

‘安吉白茶’抑制消减杂交 cDNA 文库的构建及初步分析

李娟,刘硕谦,刘仲华,李勤,吴扬,邓婷婷,黄建安

(湖南农业大学茶学教育部重点实验室,长沙 410128)

摘要:应用抑制消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)分离‘安吉白茶’全白期与全绿期叶片差异表达基因,成功构建了‘安吉白茶’白期叶与绿期叶的正、反向消减文库。随机挑选80个阳性克隆测序,通过BLASTX比对分析,80个序列中有30个没有找到任何同源序列,8个序列太短,且同源性不高,42个序列与已知蛋白有着或高或低的同源性。其中有3个基因片段可能与‘安吉白茶’高氨基酸形成相关。

关键词:安吉白茶;抑制消减杂交;氨基酸;差异表达基因

中图分类号:S571.1,Q781

文献标志码:A

论文编号:2010-2925

Construction and Preliminary Analyses of SSH cDNA Libraries of Anji Baicha (*Camellia sinensis*)

Li Juan, Liu Shuoqian, Liu Zhonghua, Li Qin, Wu Yang, Deng Tingting, Huang Jian'an

(The Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: To separate the differentially expressed genes between white and green period leaf of 'Anji Baicha', a subtracted library was constructed by the suppression subtractive hybridization (SSH) method. By sequencing the 80 recombinant clones and through BlastX analysis, 30 showed no homologous, 8 had short sequence and also showed poor homologous, for the other 42 fragments in 80 recombinant clones. They showed more or less homologous to all proteins in the database. 3 fragments might have correlation with high content of amino acid in 'Anji Baicha'.

Key words: Anji Baicha; suppression subtractive hybridization; amino acid; differential expression genes

0 引言

茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]是中国重要的经济作物之一,为多年生常绿木本植物,其作为栽培作物在中国已有3000多年的历史。不论野生型或栽培型茶树,都属于山茶属(*Camellia*)茶组(Section *Thea*)各个种。由于世代的异花授粉以及人类的变异选择,使茶树种质资源的遗传多样性非常丰富,育成的品种达数百个^[1]。

‘安吉白茶’是在浙江省安吉县发现的自然突变体茶树。该茶树在自然生长条件下,每年春季新生芽叶先呈现浅绿色,随后逐渐变为乳白色,在春茶后期又恢

复成正常绿色。返白前后新梢氨基酸含量及组成发生了显著变化,全白期氨基酸总量达到最高峰,比一般茶树高2~3倍^[2]。因为其特异的外观特征与内在品质,‘安吉白茶’为制作高档名优茶的理想原料。已有研究认为,‘安吉白茶’阶段性返白是其内部基因突变的结果,突变的基因在一定的温度范围内得以表达或表达加强^[3]。但具体是什么基因起作用,及其进一步的基因调控都未进行研究。若从‘安吉白茶’白化叶与正常绿色叶的差异表达基因入手,研究差异表达基因的生物学功能,有可能获得‘安吉白茶’品质性状的优异基因,如高茶氨酸相关基因,并可能揭示氨基酸超常富集

基金项目:国家自然科学基金“茶氨酸生物合成的基因转录调控研究”(30871572);湖南农业大学人才稳定基金“茶树重要功能基因的克隆与鉴定”(07WD22);湖南省研究生创新基金“茶氨酸生物合成相关基因的全长克隆及功能研究”(CX2009148)。

第一作者简介:李娟,女,1981年生,湖南石门人,博士研究生,主要从事茶树分子生物学方面的研究。通信地址:410128 湖南农业大学第十一教学楼北四楼茶学教育部重点实验室, Tel: 0731-84635304, E-mail: xixi_lj@126.com。

通讯作者:黄建安,女,1964年出生,湖南沅江人,教授,博士,主要从事茶树分子生物学方面的研究。通信地址:410128 湖南农业大学第十一教学楼北四楼茶学教育部重点实验室, Tel: 0731-84635304, E-mail: jian7513@sina.com。

收稿日期:2010-10-13, **修回日期:**2010-12-07。

的本质因素。

茶树重要功能基因的克隆及鉴定是茶树生物技术研究的重点内容之一,也是茶树遗传改良工作的基础。然而由于复杂的遗传背景,茶树基因组研究基础还比较薄弱,到目前为止,茶树重要功能基因的分离和克隆尚处于起步阶段^[4-12]。本研究以茶树本身的差异表达基因为突破口,从中筛选茶树重要功能基因,具有效率高,目的性强,投入少等优点,为茶树基因组研究开辟了一条新的途径。

抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)是抑制PCR与消减杂交技术相结合的一种简单而快速的分离差异基因的方法。本研究利用SSH技术,以‘安吉白茶’全白期与全绿期叶片为研究对象,筛选二者的差异表达基因,通过对其功能进行分析,寻找优良基因,并从基因水平初步探讨‘安吉白茶’春梢中氨基酸超常富集的机制,对充分开发和利用中国珍贵茶树资源有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为‘安吉白茶’全白期(春茶早期)与全绿期(春茶中、后期)1芽2叶,采后迅速用液氮处理1 min,然后置-70℃冰箱保存备用。

Tri-Reagent试剂购自 invitrogen 公司。PolyA T tract mRNA Isolation system III、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System、pGEM-T Easy 载体系统、X-gal、IPTG 等购自 Promega 公司。PCR-Select™ cDNA Substraction Kit 购自 Clontech 公司。试验所需引物由上海生工生物工程公司合成。其他试剂购自上海生工生物工程公司。

1.2 试验方法和步骤

1.2.1 总 RNA 提取及 mRNA 的分离纯化 采用改良 Tri-Reagent 法,即在试剂盒说明书提供的方法基础上,在沉淀 RNA 时加入 1/2 倍体积的高盐后再加入 1/2 倍体积的异丙醇,分别提取全白期和全绿期叶片总 RNA。测定 260 nm 和 280 nm 波长下的 OD 值,计算 RNA 含量, A_{260}/A_{280} 用于纯度分析;取 2 μ L RNA 样品,加入 2 μ L 溴酚蓝混匀,点样于 1% 琼脂糖凝胶上,70 V 电泳 30 min,于凝胶成像系统中照像检测。

按照 Promega 公司的 PolyA T tract mRNA Isolation system III 使用手册分别分离纯化全白期和全绿期 mRNA。

1.2.2 抑制性消减杂交 按照 Clontech PCR-Select™ cDNA Substraction Kit 使用手册进行。

1.2.3 消减 PCR 产物的纯化与载体连接、转化与鉴定

消减杂交的二次 PCR 产物经纯化后,重悬于 50 μ L 去核酸酶水中,电泳估算 DNA 浓度及片段大小,取适量纯化后的 PCR 产物按 1:1.5 的比例与 pGEM-T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109,通过蓝白斑筛选阳性克隆。随机挑选阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定。选取含有插入片段的阳性克隆送北京华大基因公司进行序列测定。测序结果进行 BLASTX 比对分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量检测结果

紫外检测表明,其 A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0 之间,说明 RNA 的纯度较高;琼脂糖凝胶电泳结果显示,其 28s RNA 和 18s RNA 条带清晰,且 28s RNA 条带的亮度明显高于 18s RNA,即提取的总 RNA 基本无降解。

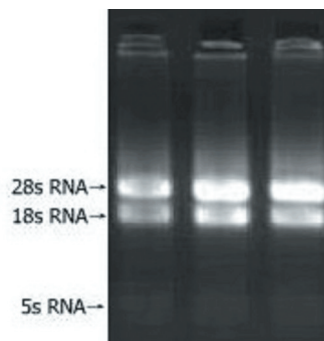
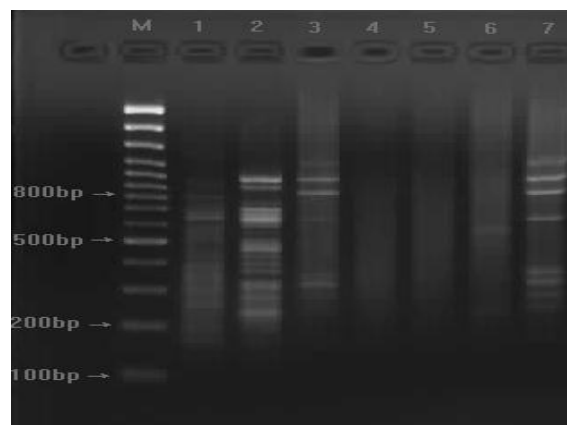


图1 总 RNA 检测结果

2.2 消减 cDNA 文库的构建

以‘安吉白茶’全白叶为 Tester,全绿叶为 Driver,进行正向消减反应;交换 Tester 和 Driver,即为反向消减反应。经过两次消减杂交和 2 轮 PCR 扩增后,消减得到的 cDNA 群体用 T/A 克隆法来构建消减文库。图 2 显示出 2 轮 PCR 富集作用的结果。消减后的 cDNA 与未消减的 cDNA 比较,出现了一些明显的条带,表明



Marker, 1道:正向消减PCR产物,2道:反向消减PCR产物,4道:正向非消减PCR产物,5道:反向非消减PCR产物,3、4、7道:对照

图2 抑制性消减杂交后经2轮PCR扩增的结果

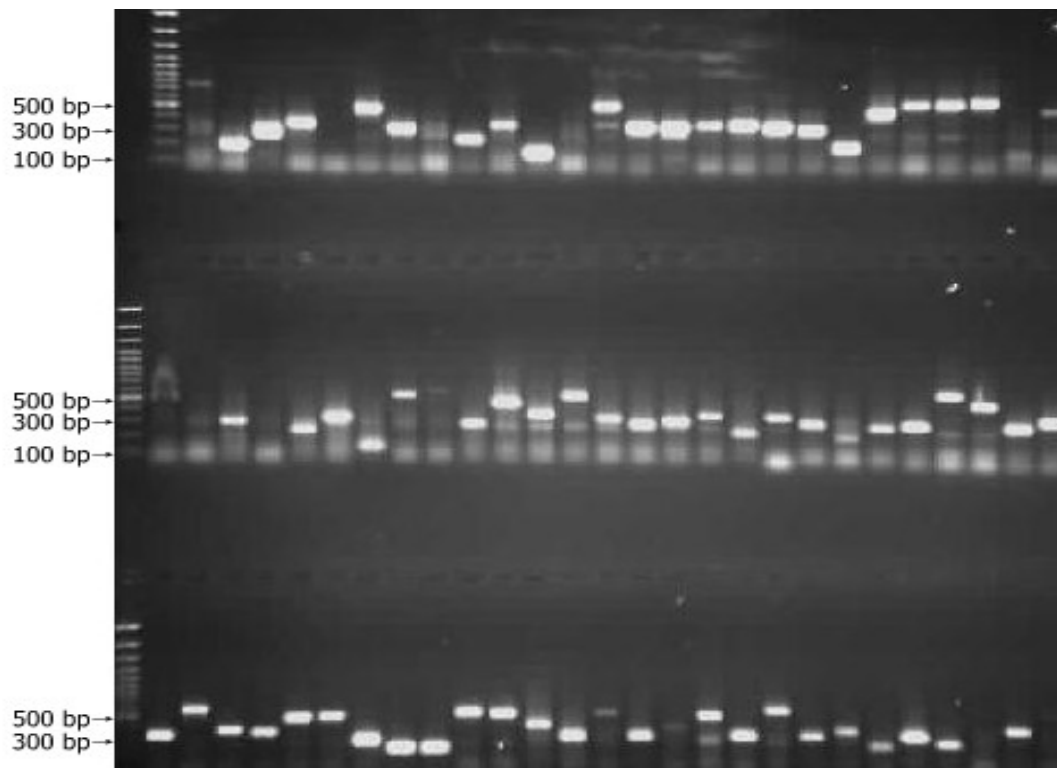


图3 正向消减文库克隆菌落PCR检测电泳图

抑制性消减杂交能够使差异表达的基因得到充分富集。也可以看到消减后的cDNA范围有所变化,这可能是由于2次扣除杂交,扣除了Tester和Driver中共同表达的基因。

2.3 菌落PCR鉴定正反向消减文库

根据蓝白斑筛选,共获得正向消减克隆216个,反向消减克隆302个。分别从正反向消减文库中各随机挑取80个白色菌落进行振荡培养,然后菌落PCR检测有外源插入片段的阳性克隆,PCR结果显示正向消减

文库有75个菌落为阳性克隆,反向消减文库有77个菌落为阳性克隆。图3为正向消减文库菌落PCR检测的电泳结果,从图中可见,插入片段大小不等,范围在200 bp~900 bp之间。

2.4 测序结果的比对与分析

从正反向文库中随机挑选共80个阳性克隆,送北京华大基因公司测序,其中27个序列与已知的茶树基因序列具有高度同源性,53个序列在已登录的茶树基因序列中无相似性,故确定为在茶树中的新克隆基因

表1 阳性片段BLASTX比对结果

序列编号	大小/bp	E值	BLASTX结果	样品
1-1	520	—	No significant similarity	全白期
1-2	431	6e-20	Cinnamate-4-hydroxylase [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-3	504	—	No significant similarity	全白期
1-4	321	—	No significant similarity	全白期
1-5	203	4e-26	AGT (Serine/alanine:glyoxylate aminotransferase) [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-6	724	7e-32	Cysteine protease inhibitor [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-7	807	2e-26	DNA(RNA)binding protein [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-8	435	—	No significant similarity	全白期
1-9	678	2e-81	SHM7 (serine hydroxymethyltransferase 7); glycine hydroxymethyltransferase [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-10	254	—	No significant similarity	全白期
1-11	794	—	No significant similarity	全白期

续表 1

序列编号	大小/bp	E 值	BLASTX 结果	样品
1-12	642	—	No significant similarity	全白期
1-13	471	—	No significant similarity	全白期
1-14	789	2e-22	60S ribosomal protein L30 (RPL30B) [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-15	785	1e-43	YLS8 (yellow-leaf-specific gene 8) [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-16	803	2e-43	calcium ion binding, calcineurin-like protein [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-17	739	3e-21	Cytochrome c oxidase subunit I [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-18	654	—	No significant similarity	全白期
1-19	531	—	No significant similarity	全白期
1-20	833	1e-19	ATC4H (CINNAMATE-4-HYDROXYLASE) [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-21	790	—	No significant similarity	全白期
1-22	744	2e-25	AGT (Serine/alanine:glyoxylate aminotransferase) [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-23	319	—	No significant similarity	全白期
1-24	521	1e-32	PSBQ/PSBQ-2 (photosystem II subunit Q-2); calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	全白期
1-25	432	—	No significant similarity	全白期
1-26	805	9e-61	Cytochrome c oxidase subunit I [Homo sapiens]	全白期
2-1	766	1e-31	PSBQ/PSBQ-2 (photosystem II subunit Q-2); calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-2	776	—	No significant similarity	全绿期
2-3	766	—	No significant similarity	全绿期
2-4	770	2e-41	HhH-GPD base excision DNA repair family protein [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-5	621	—	No significant similarity	全绿期
2-6	811	6e-36	PREDICTED: PDZ and LIM domain 5 isoform 7 [Pan troglodytes]	全绿期
2-7	226	—	No significant similarity	全绿期
2-8	295	—	No significant similarity	全绿期
2-9	754	—	No significant similarity	全绿期
2-10	750	—	No significant similarity	全绿期
2-11	642	—	No significant similarity	全绿期
2-12	734	6e-47	ATARCA (Arabidopsis thaliana Homolog of the Tobacco ArcA);nucleotide binding [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-13	776	5e-32	Calmodulin-binding heat-shock protein, calmodulin binding/triacylglycerol lipase [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-14	676	—	No significant similarity	全绿期
2-15	776	—	No significant similarity	全绿期
2-16	811	—	No significant similarity	全绿期
2-17	666	—	No significant similarity	全绿期
2-18	737	2e-39	HIS4 (Histone H4) [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-19	765	4e-18	ATATH7; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-20	738	4e-47	ribosomal protein L21 [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-21	785	3e-20	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B17.2 [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-22	767	—	No significant similarity	全绿期
2-23	772	4e-47	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9 precursor	全绿期
2-24	833	—	No significant similarity	全绿期
2-25	567	—	No significant similarity	全绿期
2-26	743	9e-51	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12 [Pan troglodytes]	全绿期

续表 1

序列编号	大小/bp	E 值	BLASTX 结果	样品
2-27	729	3e-34	mRNA for transmembrane protein [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-28	547	2e-15	hypothetical protein 3 [Microplitis demolitor bracovirus]	全绿期
2-29	787	5e-65	XTH9; hydrolase, acting on glycosyl bonds [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-30	803	3e-29	Photosystem I light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-31	829	9e-54	E1 alpha subunit of pyruvate dehydrogenase precursor, [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-32	800	5e-45	Endopeptidase/ peptidase/ threonine endopeptidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	全绿期
2-33	509	—	No significant similarity	全绿期
2-34	718	—	No significant similarity	全绿期
2-35	746	—	No significant similarity	全绿期
2-36	734	—	No significant similarity	全绿期
2-37	774	2e-82	WW domain binding protein 2 [Homo sapiens]	全绿期
2-38	771	1e-49	MEE14 (maternal effect embryo arrest 14) [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-39	811	2e-68	Ibosomal protein L10 [Homo sapiens]	全绿期
2-40	704	3e-46	gpA [Enterobacteria phage NC41]	全绿期
2-41	727	1e-49	MEE14 (maternal effect embryo arrest 14) [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-42	311	—	No significant similarity	全绿期
2-43	644	2e-18	LHCA1; chlorophyll binding [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-44	801	5e-42	IAR4 (IAA-conjugate-resistant 4); pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-45	698	1e-35	gpA [Enterobacteria phage NC41]	全绿期
2-46	826	2e-87	PAB1 (20S proteasome alpha subunit B1); peptidase [Arabidopsis thaliana]	全绿期
2-47	746	—	No significant similarity	全绿期
2-48	245	—	No significant similarity	全绿期
2-49	731	—	No significant similarity	全绿期
2-50	779	1e-47	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12 [Pan troglodytes]	全绿期
2-51	740	—	No significant similarity	全绿期
2-52	779	9e-60	Os08g0509100 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	全绿期
2-53	629	—	No significant similarity	全绿期
2-54	796	1e-49	MEE14 (maternal effect embryo arrest 14) [Arabidopsis thaliana]	全绿期

片段, 已经登录 GenBank。

将测序结果进行 BLASTX 比对, 以 E 值 $<1 \times 10^{-10}$ 为显著同源性标准。80 个序列中有 30 个没有找到任何同源序列, 8 个序列太短, 且同源性不高, 42 个序列与已知蛋白有着或高或低的同源性(表 1)。其中, 1~5 基因推测编码的氨基酸序列与拟南芥丝氨酸-乙醛酸转氨酶基因相似性较高(E-value=4e-26), 1~9 基因推测编码的氨基酸序列与拟南芥丝氨酸羟甲基转移酶基因相似性较高(E-value=2e-81), 2~13 基因推测编码的氨基酸序列与钙调热激蛋白基因相似性较高(E-value=5e-32)。

3 结论与讨论

本研究结果初步表明, ‘安吉白茶’全白期与全绿

期叶片在基因表达水平上存在着差异, 这些差异可能是导致‘安吉白茶’在返白前后氨基酸水平呈现显著变化的原因。1~5 基因推测编码丝氨酸-乙醛酸转氨酶(SGAT)氨基酸序列。SGAT 位于过氧化物酶体内, 是植物光呼吸途径中一个关键性酶, 其主要功能是催化丝氨酸与乙醛酸发生转氨反应, 生成甘氨酸和羟基丙酮酸, SGAT 对于保证植物光呼吸作用的正常进行是十分重要的, 其表达调控与植物的生长发育及其衰老有着密切的关系^[13-15]。而且丝氨酸-乙醛酸转氨酶和谷氨酸-乙醛酸转氨酶所催化的反应都是植物体内调节氨基酸含量的重要过程, SGAT 对氨基酸的合成具有重要的调控作用^[16]。1~9 基因推测编码丝氨酸羟甲基转移酶氨基酸序列。丝氨酸羟甲基转移酶也是植物光

呼吸途径中一个重要的酶,在乙醇酸途径中,乙醛酸形成后,经转氨酶的作用生成甘氨酸。甘氨酸在丝氨酸羟甲基转移酶作用下生成丝氨酸,并放出氨和二氧化碳。甘氨酸和丝氨酸虽有多种方式合成,但是在植物体中,光呼吸作用是合成这两种氨基酸的重要途径,因而说明丝氨酸羟甲基转移酶对氨基酸的生物合成有重要调控作用。2~13 基因推测编码的是钙调热激蛋白氨基酸序列。生物细胞在受热或其他理化因素(如乙醇、病毒感染、氨基酸类似物、DNA 损伤、缺氧、重金属离子等)作用后,可以抑制一些蛋白质的合成,同时启动一类新的蛋白合成基因(热激蛋白基因)产生热激反应(heat shock response),合成热激蛋白(heat shock protein, HSP)^[17],植物热激蛋白与植物的生长、发育密切相关,它参与了植物细胞的减数分裂过程,它还与植物耐热性,抗逆境及抗病虫害密切相关。

本研究利用 SSH 技术,首次成功构建了‘安吉白茶’全白期与全绿期叶片的正反向消减文库,通过菌落 PCR,对正反向消减文库进行差异筛选,共筛选到 80 个差异表达序列,其大小在 200~900 bp 之间。对差异片段进行测序分析,测序结果与 GenBank 数据库比对后,推测有 3 个基因片段可能与‘安吉白茶’高氨基酸形成相关。对这些基因的克隆和功能分析,将有可能抓住‘安吉白茶’全白期氨基酸超常富集的本质因素,将有利于更好地利用这一宝贵的茶树资源。

参考文献

- [1] 茶树种质资源与遗传改良[M].中国农业科学技术出版社,2006.
- [2] 李素芳,成浩,虞富莲,等.安吉白茶阶段性返白过程中氨基酸的变化[J].茶叶科学,1996,16(2):153-154.
- [3] 成浩,李素芳,陈明.安吉白茶特异性状的生理生化本质[J].茶叶科学,1999,19(2):87-92.
- [4] Matsumoto S, Takeuchi A, Hayatsu M, et al. Molecular cloning of phenylalanine ammonium lyase cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using a tea PAL cDNA probe[J]. Theor. Appl. Genet., 1994, 89: 671-675.
- [5] Takeuchi A, Matsumoto S, Hayatsu M. Chalcone synthase from *Camellia sinensis*: isolation of the cDNA and the organspecific and sugar responsive expression of the genes[J]. Plant Cell Physiol, 1994(5):1011-1018.
- [6] 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[J].茶叶科学,21(2):94-98.
- [7] 张广辉,梁月荣,吴颖.咖啡碱生物合成研究进展及在茶树育种中的应用[J].茶叶,2005,31(1):18-23.
- [8] 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[J].茶叶科学,2001,21(1):21-25.
- [9] Guo W, Yamauchi K, Watanabe N, et al. A primeverosidase as a main glycosidase concerned with the alcoholic aroma formation in tea leaves [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995,59:962-964.
- [10] Ijima, Ogawa K, Watanabe N, et al. Characterization of β -primeverosidase, being concerned with alcoholic aroma formation in tea leaves to be processed into black tea, an preliminary observations on its substrate specificity[J]. J Agric Food Chem, 1998,46: 1712-1718.
- [11] Wang D, Kurasawa E, Yamaguchi, et al. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2 Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process [J]. J Agric Food Chem, 2001,49:1900-1903.
- [12] 张正竹,宛晓春,坂田完三.茶叶 β -葡萄糖苷酶亲和层析纯化与性质研究[J].茶叶科学,2005,25(1):16-20.
- [13] Liepman A H, Olsen L J. Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 2001;25:487-498.
- [14] Winkler A, Lea P J, Quick W P, et al. Philos Trans R Soc London, Ser B, 2000,355:1517.
- [15] Titus D E, Becker W M. Investigation of the glyoxysome-peroxisome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy[J]. J Cell Bio, 1985,101: 1288-1299.
- [16] Daisuke Igarashi, Hiroko Tsuchida, Mitsue Miyao, et al. Glutamate: Glyoxylate Aminotransferase Modulates Amino Acid Content during Photorespiration[J]. Plant Physiol, 2006,142:901-910.
- [17] Ballinger D G. The control of protein synthesis during best shock in *Drosophila* cells involves altered polypeptide elongation rates[J]. Cell, 1983,33:103-114.
- [18] 王镜岩,朱圣庚,徐长法主编,生物化学(第3版)[M].高等教育出版社.2002.
- [19] 罗志勇,陆秋恒,刘水平,等.人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定[J].生物化学与生物物理学,2003,35(6):554-560.