

茶葉苯基苯乙烯酮合成酶 cDNA 之選殖

陳英玲¹ 宋賢一² 蘇仲卿²

摘 要

茶葉中的兒茶素是經由類二苯丙烯代謝及類黃色素生合成途徑而來，而苯基苯乙烯酮合成酶(CHS)即為類黃色素生合成途徑之關鍵酵素。目前已有多種植物之 *CHS* 染色體基因、cDNA 及蛋白質被選殖或純化出來。近年來文獻中已記載由日本綠茶品種中選篩出的三種 *CHS* cDNA (*CHS1*, *CHS2* 及 *CHS3*)具有組織特異性並對糖類刺激都具有相同反應的特性。

由台茶 12 號心芽中純化出 poly (A)⁺ RNA,以逆轉錄酶及 DNA 聚合酶合成雙股 cDNA 並以 λ ZAP II 為載體建立 cDNA 庫。以自行合成台茶 12 號之 *CHS* cDNA 片段 (400bp)為探針篩選 10⁵ 選殖體獲得 18 個正反應株，可分為兩型，其中 Class I 之 pC4.1, pC6.4, pC9.3 及 Class II 之 pC14.1 較長。經 DNA 定序及與文獻中茶樹 *CHS* cDNA 序列比對確定皆為全長之茶葉 *CHS* cDNA。

茶葉四條 *CHS* cDNA 均具有單一的轉譯區域，由轉譯起點 ATG 向右延伸轉譯區共 1,167 個鹽基對；各轉譯出 389 個胺基酸的蛋白質，Mr 量為 42.5~42.6KDa，彼些間相似性達 94~98%。在 *CHS* cDNA 3' 端有數個轉譯終點；並在 poly(A)⁺ tail 上游非轉譯區有一個 polyadenylation signal。由 *CHS* cDNA 核苷酸及胺酸序列比較，可將核苷酸序列相似性達 90% 以上之 Class I 與文獻 *CHS2*;Class II 與文獻 *CHS1* 各歸為一屬；至於文獻第三型,*CHS3*, 與 Class I 或 Class II 相似性為 74~85%，在本研究中未被發現。利用聚合酶連鎖反應選殖台茶 12 號的染色體 *CHS* 基因，將其 DNA 序列和 *CHS* cDNA 比對，發現台茶 12 號的染色體 *CHS* 和菸草一樣不含 intron。

茶葉 *CHS* 和其他已知 *CHS* 序列植物一樣都具有六個非常保守的 cysteine，其中 cysteine-164 可能為茶葉 *CHS* 的活性位置；茶葉 *CHS* 和其他大多數植物之 *CHS* 一樣含有一個 leucine zipper motif，此 motif 和蛋白質的雙體結構有關，由此推測茶葉的 *CHS* 亦可能為雙體結構。

關鍵字：茶、苯基苯乙烯酮合成酶、互補核糖核酸、基因選殖

1. 行政院農業委員會茶業改良場 副研究員。臺灣 桃園縣。
2. 臺灣大學 教授。臺灣 臺北市。

前 言

茶為多年生的木本植物，其栽培方法、傳統育種及加工技術已相當成熟，但因組織及細胞培養技術尚未成功，其基礎生化及遺傳工程方面的研究報告非常稀少，截至目前為止對 *CHS* 及 *PAL* 基因的選殖只有日本(Takeuchi *et al.*, 1994; 1995)的兩篇報導。

CHS 在兒茶素生合成中居關鍵角色。*CHS* 基因調控兒茶素類的生合成。兒茶素類是茶中含量最多的多元酚類，在幼嫩組織中兒茶素的含量最高；影響茶葉品質非常重要的物質。台灣茶葉的栽培以春、秋二季所生產者品質較高，而夏季除了少數地區(如新竹、苗栗之槿風茶)外，大多數茶區之茶因苦澀味重品質差不敷成本均剪除而不製茶，過去曾用遮蔭(陳, 1985; 馮及徐, 1987; 1988)及培育新品種系等方法尋求改進，均未能達到預期目標。本文由分子生物學層次來探討，針對 *CHS* 基因的結構進行研究，以期所累積數據可作為改善本省茶葉品質之依據。

材料與方法

一、試驗藥品

一般無機鹽類藥品及有機溶劑均購自 Merck 或 Gibco BRL 公司。苯酚為 BDH 公司經蒸餾處理之產品。限制酶、核酸抽取純化及雜交反應藥品購自 Boehringer Mannheim(以下簡稱 BM)、Pharmacia、Invitrogen 公司。分子量標準品購 Gibco BRL 及 BM 公司，雜交所使用的膜、放射性藥品為 Amersham 公司產品。PCR 反應所用藥品為 Promega 或 PE Applied Biosystems 公司產品。

二、試驗材料

(一) 大腸菌(*E. coli*)

XL1-Blue MRF' :

Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*[F'*proABlacIqZ* Δ M15Tn10(Tetr)]

SOLRTM :

e14(*mcrA*) Δ (*merCB-hsdSMR-mrr*)171 *sbcC recB recJ umuC::Tn5(Kan^r)uvrClac gyrA96 relA1 thi-1 endA1* λ^R [F'*proAB lacIqZ* Δ M15]Su⁻(nonsuppressing)

JM109 :

recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44relA1 Δ (*lac proAB*)F⁺*traD36 ProAB lacI^qZ* Δ M15

(二) 質 體

1. 載 體

pBluescript SK- : AMP^r ; LacZ.

pGEM⁺-T : AMP^r ; LacZ

2. 具有插入 DNA 的質體

pLF15 : pBR322 帶有約 1.5Kb 芫荽 *CHS* cDNA

pA14 : pBluescript SK- 帶有約 1.4Kb 菸草 *CHS* cDNA

pA5 : pAMP1 帶有約 0.87Kb 菸草 *CHS* cDNA

pC4 : pBluescript SK- 帶有全長茶葉 *CHS* cDNA(本研究)

pC6 : pBluescript SK- 帶有全長茶葉 *CHS* cDNA(本研究)

pC9: pBluescript SK- 帶有全長茶葉 CHS cDNA(本研究)

pC14: pBluescript SK- 帶有全長茶葉 CHS cDNA(本研究)

3. 噬菌體

λ ZAP II : AMP^r, LacZ.

ExAssist™ : helper phage.

VCSM13 : helper phage.

(三) 茶葉

供試茶樹(*Camellia sinensis*)品系有:

台茶 12 號: 台農八號(母本)×硬枝紅心(父本), 由茶業改良場育成, 適製包種茶品種, 已在全省普遍栽種。

該等茶樹均種植於茶改場茶園及品種園, 取每年七月間之成熟茶芽。

三、試驗方法

(一) 茶葉 RNA 之抽取

1. 總 RNA 之抽取

本研究根據 López-Gómez *et al.* (1992)及 Wan *et al.* (1994)發表的方法加以修正(陳等, 1999)以熱硼紗緩衝液混合 pvp-40 試劑能從茶葉中抽出高量完整且高品質之 RNA。

2. Poly(A)⁺ RNA 之純化

依 Fast Track[®] 2.0 kit(Invitrogen 公司產品)之分離法經一次分離即可充分除去 rRNA: 將已處理的全部 RNA 樣品加於含 10mL Lysis buffer (200mM NaCl, 200mM Tris-7.5, 1.5mM MgCl₂, 2% SDS 及 200 μ L protein / RNase degrader)之 50mL 離心管中, 在 65°C 下加熱 5 分鐘後迅速放於冰浴中 1 分鐘, 再將離心管置室溫下加 650 μ L 5M NaCl 將管子反覆上下搖動混和, 由 -20°C 取出已分裝好之 Oligo(dT) cellulose(約 75mg)振盪後倒於 Lysate 中蓋上離心管讓其澎潤 2 分鐘, (使 Oligo(dT) cellulose 能很快的分散), 在室溫下溫和的擺動離心管 15~16 分鐘(確保 poly(A)⁺ RNA 能被 Oligo(dT) cellulose 吸附)以 3,000rpm 離心 5 分鐘(室溫), 倒去上層液。

以 20mL 的 Binding buffer(500mM NaCl, 10mM Tris-7.5)懸濁 Oligo(dT) cellulose 並以 3,000rpm 離心 5 分鐘(室溫)後倒棄上層液。同法以 10mL Binding buffer 重複處理一次。繼續以 10 μ L Low salt wash buffer (250mM NaCl, 10mM Tris-7.5)懸濁 Oligo(dT) cellulose, 3000rpm 離心 5 分鐘(室溫)並倒棄上層液, 重複此處理 2~4 次(直到離心後不產生氣泡為止)。清洗完成後加 800 μ L Low salt wash buffer 將 Oligo(dT) cellulose 懸濁並將其移入 spin-column 中(附在套組內)以 5000rpm 離心 10 秒(室溫)倒棄外管中的液體, 重複此轉移步驟至少 2~3 次, 將所有的 Oligo(dT)移入 spin-column 內。再以 500 μ L Low salt wash buffer 清洗 spin-column 內之 Oligo(dT) cellulose 至少三次, 直到清洗液 A²⁶⁰nm \leq 0.05。

將已清洗之 spin-column 放入套組中的一微量離心管中, 加入 200 μ L elution buffer 並以吸管尖將 buffer 及 cellulose 攪和均勻, 以 5,000rpm 離心 30 秒收集離心管中的溶離液, 同法再處理一次, 二次所得之溶離液計 400 μ L 加 0.15 倍體積 2M 醋酸鈉及 2.5 倍體積之絕對酒精置 -70°C 30 分鐘, 以 12,000rpm 離心 15 分鐘(4°C), 沈澱以 70% 酒精洗兩次, 真空乾燥後溶於 20~50 μ L 無菌水中。置 -70°C 貯存。

(二) 染色體 DNA 及質體 DNA 的抽取與純化

1. 染色體 DNA 的抽取

本研究植物染色體 DNA 抽取，乃依照 Gawel *et al.* (1991) 使用 cetrimonium bromide (CTAB) 的方法。

2. 質體 DNA 的抽取與純化

依陳(1999)方法抽取。

3. 質體 DNA 少量抽取法

依據 Birnboim *et al.* (1979) 提出之 alkaline lysis 的方法而得。

(三) 核酸電泳分析

1. RNA 甲醛變性膠體電泳

依據 Sambrook *et al.* (1989) 及陳(1999)之方法。

2. DNA 電泳分析及 DNA 片斷之製備皆依照陳(1999)之方法

3. 鹼性洋菜膠體電泳

依據 Sambrook *et al.* (1989) 方法進行。

(四) 核酸轉印

1. 南方氏 (Southern) 轉印

本試驗使用 GeneScreen Plus (DuPont-760) 轉印紙。DNA 轉印步驟依照 GeneScreen Plus 的操作說明及 Southern (1975) 之方法進行。

2. 北方氏 (Northern) 轉印

依據陳(1999)之方法進行。

(五) 探針標幟及雜交反應

依據陳(1999)之方法進行。

(六) 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, 簡稱 PCR)

1. PCR 反應

取一支 0.5 mL 的離心管加入 10 μ L 10 \times synthesis buffer (25 mM MgCl₂), 16 μ L 1.25 mM dNTP Mix, 5 μ L 10 μ M primer 1, 5 μ L 10 μ M primer 2, 10 μ L 模板加水至 95.5 μ L 混和均勻後 spin down, 加入 0.5 μ L Taq DNA polymerase 以 Tip 混和, 並在表面滴入 50 μ L ~ 100 μ L 礦物油 (Sigma)。

將此離心管放入溫度控制器中設定反應條件, 首先以 94°C 10 分鐘, 再以 94°C 變性 2 分鐘, 55°C 煉合 2 分鐘; 72°C 延伸 2 分鐘進行 30~35 次循環反應; 最後以 72°C 10 分鐘使 DNA 延伸完全之後保存於 4°C 以終止反應, 取 10 μ L 反應液進行電泳分析。

2. RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)

依據陳(1999)之方法進行。

3. PCR 產物定量

PCR 反應產物中含有合成的 DNA, 殘餘的引子及游離的核苷酸, 因此利用測 UV260nm 的吸光無法正確得知 PCR 產物的產率。用 Hoefer TKO 100 的儀器, 則可測出產物中雙股 DNA 的含量。

(七) 茶葉 CHS 專一性探針之製備

依據陳(1999)方法製備。

(八) 茶葉 cDNA 庫之建立

以 Stratagene 公司的 λ ZAP-cDNA 合成套組合成茶葉 cDNA, 並以該公司的 Gigapack II Gold Packing Extract 進行身體外包裝(In vitro packaging), 建立茶葉 cDNA 庫。

1. cDNA 的合成

由 Fast Track[®] 2.0 kit 分離得到的 mRNA, 於 65 °C 加熱 10 分鐘後, 立即置於冰浴中冷卻, 做為合成第一股 cDNA 的模板。第一股 cDNA 合成後, 繼續合成第二股 cDNA。

2. cDNA 的修飾

為便於 cDNA 選殖入 λ ZAP 載體, 首先必須將 cDNA 的兩端加以修飾, 賦予適當的限制酶剪切位置(restriction site)。所合成的雙股 cDNA 的 3' 端已含有 *Xho* I 剪切位置, 必須在其 5' 端黏上 *EcoR* I 剪切位置才能和 λ ZAP 載體黏結。

3. 噬菌體的身體外包裝

Stratagene 公司的 λ ZAP-cDNA 合成套組中的 Uni-ZAP XR 載體已先經過 *Xho* I 及 *EcoR* I 剪切, 可直接與修飾完成的茶葉 cDNA 進行黏接反應。噬菌體包裝後, 除了分析包裝效率外, 還須分析重組噬菌體所佔的比率。

(九) 茶葉 CHS cDNA 的選殖

要從茶葉 cDNA 庫中選殖出 CHS cDNA, 必需將所有含 cDNA 的噬菌體都塗佈於平板上再將溶菌斑轉印到硝化纖維紙或尼龍紙上。繼續用 NaOH 將噬菌體分解, 並使 DNA 變性, 再經過中和處理及 80°C 烘烤將 DNA 固定在轉印紙上, 然後再以放射性標識的探針做雜交進行篩選, 以便從茶葉 cDNA 庫中選殖出 CHS cDNA。

(十) 茶葉 CHS cDNA 定序

本試驗是利用合成 unique primer 由 insert 之兩端逐步進行定序工作。

將帶有茶葉 cDNA 質體的細菌, 接種於 LB/Amp 液體培養基, 經過夜培養。取 2 μ L 該菌體加入 0.8 μ L 25mM dNTP, 1 μ L 20mM primer1, 1 μ L 20mM primer2, 10 μ L 10 \times PCR buffer 以 7.2 方法進行 PCR。反應完成後送往中央研究生化所委託潘扶明教授定序。

(十一) 電腦分析

DNA 序列分析所應用的電腦程式包括了 Hitachi 公司的 DNAsis, 並且利用個人電腦透過學校電腦網路, 進入中央研究院電腦應用 IG, 查詢基因庫內的 CHS 序列資料。

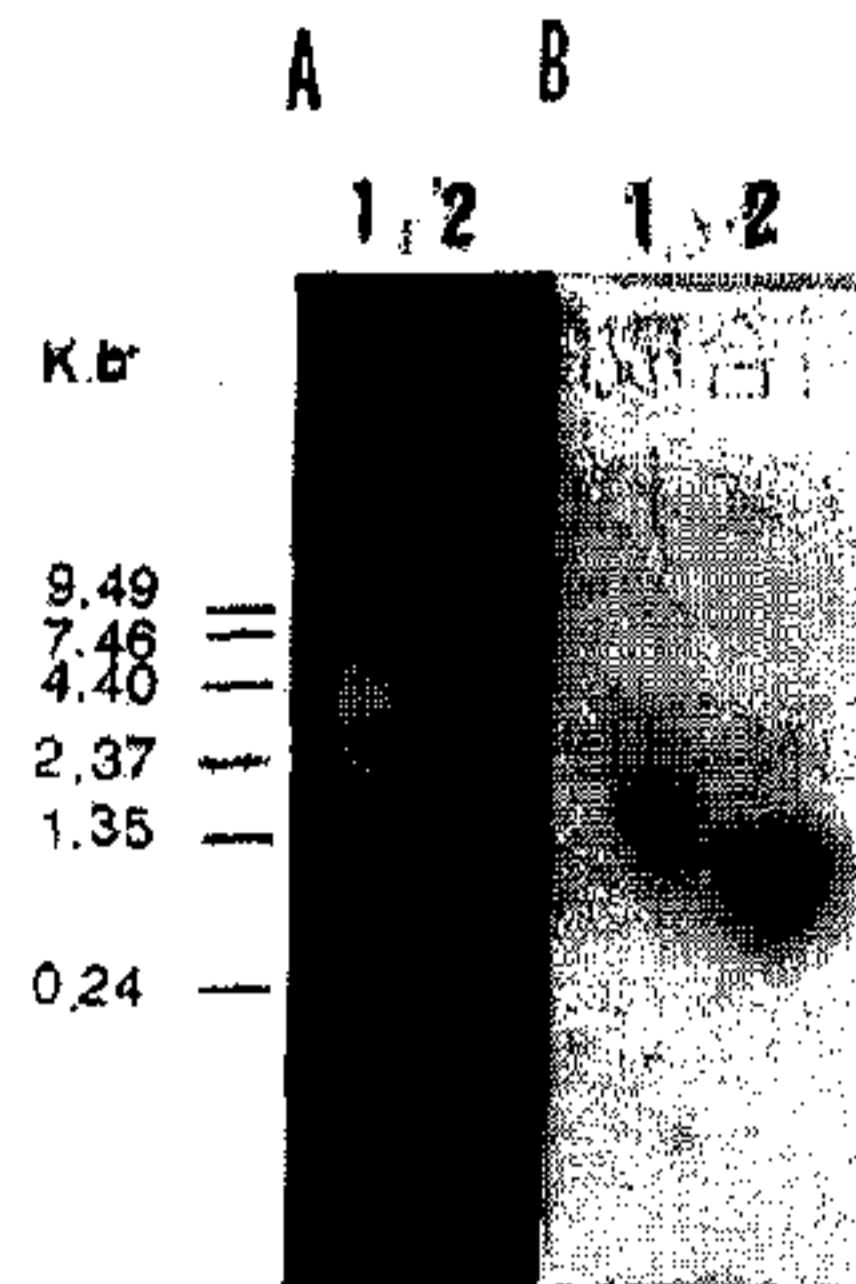
結果與討論

一、茶葉 cDNA 庫之建立

利用 *Camellia sinensis* var. TTES No.12 心芽之 mRNA(圖一)所合成的雙股 cDNA 經由電泳分析, 可知所合成的 cDNA 大小分佈在 0.3Kb~1.3Kb 之間, 雙股 cDNA 經修飾後, 以 Sephacryl-400 管柱離心分離, 以除去小分子物質, 選分子量較大分劃(約 0.2kb~1.3kb)的 cDNA 和 ZAP 載體的 arm 黏接。並利用噬菌體體外包裝系統進行建庫。由溶菌斑的數目得知包裝率平均約為 1.25×10^6 pfu/ μ g arm。包裝好的噬菌體感染 *E. coli* XL1-Blue MRF', 在 IPTG 及 X-gal 之存在下培養, 計算帶有 cDNA 的重組噬菌體所佔比例平均為 97.6%。亦即由體積 5 μ L 的分劃液所製成的 cDNA 庫中, 帶有 cDNA 的載體大約有 1.2×10^6 個。在試驗中只取其中的 1 μ L 做噬菌體的生體外包裝, 因此所建立的 cDNA 庫中噬菌體總數約為 2.5×10^5 個, 其中重組噬菌體約有 2.4×10^5 個。一部份 library 並做 amplification。

1.1 茶葉 CHS cDNA 的選殖

E. coli XL1-Blue MRF' 以茶葉的 cDNA 庫噬菌體感染後，分別塗抹於十二個含 NZY 固體培養基之培養皿(137mm)中，再將 DNA 轉印固定於硝化纖維濾紙上；並作雙重覆篩選，採用 400bp 茶葉 *CHS* cDNA 作為探針，Nick translation ^{32}P 標識後進行雜交以篩選全長的茶葉 *CHS* cDNA。第一次篩選得 21 個正反應株，將各株由平板上挖出繼續做第二、三及四次篩選，最後平板上每個溶菌斑均為正反應者才停止篩選工作。



圖一、茶葉 RNA 之甲醛洋菜膠電泳分析及與 ^{32}P 標識菸草的 *CHS* cDNA 之 Northern 雜交反應
Fig.1. Formaldehyde gel electrophoresis of *C. sinensis* var. TTES No.12 RNA

Agarose gel : 1%.

Panel A: staining with ethidium bromide.

Panel B: Northern hybridization using ^{32}P -labeled *CHS* cDNA from *N. tabacum* as probe

1: total RNA(10 μg) ; 2 : poly (A)⁺RNA(3 μg).

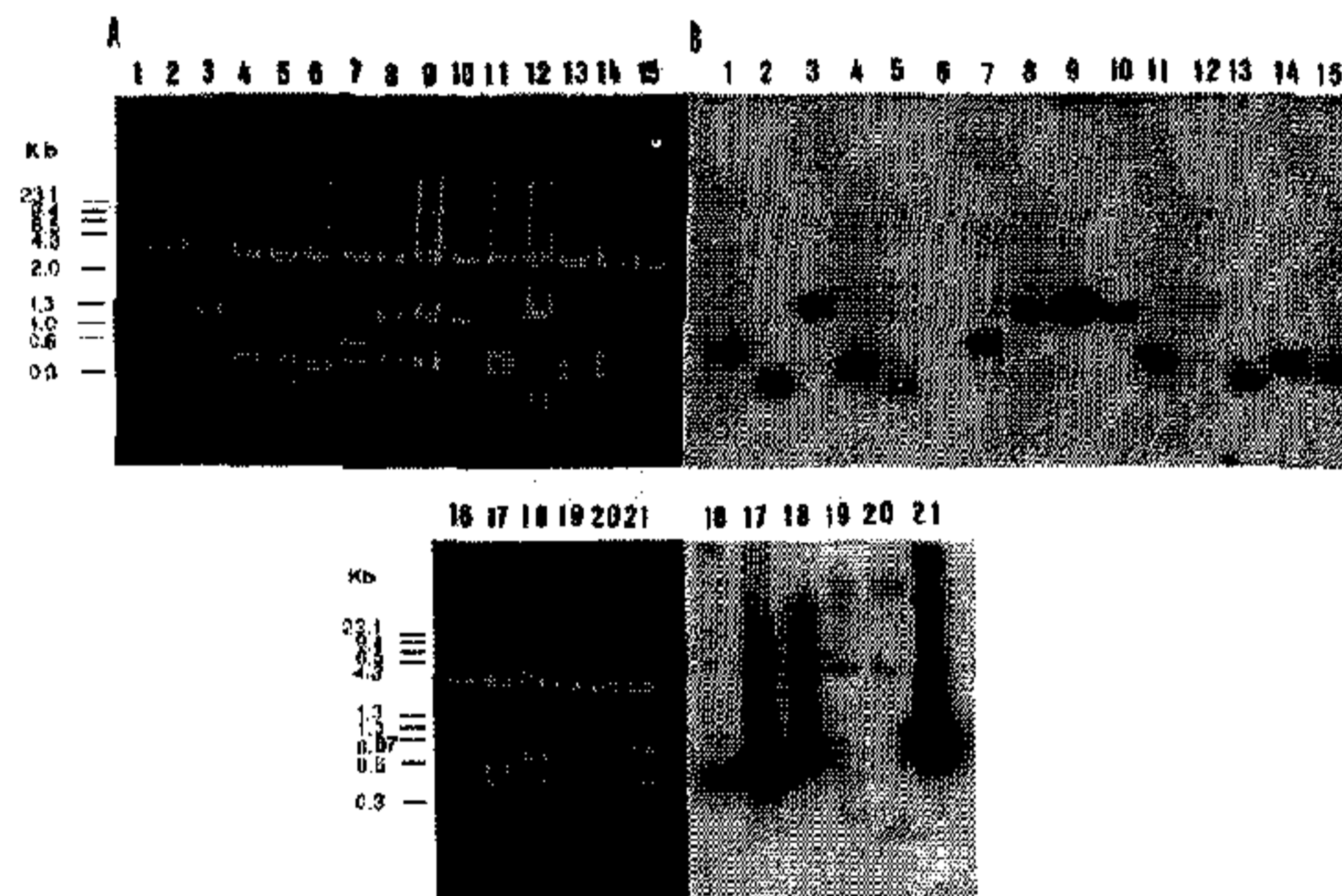
1.2 茶葉 *CHS* cDNA 正反應株的鑑定

將 21 個正反應株經 *in vivo* excision 的處理，把攜帶有外接 cDNA 的質體 pBluescriptSK-由 λ ZAP II 載體中切出，成為 phagemid，這 21 個正反應株分別命名各為 pC2.1, pC2.2, pC4.1, pC4.2, pC4.3, pC6.1, pC6.2, pC6.4, pC9.2, pC9.3, pC13.2, pC14.1, pC14.2, pC15.3, pC16.4, pC23.1, pC23.2, pC24.2, pC24.3, pC24.4, pC25。

所有正反應株之 phagemid DNA 用 *Eco* RI 及 *Xho* I 剪切後經 1% 洋菜膠體電泳分析，再將其 DNA 片段轉印至 Gene Screen plus 濾紙上，繼續以 ^{32}P 標識的 400bp 茶葉 *CHS* cDNA 做為探針，進行 Southern 雜交結果發現 pC6.1 及 pC24.3, pC24.4 並無雜交訊號，因此確認共有 18 株正反應株，並偵測其大小(圖二)分別為 1.0~1.2Kb (pC4.1, pC6.4, pC9.2, pC9.3, pC14.1)、0.8Kb (pC24.2, pC25)、0.5~0.6Kb (pC2.1, pC4.2, pC6.2, pC13.2, pC14.2, pC15.3, pC16.4, pC23.1, pC23.2)、0.3Kb (pC2.2, pC4.3)其中以 pC4.1, pC6.4, pC9.2, pC9.3, pC14.1 五株較長，而其中除 pC14.1 外，其餘用 *Eco* RI 作用時亦可將外接 DNA 切下，其大小與 *Eco* RI 及 *Xho* I 同時剪切時相差不多，由此推斷該等 cDNA 中另有一個 *Eco* RI site 以 T₃, T₇ promoter 序列為引子以 1.0~1.2Kb 之 5 株 cDNA 為模板進行 PCR 合成，以電泳分析結果發現其長均約為 1.3Kb 的 DNA 片段(圖三)。與文獻中茶葉 *CHS* cDNA 比較發現該 5 株 cDNA 幾乎涵蓋全長之 *CHS* 基因。是故五株 cDNA 均作定序分析。

1.3 各株 cDNA 之部份限制圖譜

為判斷各株 cDNA 之異同，分別以 *Pvu* II、*Pst* I、*Hind* III、*Xho* I 及 *Eco* R 等限制 作 single digest 進行 Southern 轉印後以 400bp 茶葉 *CHS* cDNA 為探針作雜交反應(圖四)並由 DNA 片段的大小排出部份限制圖譜(圖五)由 *Pst* I、*Xho* I 及 *Eco* R 作用的相對位置，可將 pC2.1, pC2.2, pC4.1, pC4.2, pC4.3, pC6.2, pC6.4, pC9.2, pC9.3, pC13.2, pC14.2, pC15.3, pC16.4, pC23.1, pC23.4, pC25 歸為一類，pC14.1 則與其他相異。由此推斷 pC14.1 與其他 16 株不同，應來自不同 mRNA 之 cDNA。pC24.2 雖不同於上述兩類，由定序結果發現兩端均為 poly (A)⁺ 證實可能為兩條以上 cDNA 在 ligation 時連接所致。

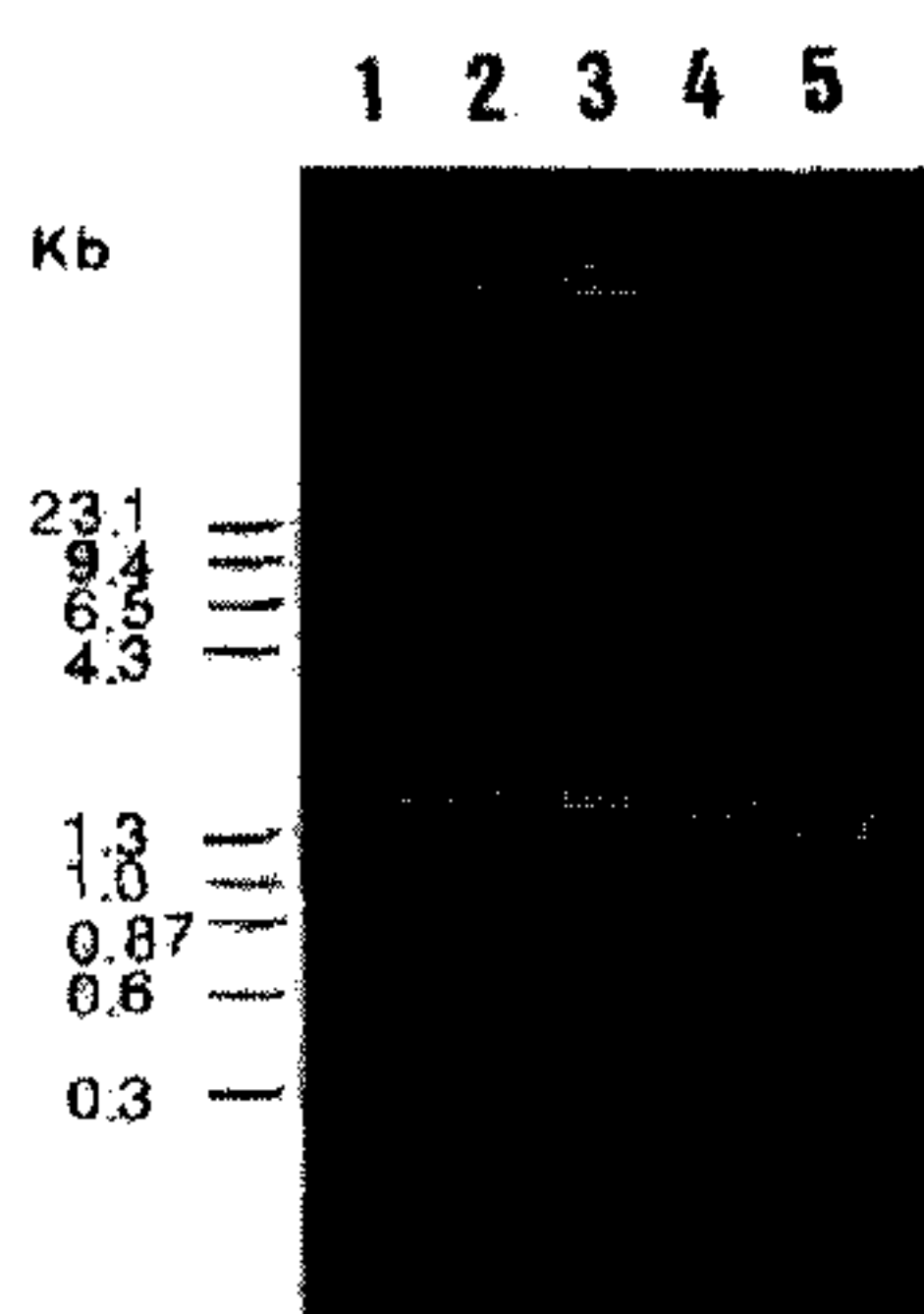


圖二、茶葉 *CHS* cDNA 株序列長短預估及 Southern 轉印分析

Fig.2. The insert size determination and Southern blot analysis of *C. sinensis* *CHS* cDNA digested with *Eco*R I and *Xho* I by using *CHS* cDNA (400bp) from *C. sinensis* var. TTES No.12 as probe

Agarose gel : 1.2%.

- | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1: pC2.1; | 2: pC2.2; | 3: pC4.1; | 4: pC4.2; |
| 5: pC4.3; | 6: pC6.1; | 7: pC6.2; | 8: pC6.4; |
| 9: pC9.2; | 10: pC9.3; | 11: pC13.2; | 12: pC14.1; |
| 13: pC14.2; | 14: pC15.3; | 15: pC16.4; | 16: pC23.1; |
| 17: pC23.2; | 18: pC24.2; | 19: pC24.3; | 20: pC24.4; |
| 21: pC25. | | | |

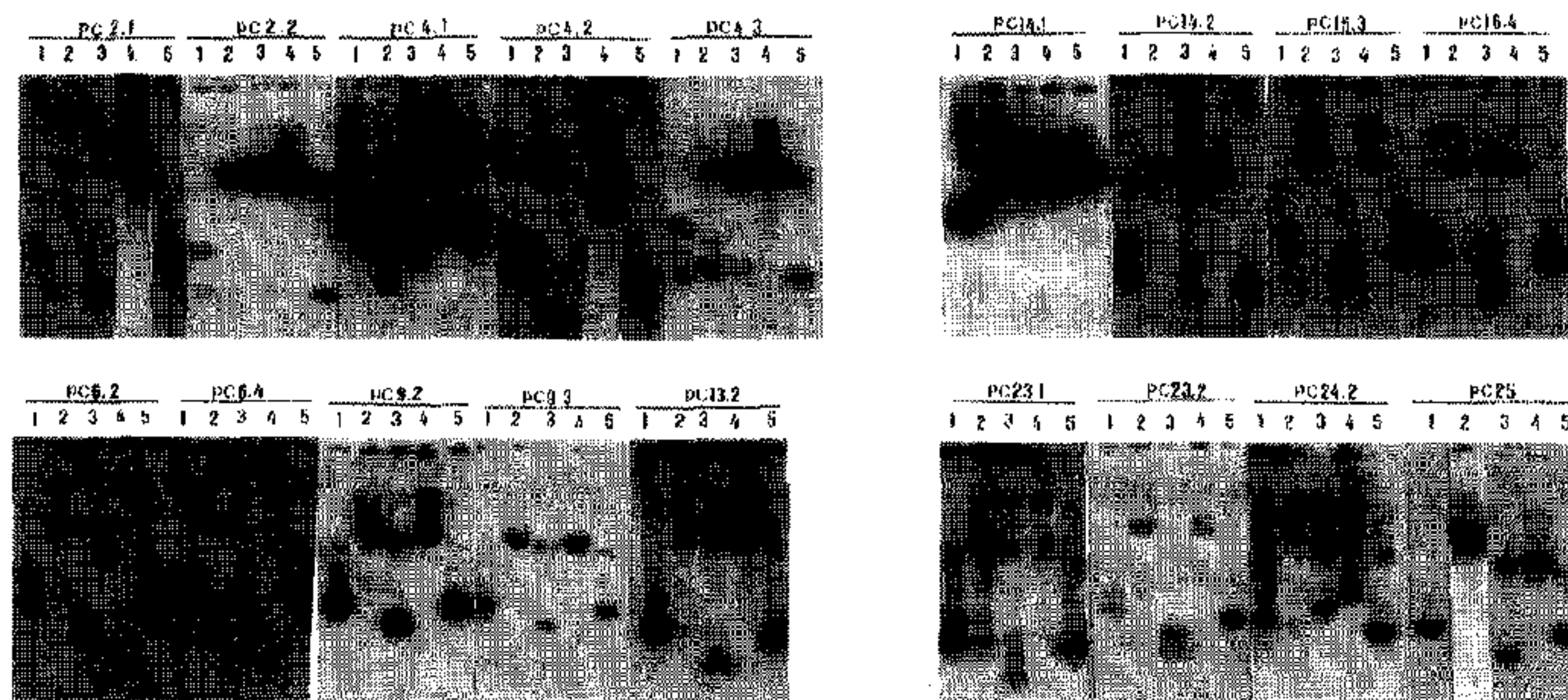


圖三、茶葉 *CHS* cDNA 正反應株為模板之 PCR 產物

Fig.3. Agarose gel electrophoresis of PCR products from T₃ and T₇ promoter sequences. *C. sinensis* positive clones were used as templates

Agarose gel : 1.2%.

1: pC4.1; 2: pC6.4; 3: pC9.2; 4: pC9.3; 5: pC14.1.



圖四、cDNA 株以內切 水解後之 Southern 轉印分析

Fig.4. Southern blot analysis of *C. sinensis* *CHS* cDNA clones digested with endonucleases. ³²P-labeled *CHS* cDNA (400bp) from *C. sinensis* was used as hybridization probe

Agarose gel : 1.2%.

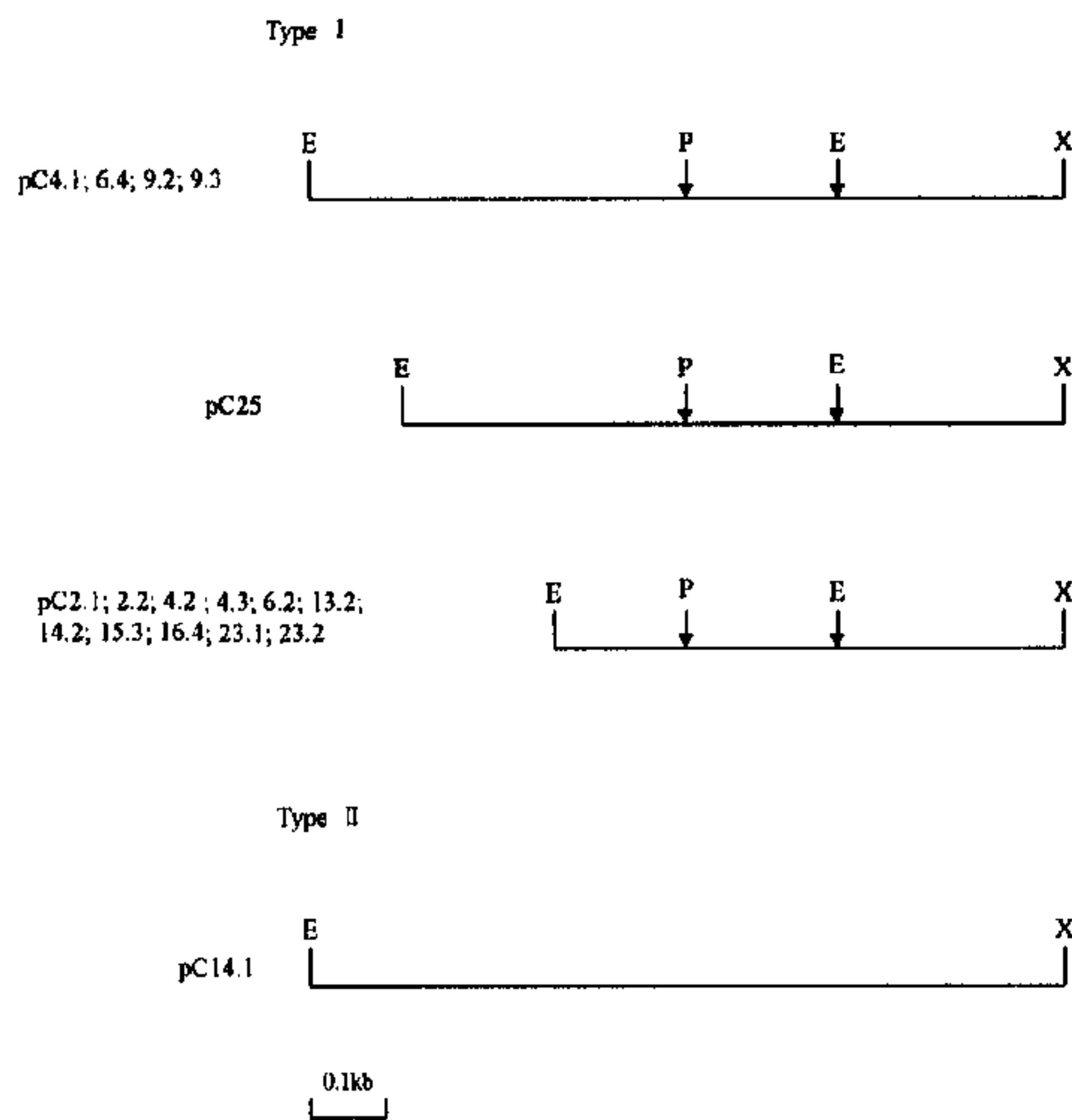
1: *Pvu* II ; 2: *Hind* III ; 3: *Pst* I ; 4: *Xho* I ; 5: *Eco* RI

二、茶葉苯基苯乙炔酮合成酶(CHS)核苷酸之序列及性質分析

2.1 DNA 序列分析

將五株全長之 cDNA 定序後與茶葉 *CHS* (400bp) 合成探針進行比對，發現該 400bp 約位於 pC4.1；pC6.4；pC9.2 及 pC9.3 之第 490bp 至第 910bp 間，且幾乎完全雷同，(此四株屬同一類 cDNA)，其中 pC9.2 與 pC9.3 的序列完全相同為同一株 cDNA。pC14.1 與其他數株則差異較大(圖五)。

四株 cDNA 均含有 1,167bp 之轉譯區域 (ORF)，轉譯起點為第一次出現之 ATG，終點密碼 TAA 具有一個 polyadenylation site 及不等長的 poly(A)⁺ tail。



圖四、以茶葉 ³²P-*CHS* cDNA 部份片段為探針建立之 *CHS* cDNA 的部份限制圖譜，各株依其 *Eco* RI 及 *Pst* I 的位置分為兩類。

Fig.4. Partial restriction maps of *CHS* cDNA clones established by hybridization with ³²P-*CHS* cDNA from *C.sinensis* as probe (400bp). Clones were classified into two types based on their relative *Eco* RI and *Pst* I sites.

E : *Eco* RI X : *Xho* I P : *Pst* I

2.2 *CHS* cDNA 之性質分析

利用 DNAsis 軟體分析茶葉 TTES No.12 之四株 *CHS* cDNA 中四種鹽基之組成得到(G+C)含量分別為 48.78% (pC4.1)； 47.16% (pC6.4)； 49.09% (pC9.3)； 47.92% (pC14.1)。而其胺基酸序列之 codon usage ratio 概括而言在 61 個可被使用密碼中，未被採用者在 pC4.1 及 pC6.4 兩株中有 CTG 及 CGA 兩個；pC9.3 株為 CGA 一個；pC14.1 株為 CTG、TCG 及 AGA 三個。胺基酸密碼在第三位置(wobble position) G/C 所佔的比例(××G/C)分別為 58.6% (pC4.1)； 59.1% (pC6.4)； 58.9% (pC9.3)及 56.3% (pC14.1)；在四株 cDNA 中比例均類似。四株 cDNA 的趨勢均以 Leu, Glx(Glu+Gln), Ala, Val, Asx(Asn+Asp) 含量較高，His, Trp, Tyr 含量低且均由 389 個胺酸所組成，整個趨勢以疏水性胺基酸含量高。Molecular mass 在 42.5KDa ~ 42.7KDa 之間。並在第 310 個胺基酸處有一個 leucine zipper motif。(Lx{6}Lx{6}Lx{6}L,圖七)。

		10	20	30	40	50	
PC4-1.DNA	1	GGCACGAG--	-ACAATACTT	ATCTTCTACT	CTGCCTCCTC	TGTAGCTTTG	50
PC6-4.DNA	1GA	T.....	G.....	G.....	50
PC9-3.DNA	1--	50
PC14-1.DNA	1--	---C.....	50
		60	70	80	90	100	
PC4-1.DNA	51	TGGTCTCAGA	CCCACCACCT	CATAACCACC	ACCACCACC-	-----GCACA	100
PC6-4.DNA	51T.....	100
PC9-3.DNA	51C..A	CCACC.....	100
PC14-1.DNA	51	T.C.....	100
		110	120	130	140	150	
PC4-1.DNA	101	CGGTGTCTCT	CCGCCCCCTG	TGAATTTCTT	TCTCCGGCGA	AG <u>ATG</u> GTGAC	150
PC6-4.DNA	101	150
PC9-3.DNA	101	150
PC14-1.DNA	101	-A....G--	-----C.	.A....C..	150
		160	170	180	190	200	
PC4-1.DNA	151	AGTGGAGGAA	GTGAGGAGGG	CACAGAGGGC	CGAGGGACCC	GCGACGGTGA	200
PC6-4.DNA	151	200
PC9-3.DNA	151A	200
PC14-1.DNA	151	C..C....C	A.CC.....AC.A..	T..A....T	..C....T.	200
		210	220	230	240	250	
PC4-1.DNA	201	TGGCGATCGG	GACGGCGACT	CCGCCCAACT	GCGTAGATCA	GAGCACGTAC	250
PC6-4.DNA	201A...T.....	250
PC9-3.DNA	201T.....	250
PC14-1.DNA	201T..	A.....A..C	..A..G....T.....	250
		260	270	280	290	300	
PC4-1.DNA	251	CCAGATTACT	ACTTCCGCAT	TACTAACAGC	GAGCATAAAA	CGGAGTTGAA	300
PC6-4.DNA	251	..G...A...	300
PC9-3.DNA	251	300
PC14-1.DNA	251	..G.....T.T..G..	C..A.....GG	.C.....	300
		310	320	330	340	350	
PC4-1.DNA	301	AGAGAAGTTT	CAGCGCATGT	GTGACAAGTC	CATGATTAAG	AAGAGGTATA	350
PC6-4.DNA	301	350
PC9-3.DNA	301	T.....	350
PC14-1.DNA	301	G..A....C	A.....	.C....A..	T.....	...C.T..C.	350
		360	370	380	390	400	
PC4-1.DNA	351	TGTATTTGAC	AGAGGAAATT	TTAAAAGAAA	ACCCAAATGT	GTGTGCCTAC	400
PC6-4.DNA	351	400
PC9-3.DNA	351	400
PC14-1.DNA	351C.....	T.....	..G..G....	.T..TC.A..AG...	400
		410	420	430	440	450	
PC4-1.DNA	401	ATGGCACCTT	CACTAGATGC	TAGGCAAGAC	ATGGTGGTTG	TTGAAGTACC	450
PC6-4.DNA	401	450
PC9-3.DNA	401	C.....	450
PC14-1.DNA	401T.....G...T..G.A....	450
		460	470	480	490	500	
PC4-1.DNA	451	AAAAGTAGGC	AAAGAGGCTG	TAACCAAGGC	CATCAAAGAA	TGGGGCCAGC	500
PC6-4.DNA	451	C.....	500
PC9-3.DNA	451	C.....	500
PC14-1.DNA	451	...G.....A	C..A.....	A.....T..A.	500

圖五、茶葉四種苯基苯乙烯酮合成酶 cDNA 序列

Fig.5. Comparison of the nucleotide sequence of four *CHS* cDNAs from tea plant (*C.sinensis* var.TTES No.12). The *CHS* cDNAs are included in the clones named as pC4.1, pC6.4, pC9.3 and pC14.1 Bases are numbered from the 5'-terminuses of the cDNAs. The initiation and termination codons in the pC4.1 sequence are indicated by framing and highlighting, respectively. The deletions of bases are marked by broken lines. The polyadenylation signals in the sequence of *CHS* cDNAs are underlined. Identical bases to pC4.1 are denoted with dots.

Fig.5.continued(圖五續)

	510	520	530	540	550		
PC4-1.DNA	501	CGAAGTCCAA	AATCACCCAC	TTGGTTTTCT	GCACCACTAG	TGGCGTCGAC	550
PC6-4.DNA	501	550
PC9-3.DNA	501	550
PC14-1.DNA	501	.A.....	...T.....C..T.C..	...T..T...	550
		560	570	580	590	600	
PC4-1.DNA	551	ATGCCCGGGG	CCGATTACCA	ACTCACCAAG	CTCCTCGGTC	TCCGTC CCTC	600
PC6-4.DNA	551	600
PC9-3.DNA	551	600
PC14-1.DNA	551C.....A.....	.T..C..A..	600
		610	620	630	640	650	
PC4-1.DNA	601	TGTCAAGCGC	CTCATGATGT	ACCAACAAGG	TTGCTTTGCC	GGCGGCACCG	650
PC6-4.DNA	601	650
PC9-3.DNA	601G	650
PC14-1.DNA	601	A.....AAG	T.....T.....A.	650
		660	670	680	690	700	
PC4-1.DNA	651	TGCTCCGCCT	AGCCAAAGAC	CTAGCTGAGA	ACAACAAAGG	TGCTCGGGTC	700
PC6-4.DNA	651	700
PC9-3.DNA	651	700
PC14-1.DNA	651	.A..T.....G...	T.G..C....	A..C.....T	700
		710	720	730	740	750	
PC4-1.DNA	701	CTAGTTGTGT	GTTCCGAAAT	CACTGCAGTC	ACCTTCCGTG	GGCCTAGTGA	750
PC6-4.DNA	701	750
PC9-3.DNA	701	750
PC14-1.DNA	701	T....C....	.C..T..G..	A.....G...	..A.....	750
		760	770	780	790	800	
PC4-1.DNA	751	TGCCCATCTT	GATAGCCTTG	TGGGCCAGGC	CCTATTTGGT	GACGGTGCAG	800
PC6-4.DNA	751	800
PC9-3.DNA	751	800
PC14-1.DNA	751	.A.....C	..C.....T..A..C	..T..C..G.	800
		810	820	830	840	850	
PC4-1.DNA	801	CTGCTATTAT	AGTTGGGTCA	GACCCAATTC	CCGAAGTTGA	GAAGCCGTTG	850
PC6-4.DNA	801G.....	850
PC9-3.DNA	801G.....	850
PC14-1.DNA	801A.....	...A.....	850
		860	870	880	890	900	
PC4-1.DNA	851	TTTGAGTTGG	TCTCAGCGGC	TCAAACCATC	CTCCCGGACA	GCGACGGTGC	900
PC6-4.DNA	851	900
PC9-3.DNA	851	900
PC14-1.DNA	851	..C.....	C.....TC..T.	.T.....	900
		910	920	930	940	950	
PC4-1.DNA	901	TATCGATGGG	CATCTTCGTG	AAGTGGGCCT	TACATTCCAT	CTCCTCAAGG	950
PC6-4.DNA	901	950
PC9-3.DNA	901	950
PC14-1.DNA	901	C..T..C..A	..C..C....T..C	950
		960	970	980	990	1000	
PC4-1.DNA	951	ATGTTCCCTGG	GCTTATTTCC	AAGAACATAG	AGAAGAGTCT	AAATGAGGCA	1000
PC6-4.DNA	951	1000
PC9-3.DNA	951	1000
PC14-1.DNA	951C..C...T.	.A.....T.	GGCG..A...	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
PC4-1.DNA	1001	TTTCAACCCT	TGAACATCAC	TGATTGGAAT	TCCCTTTTCT	GGATAGCCCA	1050
PC6-4.DNA	1001	..C.....	1050
PC9-3.DNA	1001	..C.....	1050
PC14-1.DNA	1001	..C.....	..GG....T.C	..TT.G..T.T..A..	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
PC4-1.DNA	1051	TCCCGGTGGC	CCTGCCATTT	TGGACCAAGT	GGAATTGAAG	TTGGCCCTTA	1100
PC6-4.DNA	1051	1100
PC9-3.DNA	1051	1100
PC14-1.DNA	1051	...T.....GT....T..G..A...G.....	1100
		1110	1120	1130	1140	1150	
PC4-1.DNA	1101	AGCCCGAGAA	GCTTCGGGCC	ACGAGACACG	TGCTAAGTGA	GTACGCCAAC	1150
PC6-4.DNA	1101	1150
PC9-3.DNA	1101	1150
PC14-1.DNA	1101	..GAA.....	...A.....G....T..T	1150

Fig.5.ontinued (圖五續)

		1160	1170	1180	1190	1200	
PC4-1.DNA	1151	ATGTCCAGCG	CTTGTGTGTT	GTTTATCCTA	GATGAGATGA	GAAAGAGTTC	1200
PC6-4.DNA	1151	1200
PC9-3.DNA	1151	1200
PC14-1.DNA	1151A..T.	.G..C.....AT.GG....AG..	1200
		1210	1220	1230	1240	1250	
PC4-1.DNA	1201	AGCAAAGAAA	GGACTCAAGA	CCACTGGTGA	GGGCCTCGAC	TGGGGTGTGC	1250
PC6-4.DNA	1201	1250
PC9-3.DNA	1201	1250
PC14-1.DNA	1201	C..GGC.G.T	..G.....	A.....GA.....	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
PC4-1.DNA	1251	TCTTTGGGTT	CGGACCAGGG	CTCACCGTTG	AGACTGTGGT	GCTACATAGC	1300
PC6-4.DNA	1251	1300
PC9-3.DNA	1251	1300
PC14-1.DNA	1251	.A..C.....T....C.....	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
PC4-1.DNA	1301	GTGTCTACT	AAATTTAAAA	TGTTGCTCTA	TCATTGAACT	ACGCTGTAGT	1350
PC6-4.DNA	1301	1350
PC9-3.DNA	1301A.....A	...T.....	1350
PC14-1.DNA	1301	T.....A.T	G.C....AGC	CT.....GTA	TT.T.TC--.	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
PC4-1.DNA	1351	GAGGTCTTTT	TTTTTT-AAT	GTGCAATTGT	GTTGGCTTTT	ATTGGTTCC	1400
PC6-4.DNA	1351	1400
PC9-3.DNA	1351T...	1400
PC14-1.DNA	1351	.G.-----	...C..C...	T.....	...A-----	----G.TG	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
PC4-1.DNA	1401	ACTTTGCTTT	GGTTGTTTGC	ATTTTGTAAT	GATACTCATG	TA- TC ATTA	1450
PC6-4.DNA	1401	1450
PC9-3.DNA	1401	1450
PC14-1.DNA	1401	G.....	...C.----	.C...A.---	----T..C..	C.----T...	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
PC4-1.DNA	1451	AAATTTAAAT	AATATATGTT	TCTTGTGATA	-----	-----	1500
PC6-4.DNA	1451	TCCTTGCAA	AAAAAAAAA	1500
PC9-3.DNA	1451A	-----	-----	1500
PC14-1.DNA	1451	..G.AAG...G.A.	-----	.TA...A.G	-----	-----	1500
		1510	1520	1530	1540	1550	
PC4-1.DNA	1501	-----	-----	-----	-----	-----AAAA	1550
PC6-4.DNA	1501	AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	1550
PC9-3.DNA	1501	-----	-----	-----	-----	AAAAAAAAA	1550
PC14-1.DNA	1501	-----	-----	---AGATTAT	AATGGAAAAT	AAAAAAAAA	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
PC4-1.DNA	1551	AAAAAAAAA	AAA.....	1600
PC6-4.DNA	1551	AAAAAAAAA	AAA.....	1600
PC9-3.DNA	1551	AAAAAAAAA	AAA.....	1600
PC14-1.DNA	1551	AAAAAAAAA	AAA.....	1600

三、cDNA 序列及胺基酸一級結構之比較

3.1 DNA 及胺基酸序列之相似性

利用電腦分析繪出數種常用限制酶對 pC4.1, pC6.4, pC9.3 及 pC14.1 作用之限制圖譜(圖六 A.B.C.D.)並對照前期操作所選取之酵素所得的資料相符(圖四)。根據圖譜可初步將四支 cDNA 株分為兩型；其中 pC4.1, pC6.4, pC9.3, 為 class I ； pC14.1 為 class II 。

將本試驗四支 cDNA 株之 DNA 及胺基酸一級構造序列排列比較於(圖五及圖七)。初步發現茶葉 CHS 之 cDNA 株中胺酸轉譯區均為 1,167bp 沒有任何核苷酸之刪減或插入。進一步以電腦比對其相似性(homology);先比較 class I (pC4.1; pC6.4; pC9.3)及 class II (pC14.1)四株 DNA(含全長或 coding region 如表一 A,B)之相似百分比；class I 之三株之間為 94~99%，兩個 class 間為 74~84%。class I 與 Takeuchi *et al.*(1994)在文獻中所發表日本 *Camellia sinensis cv. Yabukita* 之 CHS1, CHS2 及 CHS3 比較分別為 64~ 84%，92~99% 與 74~82%。class II 與

CHS1, *CHS2* 及 *CHS3* 比較分別為 96~99%, 77~84% 與 84~89%。而文獻之三株 cDNA 之間相互相似性為 76~82%。在胺基酸一級構造之相似性 (表二) 而言 class I 三株間之相似性為 98%, 其與 class II 之相似性為 94%; class I 與文獻 *CHS1* 為 94~95%, 與 *CHS2* 為 99% 與 *CHS3* 為 92~93%; class II 與文獻 *CHS1* 相似性為 99% 與 *CHS2* 為 94% 與 *CHS3* 為 95%。文獻中三條間之相似性為 93~95%。由這些比較結果顯示 class I 應與文獻 *CHS2* 為同一類型, 而 class II 與文獻 *CHS1* 為同一型, *CHS3* 應為獨立型不同於本試驗所篩選到之 *CHS* cDNA。

3.2 以電腦分析相似性

利用電腦程式掃描比對畫出 pC4.1, pC6.4, pC9.3, pC14.1 及文獻中 *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* 之 DNA homology plot 及 protein homology plot (圖八 A.B.C.D 及圖九 A.B)。由 homology plot 的結果配合 3.1 之相似比, 能比較確定的區分出不同型之 cDNA, 如屬同一型之 pC4.1, pC6.4, pC9.3, *CHS2* 間比較 (圖八之 A-1, A-2, A-5, B-1, B-4, C-3) 圖中可連接一明顯直線, pC14.1 及 *CHS1* (圖八之 D-1) 間比較亦有明顯直線形成可歸屬同一型, 而 *CHS3* 為單獨一型不與任何一株 cDNA 形成直線 (圖八之 A-6, B-5, C-4, D-3)。在 protein homology plot 中屬不同型之 cDNA 即無法連接成完整之直線。

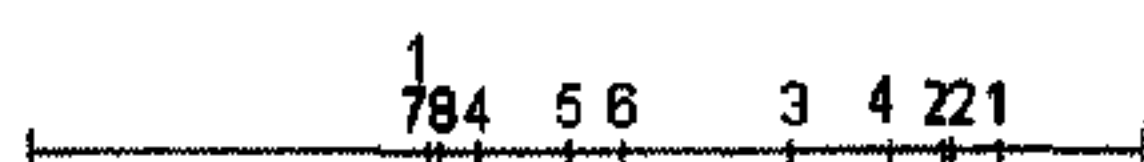
四、利用 PCR 選殖茶葉的染色體 *CHS* 基因

為測定茶葉的 *CHS* 基因是否含 intron, 根據茶葉 *CHS* cDNA pC9.3 序列 (圖五) 合成引子 1 (第 139bp 至 168bp); 引子 2 (第 719bp 至 748bp); 引子 3 (748bp 至 719bp) 引子 4 (第 1308bp 至 1279bp) 含轉譯起始點及終點之四組引子配合成三種組合如表三。

以 *C.sinensis* var. TTES No.12 的 DNA 染色體為模板進行 PCR 反應, 結果如圖十之 A, 三種引子組合所得到的 PCR 產物之長度與預估值差不多。利用 ^{32}P 標幟 (採 nick translation 方法) 的茶葉 400bp *CHS* cDNA 探針, 進行 Southern 雜交反應發現三種 DNA 產物與 *CHS* cDNA 都有雜交現象 (圖十 B), 回收純化此三個片段, 分別分析其核苷酸序列, 發現與圖五所列四株 cDNA 中之一支完全相同。表示茶葉 *CHS* 的 ORF 不含 intron。

A. pC4.1

—|—
0.1kb



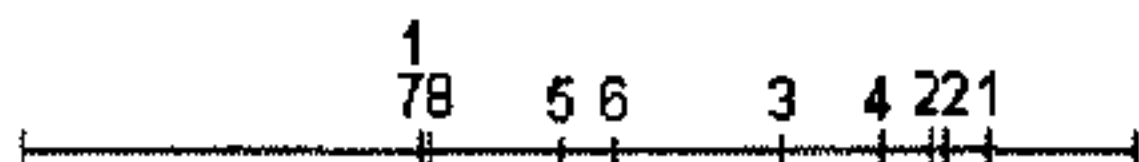
Number	Enzyme Name	Sequence	Count	Cutting Position
1	AccI	GT↓MKAC	++	538 1296
2	BsrI	ACTGGN↓	++	1220 1236
3	EcoRI	G↓AATTC	+	1019
4	HaeII	RGCGC↓Y	++	602 1153
5	PstI	CTGCA↓G	+	719
6	PvuII	CAG↓CTG	+	792
7	SalI	G↓TCGAC	+	537
8	SmaI	CCC↓GGG	+	548

B. pC6.4



Number	Enzyme Name	Sequence	Count	Cutting Position
1	AccI	GT↓MKAC	++	541 1299
2	BsrI	ACTGGN↓	++	1223 1239
3	EcoRI	G↓AATTC	++	1022 1190
4	HaeII	RGCGC↓Y	++	605 1156
5	PstI	CTGCA↓G	+	722
6	PvuII	CAG↓CTG	+	795
7	SalI	G↓TCGAC	+	540
8	SmaI	CCC↓GGG	+	551

C. pC9.3



Number	Enzyme Name	Sequence	Count	Cutting Position
1	AccI	GT↓MKAC	++	543 1301
2	BsrI	ACTGGN↓	++	1225 1241
3	EcoRI	G↓AATTC	+	1024
4	HaeII	RGCGC↓Y	+	1158
5	PstI	CTGCA↓G	+	724
6	PvuII	CAG↓CTG	+	797
7	SalI	G↓TCGAC	+	542
8	SmaI	CCC↓GGG	+	553

D. pC14.1



Number	Enzyme Name	Sequence	Count	Cutting Position
1	AccI	GT↓MKAC	+	1203
2	BsrI	ACTGGN↓	+	1127
3	BstEII	G↓GTNACC	+	44
4	SmaI	CCC↓GGG	++	455 594
5	SstII	CCGC↓GG	+	1102
6	XhoI	C↓TCGAG	+	1134

圖六、電腦分析之茶葉苯基苯乙烯酮合成酶 cDNA 之限制圖譜

Fig.6. Restriction maps of *C. sinensis* TTES No.12 *CHS* cDNA by computer analysis

A .pC4.1 B .pC6.4 C. pC9.3 D .pC14.1

		10	20	30	40	50	
PC4-1.AMI	1	MVTVEEVRRA	ORAEGPATVM	AIGTATPPNC	VDQSTYPDYY	FRITNSEIHKI	50
PC6-4.AMI	1	MVTVEEVRRA	ORAEGPATVM	AIGTATPPNC	VDQSTYPDYY	FRITNSEIHKI	50
PC9-3.AMI	1	MVTVEEVRRA	ORAEGPATVM	AIGTATPPNC	VDQSTYPDYY	FRITNSEIHKI	50
PC14-1.AMI	1	MVTVEEVRRA	ORAEGPATVM	AIGTATPPNC	VDQSTYPDYY	FRITNSEIHKI	50
			60	70	80	90	100
PC4-1.AMI	51	ELKEKFORMC	DKSMIKKRYM	YLTEEILKEN	PNVCAYMAPS	LDARODMIVV	100
PC6-4.AMI	51	ELKEKFORMC	DKSMIKKRYM	YLTEEILKEN	PNVCAYMAPS	LDARODMIVV	100
PC9-3.AMI	51	ELNEKFORMC	DKSMIKKRYM	YLTEEILKEN	PNVCAYLAPS	LDARODMIVV	100
PC14-1.AMI	51	ELKEKFORMC	DKSMIKKRYM	YLTEEILKEN	PNVCAYMAPS	LDARODMIVV	100
			*		*		
		110	120	130	140	150	
PC4-1.AMI	101	EVPKLGKEAV	TKA IKEWGQP	KSK ITHLVFC	TTSGVDMPGA	DYQLTKLLGI	150
PC6-4.AMI	101	EVPKLGKEAA	TKA IKEWGQP	KSK ITHLVFC	TTSGVDMPGA	DYQLTKLLGI	150
PC9-3.AMI	101	EVPKLGKEAA	TKA IKEWGQP	KSK ITHLVFC	TTSGVDMPGA	DYQLTKLLGI	150
PC14-1.AMI	101	EVPKLGKEAA	TKA IKEWGQP	KSK ITHLVFC	TTSGVDMPGA	DYQLTKLLGI	150
				*			
		160	170	180	190	200	
PC4-1.AMI	151	RPSVKRLMMY	OQGC FAGGTV	LRLAKDLAEN	NKGARVLVVC	SEITAVTFRG	200
PC6-4.AMI	151	RPSVKRLMMY	OQGC FAGGTV	LRLAKDLAEN	NKGARVLVVC	SEITAVTFRG	200
PC9-3.AMI	151	RPSVKRLMMY	OQGC FAGGTV	LRLAKDLAEN	NKGARVLVVC	SEITAVTFRG	200
PC14-1.AMI	151	RPSVKRLMMY	OQGC FAGGTV	LRLAKDLAEN	NKGARVLVVC	SEITAVTFRG	200
			*		*		
		210	220	230	240	250	
PC4-1.AMI	201	PSDAHLDSL	GOALFGDGAA	ATIVGSDPIF	EVEKPLFELV	SAAQTILPDS	250
PC6-4.AMI	201	PSDAHLDSL	GOALFGDGAA	ATIVGSDPIF	EVEKPLFELV	SAAQTILPDS	250
PC9-3.AMI	201	PSDAHLDSL	GOALFGDRAA	ATIVGSDPIF	EVEKPLFELV	SAAQTILPDS	250
PC14-1.AMI	201	PSDTILDSL	GOALFGDGAA	ATIVGSDPIF	EVEKPLFELV	SAAQTILPDS	250
		260	270	280	290	300	
PC4-1.AMI	251	DGATDGHIRE	VGLTFHLLKD	VPGLISKNTF	KSLNEAFQPL	NI TDWNSLFW	300
PC6-4.AMI	251	DGATDGHIRE	VGLTFHLLKD	VPGLISKNTF	KSLNEAFQPL	NI TDWNSLFW	300
PC9-3.AMI	251	DGATDGHIRE	VGLTFHLLKD	VPGLISKNTF	KSLNEAFQPL	NI TDWNSLFW	300
PC14-1.AMI	251	DGATDGHIRE	VGLTFHLLKD	VPGLISKNTF	KSLAIAEQPL	GI SDWNSLFW	300
		310	320	330	340	350	
PC4-1.AMI	301	IAHPGGPAII	DQVELKLALK	PEKLRATRIV	LSEYGNMSSA	CVLFILDEM	350
PC6-4.AMI	301	IAHPGGPAII	DQVELKLALK	PEKLRATRIV	LSEYGNMSSA	CVLFILDEM	350
PC9-3.AMI	301	IAHPGGPAII	DQVELKLALK	PEKLRATRIV	LSEYGNMSSA	CVLFILDEM	350
PC14-1.AMI	301	IAHPGGPAII	DQVELKLALK	PEKLRATRIV	LSEYGNMSSA	CVLFILDEM	350
		L	L	L	L	*	
		360	370	380	390	400	
PC4-1.AMI	351	KSSAKKGLKT	TGEGLDWGV	FGFGPGLTVE	TVVLHSVST	400
PC6-4.AMI	351	KNSAKKGLKT	TGEGLDWGV	FGFGPGLTVE	TVVLHSVST	400
PC9-3.AMI	351	KSSAKKGLKT	TGEGLDWGV	FGFGPGLTVE	TVVLHSVST	400
PC14-1.AMI	351	KKSAADGLKT	TGEGLEWGV	FGFGPGLTVE	TVVLHSLST	400

圖七、茶葉苯基苯乙炔酮合成酶氨基酸序列比較

Fig.7. Alignment of deduced amino acid sequences of cDNA clones of *C.sinensis* CHS. Matching base in shifted alignments are indicated by highlighting. Stars indicate the 6 cysteines conserved in all CHS. "L" under sequences indicates leucine zipper motif. Bracket indicates the putative active region.

(CHS1, CHS2, CHS3 from Takeuchi *et al.*, 1994)

表一、茶 *CHS* cDNA 之 DNA 序列相似性比較Table 1. Comparison of DNA homology degree (%) among *C. sinensis* *CHS* cDNA clones

A. Total cDNA sequences

	pC4.1	pC6.4	pC9.3	pC14.1	<i>CHS1</i> *	<i>CHS2</i> *	<i>CHS3</i> *
pC4.1	100						
pC6.4	94	100					
pC9.3	97	94	100				
pC14.1	76	74	75	100			
* <i>CHS1</i>	78	75	64	96	100		
* <i>CHS2</i>	92	93	92	77	78	100	
* <i>CHS3</i>	77	74	77	84	85	76	100

* From Takeuchi *et al.*(1995)

B. Coding region sequences

	pC4.1	pC6.4	pC9.3	pC14.1	<i>CHS1</i> *	<i>CHS2</i> *	<i>CHS3</i> *
pC4.1	100						
pC6.4	99	100					
pC9.3	99	99	100				
pC14.1	84	84	84	100			
* <i>CHS1</i>	84	84	84	99	100		
* <i>CHS2</i>	99	99	99	84	84	100	
* <i>CHS3</i>	82	83	82	89	89	82	100

* From Takeuchi *et al.*(1995)表二、茶 *CHS* cDNA 推衍胺基酸序列之比較Table 2. Comparison of deduced amino acid homology degree (%) among *C. sinensis* *CHS* cDNA clones

	pC4.1	pC6.4	pC9.3	pC14.1	* <i>CHS1</i>	* <i>CHS2</i>	* <i>CHS3</i>
pC4.1	100						
pC6.4	98	100					
pC9.3	98	98	100				
pC14.1	94	94	94	100			
* <i>CHS1</i>	95	95	94	99	100		
* <i>CHS2</i>	99	99	99	94	95	100	
* <i>CHS3</i>	93	92	92	95	95	93	100

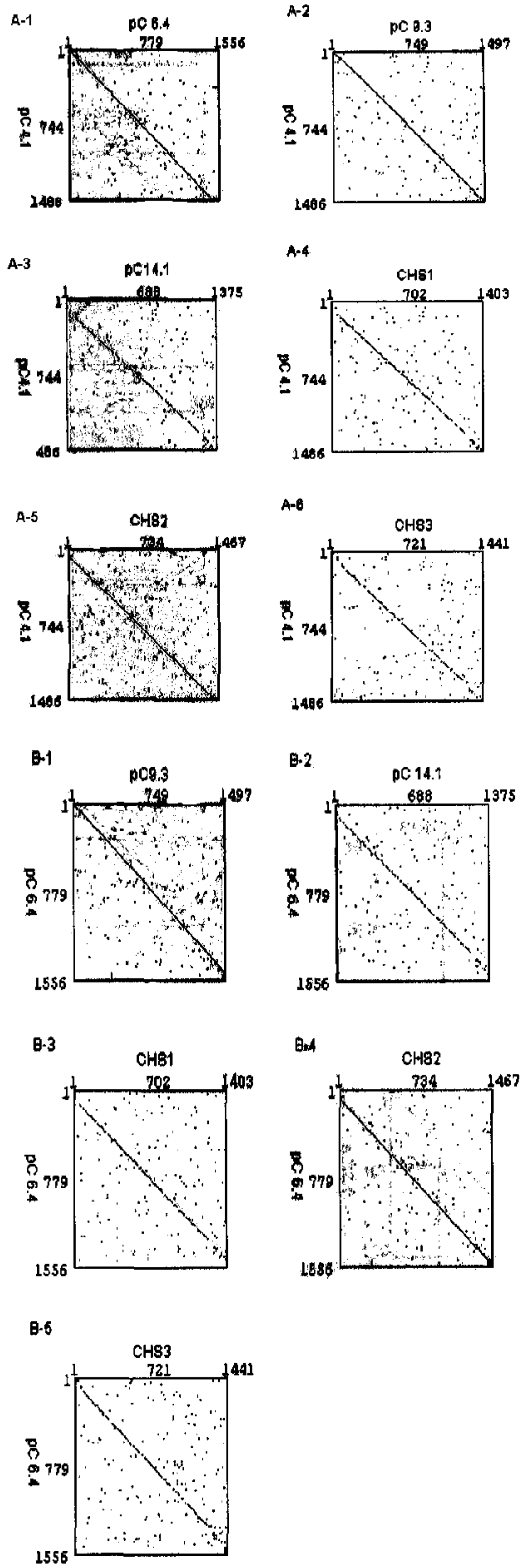
* From Takeuchi *et al.*(1994)

表三、各種引子所合成的 PCR 產物

Table 3. PCR products from various primer combinations

Primer combinations		Predicted	Actual
5'end	3'end	Size (bp) ^a	size (bp)
1 (139bp~168bp)	3 (748bp~719bp)	610	610
2 (719bp~748bp)	4 (1308bp~1279bp)	590	590
1 (139bp~168bp)	4 (1308bp~1279bp)	1170	1170

^aThe calculation of predicted size is based on the DNA sequence of pC9.3 in Fig.5.



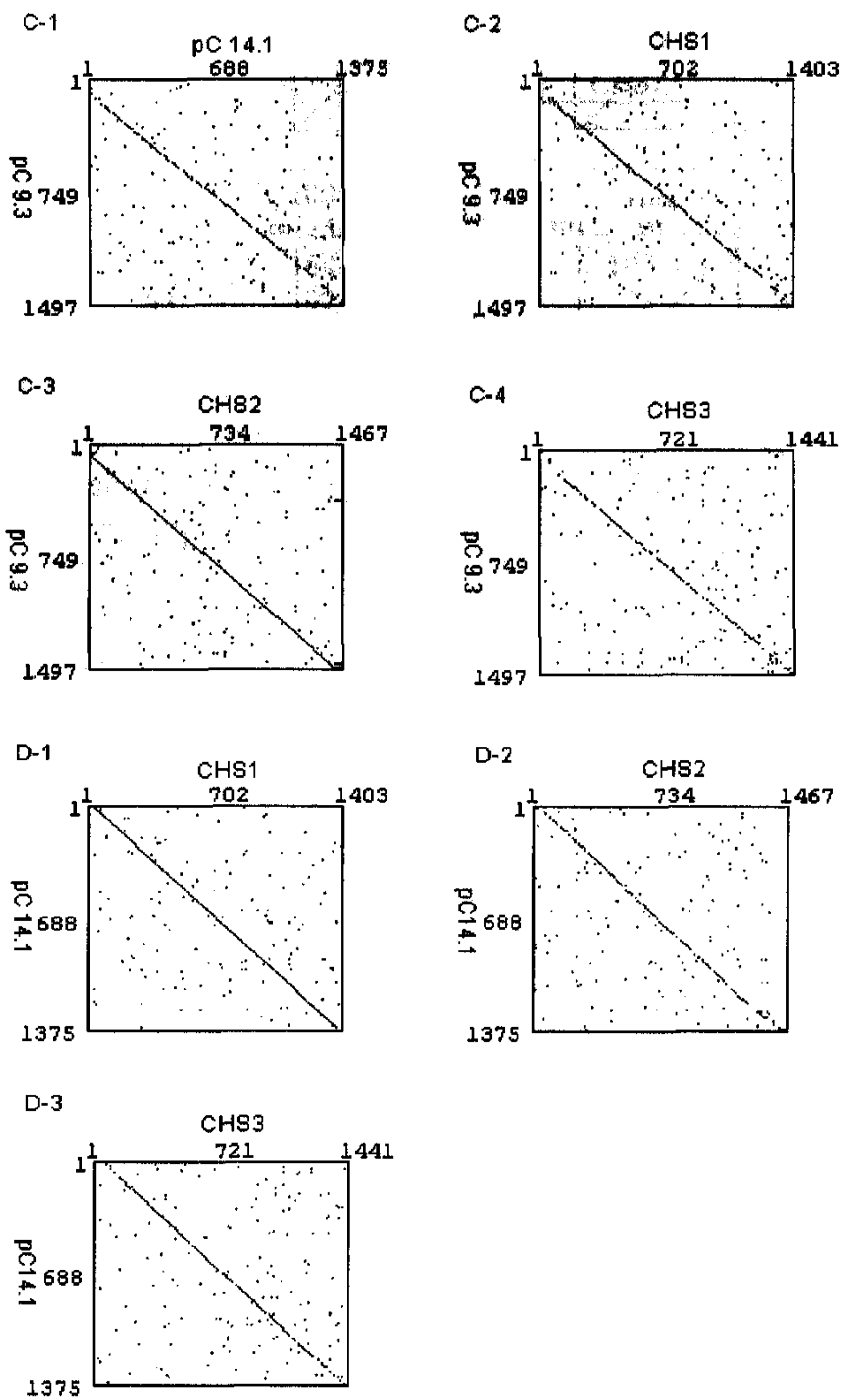
圖八、茶葉苯基苯乙炔酮合成酶 cDNA 之 homology plot

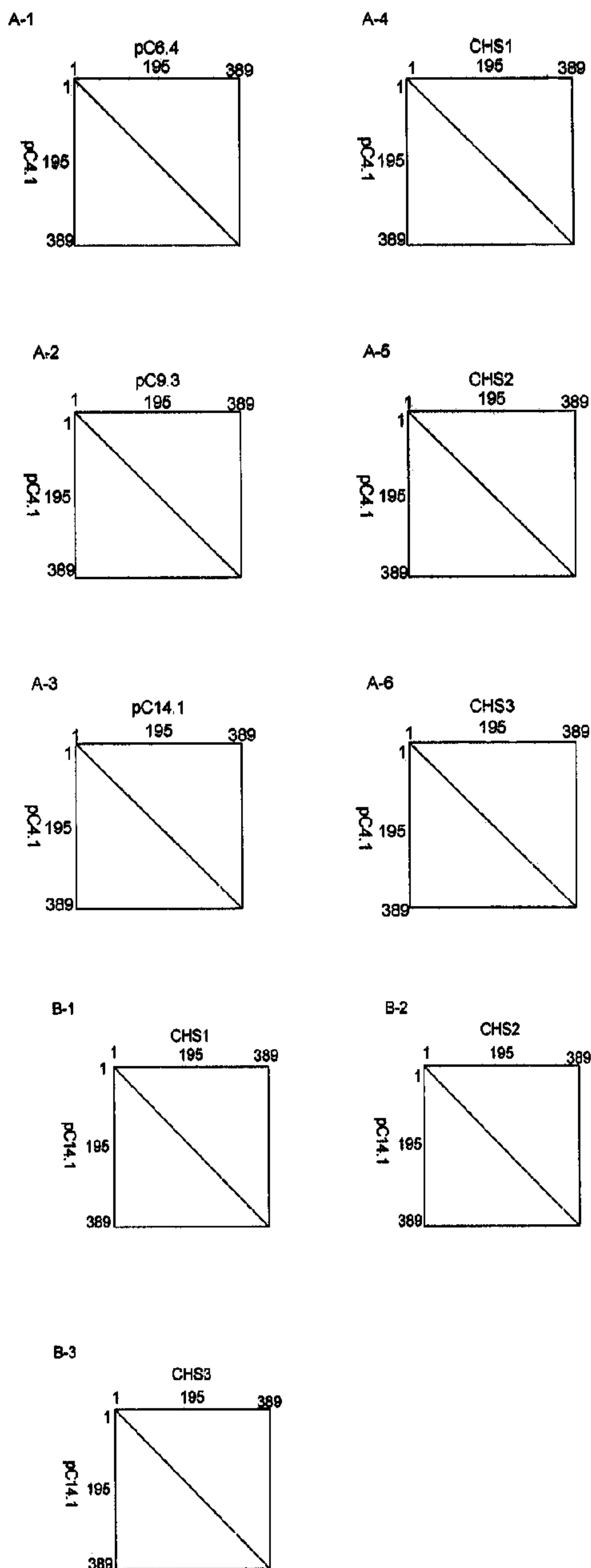
Fig.8. Homology plot of *C. sinensis* CHS cDNA

Check size: 10; Matching size: 8

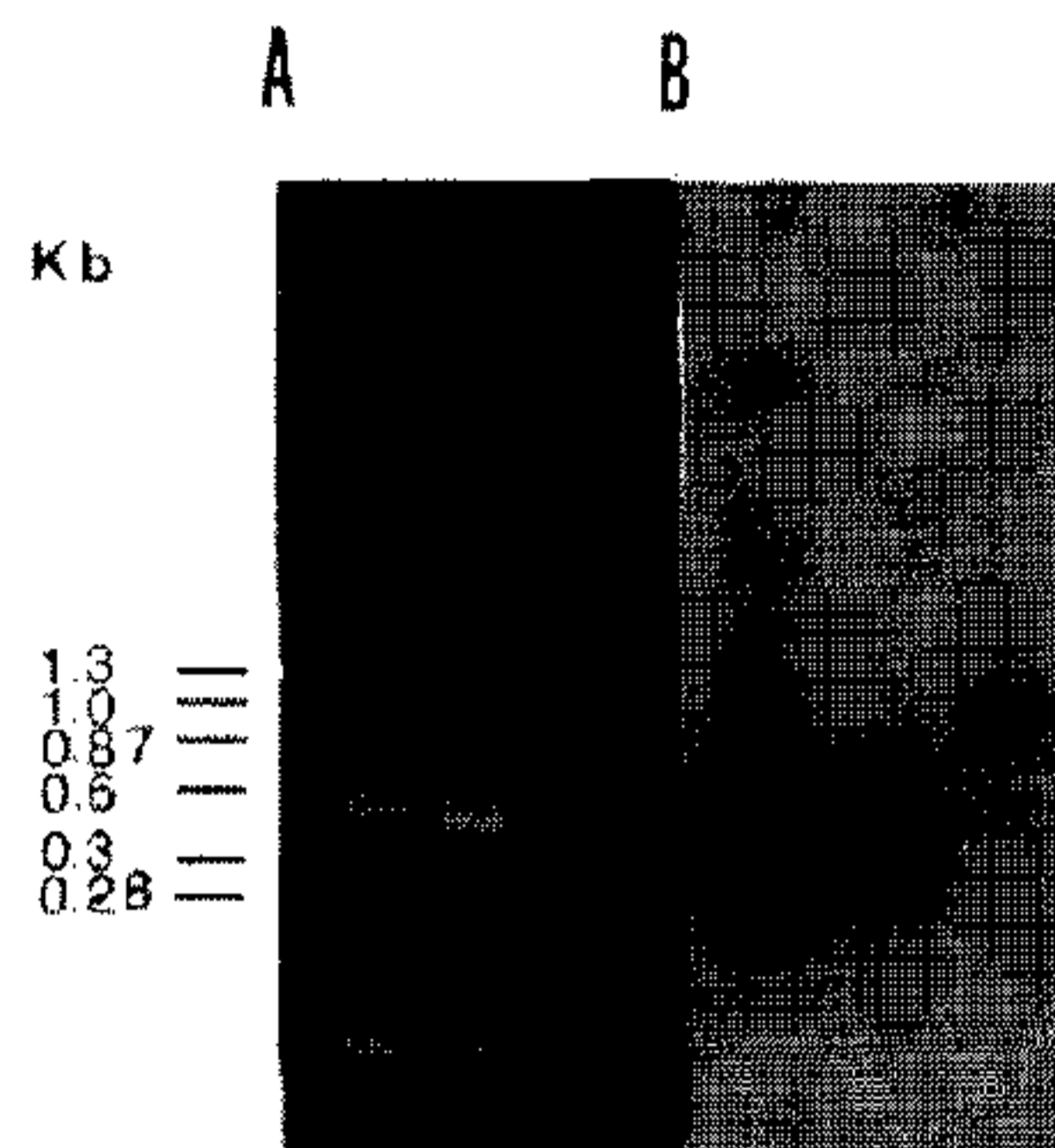
(CHS1, CHS2, CHS3 from Takeuchi *et al.*, 1995)

Fig.8. continued(圖八續)





圖九、茶葉苯基苯乙炔酮合成酶之 protein homology plot
 Fig.9. Protein homology plot of *C.sinensis* CHS
 (CHS1,CHS2,CHS3 are from Takeuchi *et al.*, 1995)



圖十、以 *C. sinensis* var. TTES No.12 染色體 DNA 為模板配合不同組合引子所得到的 PCR 產品

Fig.10. Southern blot analysis of PCR products obtained by various primer combinations TTES No.12 genomic DNA was used as the template
Agarose gel : 1.2%.

Panel A: staining with ethidium bromide.

Panel B: Southern hybridization using ^{32}P -labeled *CHS* cDNA (400bp) from *C. sinensis* var. TTES No.12 as probe.

Lane 1: primer 1&3.

Lane 2: primer 2&4.

Lane 3: primer 1&4.

五、各種作物苯基苯乙炔酮合成酶基因之比較

5.1 *CHS* cDNA 之選殖

本試驗原擬利用芫荽(*Petroselinum hortense*)或菸草(*Nicotiana tabacum*)*CHS* cDNA 做為探針，選殖茶葉 *CHS* cDNA，但發現芫荽 *CHS* cDNA 和茶葉總 RNA 的 Northern 雜交反應較微弱；而和菸草 *CHS* cDNA(pA14)有較強的雜交反應，靠近轉譯起始點部份之 cDNA(pA5)雜交反應亦非常微弱(陳，1999)將全長的芫荽與菸草 *CHS* cDNA 與茶葉 *CHS* cDNA 進行比對後，發現其同質性分別為 67~68%、71~75%。芫荽的同質性低是造成雜交結果較微弱的原因。而菸草 *CHS* cDNA 有較強的雜交反應，理論上可用為篩選 cDNA 庫之探針。

5.2 mRNA 上與轉譯有關之訊息

真核生物一般以第一次出現 ATG 序列作為轉譯起始點。通常植物有選用 $\times \times \text{ATGG}$ 序列的傾向(Gallie, 1993)。茶葉 *CHS* cDNA 的轉譯起始點為序列中第一次出現之 ATG，且此密碼及其兩旁的 DNA 序列為 AGATGG(pC4.1, pC6.4, pC9.3)及 AAATGG (pC14.1)；比較各種不同植物的 *CHS* 發現 ATG 是否作為轉譯起始點，以其-3 的位置是否為 purine 所決定(Niesbach-Klöggen *et al.*, 1987)，以矮牽牛(*P.hybrida*) 為例，在第一次出現之 ATG 後緊接著出現終止密碼(TAA)，因此第二次出現的 ATG 才作為轉譯起始點。在分析金魚草(*A.*

majus)、木蘭(*M. liliiflorum*)、大麥(*H. vulgare*)、芫荽、玉米(*Z. mays*) 等數種植物 *CHS* cDNA 的第一個 ATG 序列除了大麥(GA \blacksquare CGATGG)在-3 的位置為 pyrimidine，其他的均為 purines(圖十一)，而 pyrimidine 在此位置可能決定此 ATG 為轉譯起始點上游，或內在 methionine 密碼(Kozak, 1984)。因此在大麥中往下 12bp 之第二個 ATG 具有較合適之序列(GA \blacksquare CGATGA)。而茶葉 *CHS* cDNAs 所推測的轉譯起始點由於均符合上述說法，應屬正確的。各種植物 *CHS* 轉譯產物的 molecular mass 集中於 42.2~43.0KDa 之間，大部份由 379~402 個胺基酸所組成，僅少數幾種例外如美洲牽牛花(*P. nil*)之 *CHSFLI*、苜蓿(*M. sativa* L.)之 *CHS 4*、*msCHS II* 及矮牽牛(*P. vulgaris*)之 *CHSJ* 分別由 340, 331, 265 及 319 個胺基酸組成，其 molecular mass 為 28.6~37.5KDa。

在比較單子葉植物和雙子葉植物 *CHS* cDNA 轉譯區(ORF)內四種鹽基的分佈情形，發現單子葉植物的 *CHS* cDNA 其(G+C)含量高，如大麥 *CHS* cDNA 的(G+C)為 65.7% 玉米為 69.3% 而雙子葉植物的 *CHS* cDNA 的(G+C)含量較低，介於 45.5~53.9% 之間，如矮牽牛為 46.0%，芫荽為 48.8%，金魚草為 52.3% (Niebach-Klößgen *et al.*, 1987) 紫羅蘭(*M. incana*)為 52.8% (Epping *et al.*, 1990) 芥菜(*S. alba* L.) 為 53% (Batschauer *et al.*, 1991)。本試驗所選殖茶葉 *CHS* cDNA 其轉譯區(G+C)含量分別為 51.78%(pC4.1)；51.87%(pC6.4)；52.04%(pC9.3)；50.84%(pC14.1)均符合雙子葉植物 *CHS* cDNA(G+C)含量。

四支茶葉 *CHS* cDNA 異構基因的轉譯終點區域均有數個終止密碼之密集出現。第一個終止密碼均為 TAA，其後在不同距離又出現 TAA 或 TGA 之終止密碼；此種現象在其他基因之 mRNA 亦常發現，例如芫荽(Reimold *et al.*, 1983)、矮牽牛(koes *et al.*, 1986)及阿拉伯芥(*A. thaliana*) (Feinbaum & Ausubel, 1988)、美國牽牛花(Fukada-Tanaka *et al.*, 1997)、葛藤(*P. lobata*)(Nakajima *et al.*, 1991)等的 *CHS* 上均有兩個以上的終止密碼。*CHS* cDNA 3'端 UTR(untranslated region)上可能的 polyadenylation signal 根據文獻記載(Niebach-Klößgen *et al.*, 1987)為在 poly(A)⁺ 上游之 AATAAA, AATAAT, AATGAA 及 AATATA 數種而在茶葉的四支 *CHS* cDNA 異構基因，分別為 AATAAT(pC4.1 及 pC6.4 分別在 poly(A)⁺ tail 上游 22bp 及 30bp)；AAAATA(pC9.3 在 poly(A)⁺ tail 上游 19bp)；AATGAA(pC14.1 在 poly(A)⁺ tail 上游 35bp)。都只具備一個可能的 polyadenylation signal 及不等長之 poly(A)⁺ tail。

真核生物體轉錄出的 RNA 大都要經過 splicing 並接上 5' cap 及 3' poly(A)⁺ 尾才能成為具有功能的 mRNA, poly(A)⁺ 尾被認為可提高穩定性，又經由 5' cap 及 poly(A)⁺ 尾序列可提高細胞內轉譯蛋白質之能力(Munroe & Jacobson, 1990; Gallie, 1993)。一般而言 poly(A)⁺ 尾是緊接著 polyadenylation signal 的下游形成。

在二十九種已知 *CHS* 序列的植物中除了芥菜 *SCHS I*、矮牽牛的 *CHSJ* 及苜蓿之 *msCHS II* 基因外，其他植物的 *CHS* 基因，在 *CHS* 第 67 胺基酸序列都是 cysteine (multiple alignment 序列未列出)。將已有文獻記載之金魚草、玉米、芫荽、矮牽牛、阿拉伯芥、黃豆(*G. max*)、芥菜及歐洲赤松(*P. sylvestris*)等多種植物(Sommer & Saedler, 1996; Niebach-Klößgen *et al.*, 1987; Herrmann Batschauer, 1991; Rohde, 1991; Fligmann *et al.*, 1992; van der Meer *et al.*, 1992) 的染色體 *CHS* 基因與 *CHS* cDNA 序列加以比對，在 cysteine codon 的前面兩個核 酸之間都具有一長度由幾十個到幾千個核苷酸所構成的 intron。本試驗所選殖的茶葉 *CHS* cDNA，其第 60 個胺基酸為 cysteine (圖六)。當以 *C. sinensis* var. TTES No.12 的染色體 DNA 當板模，以對應茶葉 *CHS* cDNA 的 5'端轉譯起始點及 3'端轉譯終點之 DNA 序列所合成的寡核苷酸為引子；利用 PCR 技術所選殖到 *C. sinensis* var. TTES No.12. *CHS* 染色體基因，長度和 *C. sinensis* var. *CHS* cDNA 的預估長度差不多(圖十)，且 DNA 序列和 *CHS* cDNA 其中一支序列完全相

同。表示茶葉染色體 *CHS* 基因不含 intron，此為繼菸草 *CHS* 基因之後，再一次發現不含 intron 的 *CHS* 基因。

5.3 各種植物間苯基苯乙炔酮合成酶(CHS)之生化性質比較

由茶葉中 *CHS* cDNA 分析其蛋白質 molecular mass 為 42.6KDa (pC4.1); 42.5KDa (pC6.4,pC14.1); 42.6KDa (pC9.3)。pI 值分別為 6.50(pC4.1); 7.19(pC6.4); 6.50(pC9.3); 5.95 (pC14.1); 與已發表其他植物 *CHS* cDNA 解碼為 265~402 個胺基酸，蛋白質 molecular mass 於 28.6~43.4KDa, pI 值 5.32~7.24 符合(數據未列出)。而不同植物間之親水疏水性的型式亦類似。

Lanz *et al.*(1991)利用定位突變法(site-directed mutagenesis)證實 cysteine-169 為花生 resveratrol synthase (簡稱 RS)及芥菜 *CHS* 的活性位置。在 cysteine-169 及其兩端的胺基酸序列(MMYQQGCFAGGTVLR)有很高的同質性，此活性部位在茶葉 *CHS* 中只有 pC14.1 出現第三個胺基酸由 tyrosine 改為 phenylalanine。另外 Landschulze *et al.* (1988)及 O'shea *et al.* (1991)在比較核轉形蛋白質(nuclear transforming protein)及轉錄調節蛋白質(nuclear transforming protein)的結構，發現都具有一個共同的胺基酸序 Lx{6}Lx{6}Lx{6}L，其中四個定距(七個胺酸周期)leucine 重複出現，稱為 leucine zipper motif。一般認為此 motif 和蛋白質的雙體(dimerization)結構有關。即 motif 中的 leucine 側鏈由多胜-(polypeptide)的 α -helix 中伸展出來與第二個多胜-中相同位置 α -helix 的 leucine 側鏈交叉，有助於雙體結構形成。

Kreuzaler *et al.* (1979) 純化出的茺葵 *CHS* 蛋白質證實是由兩個 subunit 所組成，可佐證 leucine zipper motif 和蛋白質雙體有關。茶葉 *CHS* 蛋白由於尚未被純化，因此其結構是否由兩個單體組成尚不可知，但是本研究發現其 *CHS* 胺酸含有標準之 leucine zipper motif 序列，推測其可能亦為雙體結構。

```

C. sinensis (pC4.1) ..... TCCGGCGAAGATGGTGACAGTGGAGGAA...
                (pC14.1) ..... TCCGGCCAAAATGGTCACCGTTCGAGGA...
A. majus        ..... TTATAAGAAAATGGTGACTGTGAGGTTC...
H. vulgare      ..... AGATCGATCGATGGCGGC CGATGACGG...
M. liliiflorid  ..... ATCAAAACCCATGTCTCGGTGTCGACCC...
P. hortense     ..... AAAAAA AAAATGGCAAATCATCATATG...
P. hybrida      ..... TCTATGTAAGAATGGTGACTGCGAGTATC...
R. acer (1)     ..... ATAATCAAATATGGTGACTGTAAAATAC...
R. acer (2)     ..... CTAAATCAGTATGGGTGACTGTAAAATC...
Z. mays         ..... GACGACGACGATGGCCGGCGCGCCGTGA...
  
```

圖十一、幾種植物苯基苯乙炔酮合成酶 cDNA 之轉譯起始點分析

Fig.11. Analysis of translation initiation regions of several *CHS* cDNA species

The possible initiation and termination codons are underlined and framed respectively.

The -3 positions of possible initiation codons are indicated by highlighting.

結 論

經由茶葉 cDNA 庫的篩選，確定茶中至少有四條 *CHS* 異構基因，可歸納為兩型：Class I 包括 pC4.1, pC6.4 及 pC9.3，彼此間 ORF 的同質性在 98% 以上；Class II 只有 pC14.1；同為山茶科的其他茶樹 Yabukita 與前者之同質性為 77%。由 Yabukita 所篩出的 *CHS* cDNA 雖只有三株，但可歸納為三型，比本研究多出一型；由於茶樹屬異交作物，因此各種間 *CHS* cDNA 發生差異，應屬正常，在其他種中應可發現更多具差異性的 *CHS* cDNA 存在。利用聚合酶連鎖反應選殖 *C.sinensis* var. TTES No.12 的染色體基因，將其 DNA 序列和 *CHS* cDNA 比對，結果發現 *C.sinensis* var. TTES No.12 的染色體 *CHS* 基因和菸草 *CHS* 基因一樣不含 intron。

表四、各種植物之苯基苯乙烯酮合成酶活性部位與 leucine zipper motif 之比較
Table 4. Comparison of conserved active sites and leucine zipper motifs of chalcone synthases from different plant species

Plant species	Active site	Leucine zipper motif	Reference
<i>C.sinensis</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVELK (A/G)LK(P/E)EK R ATRHV	This study
<i>N.tabacum</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVELK GLKQEK K ATRKV	Hu, 1993
<i>S.tuberosum</i>	MMYQQGCF(A/V)GGTIV(I/L)R	DQVELK GLK(P/Q)EK (Q/R) ATR(Q/E)V	Jeon, 1996
<i>S.lycopersicum</i>	MMYQQGCFAGGTV(I/L)R	DQVELK (G/S)LK(P/A)EK R ATR(Q/E)V	O'Neill <i>et al.</i> , 1990
<i>P.hybrida</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVE (I/L)K GLKPEK (R/K)ATR(H/N)V	Koes <i>et al.</i> , 1986 van Tunen, 1989
<i>I.purpurea</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVEDK GLKPEK R ATRHV	Fukada-Tanaka <i>et al.</i> , 1997
<i>M.incana</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVEIK GLKAEK M RATRHV	Hemleben, 1989
<i>S.alba</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DDVEKK GLKAEK M RATRHV	Ehmann & Schaefer, 1988
<i>D.carota</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVETE SLKPK K STRQV	Ozeki <i>et al.</i> , 1993
<i>P.crispum</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVELK GLKEEK M RATRQV	Reimold <i>et al.</i> , 1983
<i>P.frutescens</i>	MMYQQGC(Y/F)AGGTVLR	DQVEAK GLKPEK R STRHV	Gong <i>et al.</i> , 1997
<i>P.lobata</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVEQK GLKPEK M KATRQV	Nakajima <i>et al.</i> , 1991
<i>M.sativa</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVE (E/Q)K (G/A) LKPEK M (K/N/R)ATREV	Junghans <i>et al.</i> , 1993
<i>P.vulgaris</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVEQKLG KPEK M KATRQV	Ryder <i>et al.</i> , 1987
<i>P.sativum</i>	MMYQQGCFAGGTV(L/F)R	DQVE (Q/E)K (G/A) LDPEK M (R/K)ATREV	Ichinose, 1991
<i>V.unguiculata</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVAQK GLKPEK M KATRQV	Krause, 1993
<i>V.vinifera</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVELK GLKEEK L RATRHV	Sparvoli <i>et al.</i> , 1994
<i>O.sativa</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVELD V(A/G)LK(P/E)EK M RATRHV	Scheffler, 1995
<i>S.cereale</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DMVEAKVN VN KER M R ATRHV	Haussuehl, 1995
<i>H.vulgare</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DRVEDPVGLDKKR M R ASREV	Christensen, 1996
<i>C.chinensis</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVELK GLKEEK M RATRHV	Henkel, 1995
<i>G.hybrida</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVERK NLKEDK R ASRHV	Helariutta, 1994
<i>D.caryophyllus</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVEAK GLKEEK A ATRN V	Henkel, 1995
<i>C.americanum</i>	MMYQQGCFAGGTVLR	DQVEHK APGRRAN S RATR H I	Gulick, 1997

Note : The four leucines of these motifs are indicated by highlighting and the substituted ones of these same positions by frame.

利用 DNAsis 分析茶葉 *CHS* 異構 cDNA 所推衍出的胺基酸序列，顯示各異構酶之同質性非常高，cDNA 轉譯區均為 1,167bp 能轉譯一個含 389 個胺基酸的蛋白質。其中 pC4.1 Mr 為 42621，pI 為 6.50；pC6.4 Mr. 為 42570，pI 為 7.19；pC9.3 Mr. 為 42,666，pI 為 6.50；pC14.1 Mr. 為 42537，pI 為 5.95；由於 Mr. 很接近，因此一般分析法很難分辨這些異構酶。

C. sinensis var. TTES No.12 的 *CHS* 和其他已知的植物的 *CHS* 上都有六個非常保守的 cysteine，其中 cysteine-164 可能為 *CHS* 的活性位置。茶葉的 *CHS* 和其他許多植物的 *CHS* 一樣，具有一個 leucine zipper motif，此 motif 通常和該蛋白質構成雙倍體有關，因此推測 *C. sinensis* var. TTES No.12 的 *CHS* 應該不是單體結構。

兒茶素為決定茶葉的品質上占有極重要的因素，含量太多茶葉具苦澀味，太少則缺乏茶應有的滋味，因此如何控制栽培茶芽中的兒茶素含量，以提昇茶菁品質是多年來努力的目標，從茶葉選殖到的 cDNA 將有助於茶葉染色體 *CHS* 基因的改造，以調控兒茶素的生合成；因此對 *CHS* 基因調控區域的深入研究乃為當務之急。

參考文獻

- 胡惠瑜·(1993) 菸草 Chalcone synthase 基因的選殖及表現·國立台灣大學·農業化學研究所·博士論文(未出版)·
- 陳英玲·(1999) 多酚含量高之茶葉中抽取 RNA 方法之研究·臺灣茶業研究彙報·18:85-99.
- 陳英玲·(1985) 遮蔭對茶葉化學成分之影響·臺灣茶業研究彙報·4:81-88.
- 馮鑑淮、徐英祥·(1987) 遮蔭對茶芽特性及產量與包種茶品質之研究·臺灣茶業研究彙報 6:15-24.
- 馮鑑淮、徐英祥·(1988) 遮蔭度及遮蓋時間對茶芽特性及產量與包種茶品質之影響·臺灣茶業研究彙報 7:63-78.
- Batschauer, A., Ehmann, B. and Schafer, E. (1991) Cloning and characterization of a chalcone synthase gene mustard and its light-dependent expression. *Plant Mol. Biol.* 16: 175-185.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1523.
- Christensen, A.B., Gregersen, P.L. and Collinge, D.B. (1996) A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV-light. Unpublished.
- Ehmann, B. and Schaffer, E. (1988) Nucleotide sequences encoding two different chalcone synthase expressed in cotyledons of SAN 9789 treated mustard (*Sinapis alba* L.) *Plant Mol. Biol.* 11: 869-870.
- Epping, B., Kittel, M. Ruhnau, B. and Hemleben, V. (1990) Isolation and sequence analysis of chalcone synthase cDNA *Matthiola incana* R.Br.(Brassicaceae). *Plant Mol. Biol.* 14: 1061-1063.
- Feinbaum, R.L. and Ausubel, F.M. (1998) Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Mol. cell Biol.* 8: 1985-1992.
- Fliegmann, J., Schroder, G., Schanz, S., Britsch, L. and Schroder, J. (1992) Molecular analysis of chalcone synthase and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 489-503.
- Fukada-Tanaka, S., Hoshino, A., Hisatomi, Y., Habu, Y., Hasebe, M. and Iida, S. (1997) Identification of new chalcone synthase gene for flower pigmentation in Japanese and common morning glories. *Plant Cell Physiol.* 38:754-758.
- Gallie, D.R (1993) Posttranscriptional regulation of gene expression in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 77-105.

- Gawel, N.J. & Jarret, R.L. (1990) A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:262-266.
- Gong, Z., Yamazaki, M., Sugiyama, M., Kobayashi, M and Saito, K. (1997) Cloning and expression analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. unpublished.
- Haussuehl, K.K., Rhode, W. and Weissenboeck, G. (1996). Expression of chalcone synthase genes in coleoptiles and primary leaves of *Secale cereale* L. after induction by UV radiation: evidence for a UV-protective role of the coleoptile. *Bot. Acta.* 109:229-238.
- Ichinose, Y., Kawamata, S. Yamada, T., An, C.C., Kajiwara, T., Shiraishi, T. and Oku, H. (1992) Molecular cloning of chalcone synthase cDNAs from *Pisum sativum* *Plant Mol. Biol.* 18:1009-1012.
- Jeon, J.H., Kim, H.S., Choi, K.H., Joung, Y.H., Joung, H. and Byun, S.M. (1996) Characterization of two members of the Chalcone Synthase gene family from *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.* 111, 348.
- Junghans, H., Dalkin, K. and Dixon, R.A. (1993) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 15. Characterization and expression patterns of members of a subset of the chalcone synthase multigene family. *Plant Mol. Biol.* 22: 239-253.
- Kozak, M. (1986) Point mutation define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
- Koes, R.E., Spelt, C.E., Reif, H.J., van Den Elzen, P.J.M., Veltkamp, E. and Mol, J.N.M. (1986) Floral tissue of *Petunia hybrida* (V30) expresses only one member of the chalcone synthase multigene family. *Nucl. Acids Res.* 14: 5229-5239.
- Krause, A., Lan, V.T. and Broughton, W.J. (1997) Induction of chalcone synthase expression by rhizobia and nod factors in root hairs and roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:388-393.
- Kreuzaler, F., Ragg, H., Heller, W., Tesch, R., Witt, I., Hammer, D. and Hahlbrock, K. (1979) Flavanone synthase from *Petroselinum hortense*.-Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA, and absence of pentahydroxy residue. *Eur. J. Biochem.* 99: 89-96.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and Mcknight, S.L. (1988) The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* 240: 1759-1764.
- Lanz, T., Tropf, S., Marner, F.J., Schroder, J. and Schroder, G. (1991) The role of cysteines in polyketide synthases, site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *J. Biol. Chem.* 266 : 9971-9976.
- López-Gómez, R. and Gómez-Lim, M.A. (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* 27: 440-442.
- Munroe, D. and Jacobson, A. (1990) Tales of poly(A)⁺ : a review. *Gene* 91 : 151-158.
- Nakajima, O., Akiyama, T., Hakamatsuka, T., Shibuya, M., Noguchi, H., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1991) Isolation, sequencing and bacterial expression of a cDNA for chalcone synthase from the cultured cells of *Pueraria lobata* *Chem. Pharm. Bull.* 39: 1911-1913.
- Niesbach-Klösgen, U., Barzen, E., Bernhardt, J., Rhode, W. and Schwarz-Sommer, Z. (1987) Chalcone synthase genes in plants: a tool to study evolutionary relationships. *J. Mol. Evol.* 26: 213-225.
- O'Neill, S.D., Tong, Y., Spoerlein, B., Forkmann, G. and Yoder, J.I. (1990) Molecular genetic analysis of chalcone synthase in *Lycopersicon esculentum* and an anthocyanin-deficient mutant. *Mol. Gen. Genet.* 224: 279-288.
- O'shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S. and Alber, T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science.* 245: 539-545.
- Ozeki, Y., Davies, E. and Takeda, J. (1993) Structure and expression of chalcone synthase gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2, 4-D. *Plant Cell Physiol.* 34:1029-1037.

- Reimold, U., Kroger, M., Kreuzaler, F. and Hahlbrock, K. (1983) Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. *EMBO J.* 2: 1801-1805.
- Rhode, W., Dorr, S., Salamini, F. and Becker, D. (1991) Structure of a chalcone synthase gene from *Hordeum vulgare*. *Plant Mol. Biol.* 16: 1103-1106.
- Ryder, T.B., Hedrick, S.A., Bell, J.N., Liang, X., Clouse, S.D., and Lamb, C.J. (1987) Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Gen. Genet.* 210: 219-233.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Scheffler, B.E., Reddy, A., Hoffmann, I. and Wienand, U. (1995) Chalcone synthase cDNA from Rice (*Oryza sativa*). Unpublished.
- Sommer, H. and Saedler, H. (1986) Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *Mol. Gen. Genet.* 202: 429-434.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G. and Tonelli, C. (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera L.*). *Plant Mol. Biol.* 24:743-755.
- Takeuchi, A., Matsumoto, S. and Hayatsu, M. (1995) Effect of shading treatment on the expression of the genes for chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase in tea plant. *Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plant & Tea. Japan. B.* 8: 1~9.
- Takeuchi, A. Matsumoto, S. and Hayatsu, M. (1994) Chalcone synthase from *Camellia sinensis*: Isolation of chalcone synthase from *Camellia sinensis*: Isolation of the cDNA and the organ-specific and sugar-responsive expression of genes. *Plant Cell Physiol.* 35: 1011-1018.
- Van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R. (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* 4: 253-262.
- Van Tunen, A.J., Koes, R.E., Spelt, C.E., van der Krol, A.R., Stuitje, A.R. and Mol, J.N.M. (1988) Cloning of two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *EMBO J.* 7: 1257-1263.
- Wan, C. Y. and Wilkins, T.A. (1994) A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum L.*). *Anal. Biochem.* 223: 7-2.

Cloning of *Camellia sinensis* Chalcone Synthase cDNA

Ying-Ling Chen¹ Hsien-Yi Sung² Jong-Ching Su²

Summary

Phenolic compounds are the most abundant water-soluble component in tea. Catechins, the major phenolic compounds in tea, can be divided into two categories according to their chemical structures. One of them is the simple catechin including epicatechin, epigallocatechin and catechin, the other is the catechin gallate including epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. Catechins constitute about 15~30% of the dry weight of leaves and stems. Studies on the biochemical properties of catechins may lead to new technologies for controlling the quality of tea leaves.

The catechin is a flavonoid compound derived from the phenylpropanoid pathway. Chalcone synthase (*CHS*) is a key enzyme of the biosynthesis of catechin. The *CHS* cDNA, genomic clones, and its proteins have been isolated or purified from a number of plant species. According to previous reports, three full-length cDNAs encoding chalcone synthase, CHS1, CHS2, CHS3, were isolated from tea. The three cDNA transcripts were expressed in various organs and were found to respond to sugar in young leaves in a similar manner.

In the present study, a cDNA library has been constructed from the *C.sinensis* poly(A)⁺RNA using λ ZAP II as the vector. Eighteen positive clones have been isolated from 10⁵ pliques using a homologous *CHS* 400bp cDNA probe. This *C.sinensis* *CHS* 400bp cDNA probe was prepared by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.

These clones can be divided into two classes, one consisting of pC4.1, pC6.4 and pC9.3 and the other being pC14.1. These two classes of *CHS* cDNA clones were sequenced and identified by comparison with previously published *CHS* sequences of tea. The cDNAs of classes I and II showed a single open reading frame of 1,167bp which codes for a protein of 389 amino acids. The amino acid sequences showed 93~96% identity to one another. The molecular masses of the proteins range from 42.5KDa to 42.6KDa. There are about four to five termination codons, and a polyadenylation signal downstream. The tea *CHS* cDNAs from the present as well as previously reported studies can be classified into three groups according to the levels of the nucleotide and amino acid sequences. In the first group, our class I and the CHS2 showed 90% identity to each other. In the second group, our class II and the CHS1 also showed the same identity of 90%. In the third group, the CHS3 showed 74~85% identity to groups I and II. (The third group was not found

1. Associate Biochemist, TTES, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

2. Professor, Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

in present study.) The genomic *CHS* DNA has been isolated using the PCR technique and compared with the cDNA sequence. The study also revealed that the *C.sinensis* gene contains no intron.

The alignment of the *C.sinensis* *CHS* amino acid sequences with those from various plants indicated that they all have 6 conserved cysteine residues. The cysteine-164 in the *CHS* of *C.sinensis* might be essential for the *CHS* activity. The *C.sinensis* *CHS* also contains a leucine zipper motif similar to those found in most *CHS*s from various plants. The motif may contribute to dimerization of the protein structure.

The sequence comparison of the *C.sinensis* *CHS* cDNAs with those of other various plants revealed more than 70% identity to one another. The homology of the deduced *CHS* amino acid sequences of *C.sinensis* toward those from other plants revealed more than 80% identity. This result indicates that the *CHS*s has been highly conserved in the evolution, a characteristic for most essential house keeping gene.

Key words : Tea, Chalcone synthase, cDNA, Gene cloning