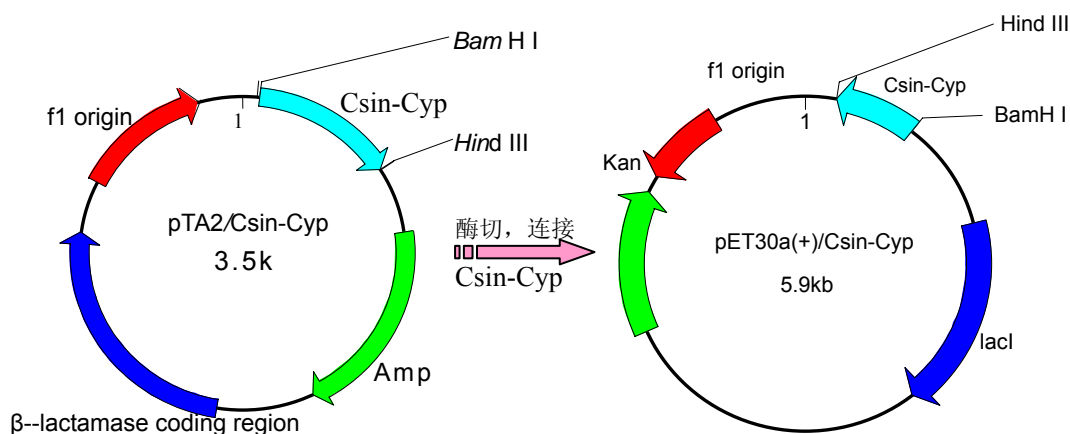


图4-5 pET30a(+)/Csin-Cyp融合表达载体构建示意图

Fig.4-5 Sketch Map of recombinant expression vecotor pET30a(+)/Csin-Cyp

4.3.6 亲环素基因诱导表达

含有 pET/ Csin-Cyp 的 BL21(DE3)工程菌经 IPTG 诱导后, 可产生 23kD 左右的特异蛋白质条带, 而以 pET-30a(+)空载体作为对照的克隆, 在相应位置没有产生特异的条带, 如图 4-6 所示, 说明已成功诱导了亲环素融合蛋白的表达。

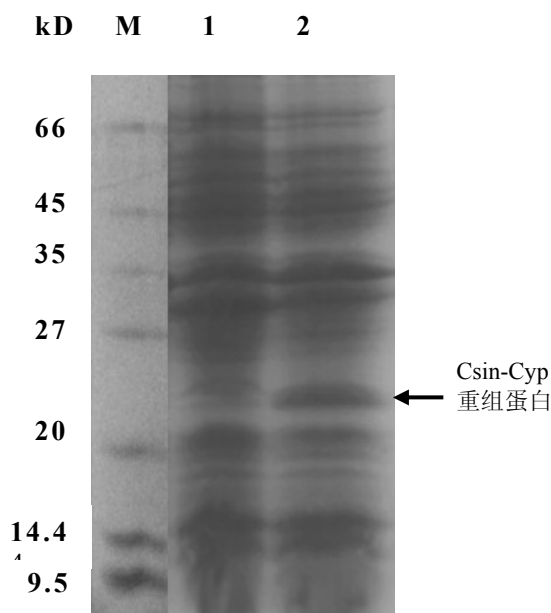


图 4-6. 重组质粒 pET/Csin-Cyp 在大肠杆菌中的表达

Fig.4-6 Expression of pET/Csin-Cyp in *Escherichia coli*

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular marker

1: 诱导的pET-30a(+)菌体总蛋白; The total protein of *E. coli* pET-30a(+)induced by 1 mM IPTG

2: 诱导的pET/ Csin-Cyp菌体总蛋白; The total protein of *E. coli* pET/ Csin-Cyp induced by 1 mM IPTG

4.4 讨论

亲环素广泛存在于多种生物体内, 在植物的发育和新陈代谢等生理过程中具有重要作用。目前亲环素在拟南芥、大豆等作物中均已得到全长基因并进行了深入的研究, 而其在茶树上的研究还处于空白状态。利用 EST 技术, 我们对其中一条 cDNA 序列进行了分析, 将其推测的蛋白质与 27 种生物亲环素蛋白进行 Clustal W 多序列联配, 结果表明其与水稻、小麦、番茄、马铃薯、拟南芥等亲环素基因相似程度达到 80%以上, 且该 cDNA 序列具有完整的开放阅读框以及 5'和 3'非编码区, 证明该 cDNA 是编码茶树亲环素的全长基因序列。

我们得到了亲环素的全长基因这对于我们在基因水平研究亲环素基因在茶树生长代谢中的作用具有重要的意义。另外我们利用 pET-30a(+)/BL21(DE3)原核表达系统, 构建了亲环素基因的表达载体 pET/Csin-Cyp, 并在大肠杆菌中成功实现了亲环素融合蛋白表达。pET-30a(+)在插入片段上游带有 6×His 标签, 作为融合蛋白一小部分, 基本不影响表达目的蛋白的免疫原性, 并可利用

该标签检测、纯化该融合蛋白，这就为下游分离纯化整合的亲环素蛋白并进行结构功能分析提供了良好的条件。而且这也便于我们对纯化的亲环素蛋白进行抗体制备，这将对我们以后在蛋白水平上研究亲环素蛋白在茶树生理代谢途径和生长调控机制中发挥的作用奠定重要的基础。

第五章 全文结论与展望

5.1 全文结论

在龙井 43 春茶新梢 EST 基础上, 利用 RACE 及 RT-PCR 技术克隆了 ACS、ACO 基因, 并在不同品种在高温低温条件下, 以及龙井 43 冬季不同时期低温条件下进行 ACS 及 ACO 基因的 RT-PCR 分析。同时分析鉴定了茶树中的亲环素基因, 并在大肠杆菌中进行表达, 得出结论如下:

1. 茶树中的 ACS 全长序列长 1579bp, 具有完整的 ORF(开放阅读框), 编码 478 个氨基酸, 具有 ACS 基因的保守序列, 选取来自梨等其它 25 种植物的 ACS 蛋白质序列进行 Clustal W 分析, 利用 MEGA 软件构建进化树, 结果发现茶树 ACS 蛋白质序列与柿中 ACS 蛋白质序列的同源性最高, 亲缘关系最近。

2. 茶树中的 ACO 全长序列长 1237bp, 其中编码框长 963bp, 编码 320 个氨基酸残基, DNASTAR 预测其分子量为 36.2KD, 等电点为 5.41。用 MEGA 软件构建进化树, 结果发现茶树 ACO 蛋白质序列与柿中 ACO 蛋白质序列的同源性最高, 亲缘关系最近。

3. 经过安吉白茶、6/8、杭州大叶、龙井长叶、藪北、龙井 43、福鼎大白茶 7 个品种在经历高温和低温的 RT-PCR 分析, 结果发现 ACS 及 ACO 基因的表达含量与品种的抗逆性强弱似乎不完全相关, 同时将龙井 43 在冬季不同时期低温下的样品进行 RT-PCR, 结合采样期间的气温变化及冷冻伤害率来进行分析, 结果发现 ACS 及 ACO 基因的表达也并不与气温的变化及冷冻伤害的变化完全相同。

4. 茶树亲环素基因 cDNA 全长 949bp, 其中开放阅读框全长 495 bp, 其编码 164 个氨基酸, 分子量约为 17.47 kD, 等电点约为 8.54, 其编码的亲环素蛋白与来自其它作物的亲环素蛋白相似, 具有高度的保守区, 与水稻、小麦、番茄、马铃薯、拟南芥等亲环素基因相似程度达到 80%以上。利用 pET-30a(+)/BL21(DE3)原核表达系统, 构建了亲环素基因的表达载体 pET/Csin-Cyp, 并在大肠杆菌中成功诱导出一个分子量约为 23KD 的亲环素融合蛋白, pET-30a(+)在插入片段上游的 6×His 标签作为融合蛋白一小部分, 基本不影响表达目的蛋白的免疫原性, 这就为下游分离纯化整合的亲环素蛋白并进行结构功能分析提供了良好的条件。

5.2 展望

目前已经得到茶树上 ACS 及 ACO 基因全长, 虽然进行了品种间以及龙井 43 不同时期的表达含量分析, 但是这两个基因在茶树抗逆中的作用还有待进一步实验的验证, 以充分阐述这两个基因在茶树抗逆中的功能。

虽然亲环素蛋白参与细胞免疫应答, 在多种作物上均有研究, 但是在茶树上还没有相关报道, 研究得到了茶树中的亲环素全长基因, 并进行了原核表达, 后期可以在基因水平以及蛋白质水平上进一步研究其在茶树生理代谢途径和生长调控机制中所发挥的作用。

参考文献

1. 鲍国强, 扈廷茂, 海燕, 李丽莉. 合成 U3snRNA 基因上游启动区构建 ACC 合成酶反义 RNA—核酶嵌合基因的植物表达载体. 内蒙古大学学报(自然科学版). 2002, 33(1): 73-78.
2. 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.
3. 陈亮, 赵丽萍, 高其康. 茶树新梢 cDNA 克隆测序和表达序列标签(ESTs)特性分析. 农业生物技术学报. 2005, 13(1): 21-25.
4. 陈银华, 张俊红, 欧阳波, 李汉霞, 叶志彪. 花椰菜 ACC 氧化酶基因的克隆及其 RNAi 对内源基因表达的抑制作用. 遗传学报. 2005, 32(7): 764-769.
5. 陈银华, 张广平, 王海, 蔡铭, 袁平该, 陈完成. 辣椒 ACC 氧化酶基因部分序列的分离与鉴定. 农业科学与技术(英文版). 2006, 7(1): 2-7.
6. 郭敏杰, 张晓滨, 宓怀凤. 亲环素的研究进展. 免疫学杂志. 2004, 20(4): 321-325, 327.
7. 郭庆勋, 秦智伟, 丁国华, 李景鹏. 薄皮甜瓜果实 ACC 合成酶 cDNA 克隆及反义表达载体的构建. 东北农业大学学报. 2006, 37(1): 22-27.
8. 哈达, 达来, 阚锐, 孙薛蔚. 蜜瓜 ACC 氧化酶 mRNA 的成串锤头型核酶和反义 RNA 基因的合成和克隆. 内蒙古大学学院(自然科学版). 2001, 32(5): 557-561.
9. 胡钟东, 乔玉山, 王三红, 姚泉洪, 章镇. 梨 ACC 氧化酶基因(ACO)的片段克隆及其 RNAi 载体构建. 果树学报. 2006, 23(6): 877-879.
10. 黄俊生, 王华, 张世清. 香蕉 ACC 氧化酶基因(Mao3)的克隆及其表达特性分析. 园艺学报. 2005, 32(5): 807-811.
11. 黄琼珍. 植物基因工程在控制果实成熟上的应用. 四川果树. 1997, (4): 27-29.
12. 黄永红, 易干军, 周碧容, 曾继吾, 吴元立. 粉蕉 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析. 分子植物育种. 2006, 4(5): 633-639.
13. 金勇丰, 张耀洲. 桃果实 ACC 合酶 cDNA 的克隆. 园艺学报. 2000, 27(4): 257-262.
14. 金志强, 彭世清, 邵寒霜, 孔德塞, 郑学勤. 香蕉 ACC 合成酶 cDNA 的 PCR 扩增及序列测定. 热带作物学报. 1998, 19(1): 48-51.
15. 金志强, 徐碧玉, 邵寒霜, 彭世清, 郑学勤. 香蕉 ACC 合成酶含 3'末端的 cDNA 克隆. 热带作物学报. 2001a, 22(1): 30-34.
16. 金志强, 徐碧玉, 邵寒霜, 彭世清, 郑学勤. 香蕉 ACC 合成酶 cDNA 5'末端的快速扩增. 热带作物学报. 2001b, 22(3): 24-28.
17. 李天然, 张治中, 张鹤龄, 马庆虎, 宋艳茹. 番茄 ACC 合酶反义基因对河套蜜瓜的转化. Acta Botanica Sinica (植物学报:英文版). 1999, 41(2): 142-145.
18. 梁月荣, 冯艳飞. 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.
19. 刘传银, 田颖川. 番茄 ACC 合成酶 cDNA 克隆及其对果实成熟的反义抑制. 生物工程学报. 1998, 14(2): 139-146.

20. 刘会超, 李永春, 巨关生, 孙振元, 柴德勇. 香石竹 ACC 氧化酶基因克隆及其反义表达载体构建. 核农学报. 2005, 19(6): 461-464,473.
21. 刘中大. 番茄 1 位氨基环丙烷羧酸 (ACC) 合成酶基因的分离和克隆. 内蒙古大学学报: 自然科学版. 1998, 29(4): 548-551.
22. 陆璐, 王鸣. 哈密瓜 ACC 氧化酶 cDNA 克隆及其序列分析. 园艺学报. 2000, 27(1): 32-36.
23. 罗云波, 申琳. 番茄中反义 ACC 合成酶基因的导入与乙烯生物合成的控制. 农业生物技术学报. 1995, 3(2): 38-44.
24. 马庆虎, 宋艳茹. 在转基因烟草中表达番茄反义 ACC 合成酶基因及其对芽再生的影响. Acta Botanica Sinica (植物学报: 英文版). 1997, 39(11): 1047-1052.
25. 饶景萍, 童斌, 中野龙平, 稻叶昭次. 柿果实 ACC 合成酶 cDNA 的克隆及其序列分析. 西北植物学报. 2001, 21(5): 819-825.
26. 饶景萍, 杨书珍, 中野隆平, 稻叶昭次. 柿果实 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析. 中国农业科学. 2002, 35(6): 695-699.
27. 宋喜贵, 阎茂华, 路正社, 王丽娟, 王喆之. 番茄 ACC 合成酶反义基因在转基因猕猴桃中表达的初步研究. 连云港师范高等专科学校学报. 2003, 6(2): 69-71.
28. 邵丽华, 哈斯阿古拉, 方天祺. 河套蜜瓜 ACC 氧化酶基因 cDNA 部分片段的克隆和序列分析. 内蒙古大学学报(自然科学版). 2004, 35(3): 286-289.
29. 汤福强, 刘愚, 施教耐白永延, 毛慧珠, 洪熠, Straeten V D. ACC 合酶基因及其反义基因转化番茄获得转基因植株. 科学通报. 1994, 39(24): 2280-2283.
30. 唐霞, 马俊莲, 刘月英, 王国英. 柿果 ACC 合成酶基因的克隆与植物表达载体的构建. 果树学报. 2005, 22(2): 172-174.
31. 王爱勤, 杨丽涛, 王自章, 韦宇拓, 何龙飞, 李杨瑞. 甘蔗 ACC 氧化酶全长 cDNA 的克隆及序列分析. 广西植物. 2006, 26(2): 194-199.
32. 王春霞, 简志英, 刘愚, 邹琦, 白永延, 毛慧珠. ACC 合成酶基因及其反义基因对西瓜的遗传转化. 植物学报 (英文版). 1997, 39(5): 445-450.
33. 王洪振, 周晓馥. 简并 PCR 技术及其在基因克隆中的应用. 遗传. 2003, 25(2): 201-204.
34. 王俊英, 张开春, 王俊平, 张春科. 樱桃 ACC 氧化酶基因的克隆和序列分析. 华北农学报. 2002, 16(1): 11-15.
35. 王志成, 蒋建雄, 钟军, 易自力, 刘清波. PCR 快速筛选棉纤维 cDNA 文库分离全长 cDNA 序列. 湖南农业大学学报(自然科学版). 2005, 31(3): 272-275.
36. 王自章, 李杨瑞, 张树珍, 林俊芳, 郭丽琼. 甘蔗 ACC 氧化酶基因片段的克隆与序列分析. 遗传学报. 2003, 30(1): 62-69.
37. 吴波, 罗光明, 刘红宁. 酸橙 ACC 氧化酶基因片段克隆及序列分析. 江西农业大学学报. 2006, 28(6): 923-926.
38. 徐昌杰, 陈昆松, 张上隆. 猕猴桃 ACC 合成酶基因家族四个成员的克隆. 农业生物技术学报. 2001, 9(1): 55-57.
39. 徐晓峰, 黄学林, 黄霞. ACC 氧化酶反义基因转化青花菜的研究. 中山大学学报: 自然科学版. 2003, 42(4): 64-68.

40. 杨甲定, 钟海文. 白兰瓜中 ACC 氧化酶基因的克隆与序列分析. 兰州大学学报: 自然科学版. 2005, 41(1): 122-124.
41. 余义勋, 张俊卫, 孙振元, 包满珠. 香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆与植物表达载体构建. 林业科学研究. 2002, 15(3): 256-260.
42. 张丽, 唐霞, 马俊莲, 刘月英. 富有柿果 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析. 华北农学报. 2007, 22(1): 69-72.
43. 张树珍, 杨本鹏, 刘飞虎. 康乃馨 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析. 热带作物学报. 2002a, 23(1): 67-71.
44. 张树珍, 汤火龙, 杨本鹏, 刘飞虎. 康乃馨 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其反义植物表达载体的构建. 云南植物研究. 2002b, 24(6): 775-780.
45. 张晓海, 扈廷茂, 海燕, 李丽莉, 王永胜. 番茄 ACC 合成酶基因的反义 Rna—核酶嵌合基因植物表达载体的构建及对番茄的转化. 内蒙古大学学报: 自然科学版. 2001, 32(1): 74-78.
46. 张永清, 邱并生. 蕃茄 1—氨基环丙烷羧酸 Acc 合成酶基因的克隆和部分序列分析. 高技术通讯. 1992, 2(11): 19-21.
47. 邹爱兰, 陈崇顺. 桃基因组 Acc 合成酶基因的分离及其生物信息学分析. 江苏农业科学. 2005, 3: 82-85.
48. Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M. C., Durieux, S., Spik, G., Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(5): 2714-2719.
49. Baker, E. K., Colley, N. J., Zuker, C. S., The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. Embo J. 1994, 13(20): 4886-4895.
50. Callahan, A. M., Morgens, P. H., Wright, P., Nichols, K. E., Comparison of Pch313 (pTOM13 Homolog) RNA Accumulation during Fruit Softening and Wounding of Two Phenotypically Different Peach Cultivars. Plant Physiol. 1992, 100(1): 482-488.
51. Calvo, A. P., Nicolas, C., Lorenzo, O., Nicolas, G., Rodriguez, D., Evidence for Positive Regulation by Gibberellins and Ethylene of ACC Oxidase Expression and Activity During Transition From Dormancy to Germination in *Fagus sylvatica* L. Seeds. J Plant Growth Regul. 2004, 23(1): 44-53.
52. Chen, L., Zhao, L. P., Gao, Q. K., Generation and analysis of expressed sequence tags from the tender shoots cDNA library of tea plant (*Camellia sinensis*). Plant Science. 2005, 168(2): 359-363.
53. Deikman, J., Kline, R., Fischer, R. L., Organization of Ripening and Ethylene Regulatory Regions in a Fruit-Specific Promoter from Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Physiol. 1992, 100(4): 2013-2017.
54. Del Carmen Rodriguez-Gacio, M., Nicolas, C., Matilla, A. J., The final step of the ethylene biosynthesis pathway in turnip tops (*Brassica rapa*): molecular characterization of the

- 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase BrACO1 throughout zygotic embryogenesis and germination of heterogeneous seeds. *Physiol Plant*. 2004, 121(1): 132-140.
55. Do, Y. Y., Thay, T. S., Chang, T. W., Huang, P. L., Molecular cloning and characterization of a novel 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene involved in ripening of banana fruits. *J Agric Food Chem*. 2005, 53(21): 8239-8247.
56. Dong, J. G., Fernandez-Maculet, J. C., Yang, S. F., Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89(20): 9789-9793.
57. Freskgard, P. O., Bergenhem, N., Jonsson, B. H., Svensson, M., Carlsson, U., Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science*. 1992, 258(5081): 466-468.
58. Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R., Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, 85(23): 8998-9002.
59. Gasser, C. S., Gunning, D. A., Budelier, K. A., Brown, S. M., Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990, 87(24): 9519-9523.
60. Gothel, S. F., Marahiel, M. A., Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*. 1999, 55(3): 423-436.
61. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., Speicher, D. W., Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 1984, 226(4674): 544-547.
62. Hidalgo, M. S., Tecson-Mendoza, E. M., Laurena, A. C., Botella, J. R., Hybrid 'Sinta' papaya exhibits unique ACC synthase 1 cDNA isoforms. *J Biochem Mol Biol*. 2005, 38(3): 320-327.
63. Holdsworth, M. J., Schuch, W., Grierson, D., Organisation and expression of a wound/ripening-related small multigene family from tomato. *Plant Mol Biol*. 1988, 11(2): 81-88.
64. Huang, F. C., Do, Y. Y., Huang, P. L., Genomic organization of a diverse ACC synthase gene family in banana and expression characteristics of the gene member involved in ripening of banana fruits. *J Agric Food Chem*. 2006, 54(11): 3859-3868.
65. Joseph, J. D., Heitman, J., Means, A. R., Molecular cloning and characterization of *Aspergillus nidulans* cyclophilin B. *Fungal Genet Biol*. 1999, 27(1): 55-66.
66. Kim, W. T., Yang, S. F., Turnover of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Protein in Wounded Tomato Fruit Tissue. *Plant Physiol*. 1992, 100(3): 1126-1131.
67. Kullertz, G., Liebau, A., Rucknagel, P., Schierhorn, A., Diettrich, B., Fischer, G., Luckner, M., Stress-induced expression of cyclophilins in proembryonic masses of *Digitalis lanata* does not protect against freezing/thawing stress. *Planta*. 1999, 208(4): 599-605.
68. Lasserre, E., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Bull, J., Pech, J. C., Balague, C., Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol Gen Genet*. 1996, 251(1): 81-90.

69. Lasserre, E., Godard, F., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Pech, J. C., Roby, D., Balague, C., Differential activation of two ACC oxidase gene promoters from melon during plant development and in response to pathogen attack. *Mol Gen Genet.* 1997, 256(3): 211-222.
70. Lhoest, G. J., de Jong, A. P., Meiring, H. D., Maton, N., Latinne, D., Verbeeck, R. K., Otte, J. B., Zurini, M., Isolation, identification and immunosuppressive activity of a new IMM-125 metabolite from human liver microsomes. Identification of its cyclophilin A-IMM-125 metabolite complex by nanospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1998, 33(10): 936-942.
71. Loh, E. Y., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., Davis, M. M., Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science.* 1989, 243(4888): 217-220.
72. Lopez-Gomez, R., Morales-Dominguez, F., Mendoza Alcazar, O., Gomez-Lim, M. A., Identification of a genomic clone to ACC oxidase from papaya (*Carica papaya* L.) and expression studies. *J Agric Food Chem.* 2004, 52(4): 794-800.
73. Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Matsuda, N., Nesumi, K., Sano, M., Tsuji, K., Kawakami, Y., Kawakami, T., Effects of tea infusions of various varieties or different manufacturing types on inhibition of mouse mast cell activation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998, 62(11): 2277-2279.
74. Marivet, J., Margis-Pinheiro, M., Frendo, P., Burkard, G., Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. *Plant Mol Biol.* 1994, 26(4): 1181-1189.
75. McGarvey, D. J., Christoffersen, R. E., Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J Biol Chem.* 1992, 267(9): 5964-5967.
76. Meller, Y., Sessa, G., Eyal, Y., Fluhr, R., DNA-protein interactions on a cis-DNA element essential for ethylene regulation. *Plant Mol Biol.* 1993, 23(3): 453-463.
77. Nakajima, H., Kono, N., Yamasaki, T., Hotta, K., Kawachi, M., Kuwajima, M., Noguchi, T., Tanaka, T., Tarui, S., Genetic defect in muscle phosphofructokinase deficiency. Abnormal splicing of the muscle phosphofructokinase gene due to a point mutation at the 5'-splice site. *J Biol Chem.* 1990, 265(16): 9392-9395.
78. Oeller, P. W., Lu, M. W., Taylor, L. P., Pike, D. A., Theologis, A., Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science.* 1991, 254(5030): 437-439.
79. Oh, K., Ivanchenko, M. G., White, T. J., Lomax, T. L., The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta.* 2006, 224(1): 133-144.
80. Saito, T., Tadakuma, K., Takahashi, N., Ashida, H., Tanaka, K., Kawamukai, M., Matsuda, H., Nakagawa, T., Two cytosolic cyclophilin genes of *Arabidopsis thaliana* differently regulated in temporal- and organ-specific expression. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999, 63(4): 632-637.
81. Sato, T., Theologis, A., Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989, 86(17): 6621-6625.
82. Schlagnhauser, C. D., Glick, R. E., Arteca, R. N., Pell, E. J., Molecular cloning of an ozone-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA and its relationship with a

- loss of rbcS in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Plant Mol Biol.* 1995, 28(1): 93-103.
83. Sigal, N. H., Dumont, F. J., Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol.* 1992, 519-560.
84. Trusov, Y., Botella, J. R., Silencing of the ACC synthase gene ACACS2 causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. *J Exp Bot.* 2006, 57(14): 3953-3960.
85. Van der Straeten, D., Van Wiemeersch, L., Goodman, H. M., Van Montagu, M., Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87(12): 4859-4863.
86. Wang, D., Fan, J., Ranu, R. S., Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from rose (*Rosa x hybrida*). *Plant Cell Rep.* 2004, 22(6): 422-429.
87. Wang, X., Bauer, J. H., Li, Y., Shao, Z., Zetoune, F. S., Cattaneo, E., Vincenz, C., Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem.* 2001, 276(36): 33812-33820.
88. Wong, W. S., Ning, W., Xu, P. L., Kung, S. D., Yang, S. F., Li, N., Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) fruit. *Plant Mol Biol.* 1999, 41(5): 587-600.
89. Woodson, W. R., Park, K. Y., Drory, A., Larsen, P. B., Wang, H., Expression of Ethylene Biosynthetic Pathway Transcripts in Senescing Carnation Flowers. *Plant Physiol.* 1992, 99(2): 526-532.
90. Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E., Lyttle, C. R., Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem.* 1992, 267(17): 11968-11971.
91. Yip, W. K., Dong, J. G., Yang, S. F., Purification and Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase from Apple Fruits. *Plant Physiol.* 1991, 95(1): 251-257.
92. Yip, W. K., Moore, T., Yang, S. F., Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89(6): 2475-2479.

致 谢

本论文是在中国农业科学院茶叶研究所陈亮研究员的悉心指导下完成的。导师学识之渊博、思维之敏锐以及治学之严谨都给我留下了深刻的印象并且使我终身受益。导师求实的精神、高尚的人格和呕心沥血的敬业精神为我树立了楷模。在此论文完成之际，谨向陈亮老师表示衷心的感谢并致以崇高的敬意。

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，特别是课题组的虞富莲研究员以及赵丽萍师姐，王新超和姚明哲和两位师兄，他们在生活上和实验上都给予我无微不至的关心和帮助，实验室的马春雷、梅菊芬、刘振、周少敏和黄海涛都给了我非常大的帮助，在此一并表示衷心的感谢。还有古小玲同学，作为室友，在生活上给了我很大的关怀，同时感谢我的男友李红亮在三年中对我实验上的帮助，生活上的关心以及精神上的支持。

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。

值此论文完成之际，特别感谢我的父母和家人在我求学路上给予我精神和物质上的支持。

最后，谨向所有关心、支持和帮助我的亲友、老师与同学表示诚挚的谢意！

张亚丽

2007 年 6 月于杭州

作者简历

姓名：张亚丽

性别：女

出生日期：1982 年 10 月 25 日

出生籍贯：河南省洛阳市

学历：硕士研究生

曾获何种荣誉：2005 年获得中国农业科学院研究生院学习优秀奖

发表论著情况等：

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

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

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